

TAFI (ProCPR) ELISA KIT 使用説明書

注意 人への投与はしないで下さい。研究目的のためのみ使用して下さい。

TAFI (ProCPR) ELISA KIT の特長

TAFI (ProCPR) ELISA KIT は2種類のエピトープの異なるモノクローナル抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法を用いているので TAFI (proCPR)のみを高感度で定量的に検出することができます(TAFIa(CPR)等に活性化/不活化されたされたものには反応しません)。試料調整後、約3時間で測定が完了します。

TAFI = Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor

ProCPR = Procarboxypeptidase R

TAFIa = activated TAFI = Carboxypeptidase R = CPR

内容物品一覧

- | | | |
|---|--------------|--------------------------|
| • ELISA plate | ELISA プレート | 1 枚- 密封包装 |
| TAFI(ProCPR)に対するモノクローナル抗体(mAb)を結合したプレート。 | | |
| • Sample Diluting Solution | 希釈原液 (5 倍濃度) | 40 ml - 1 bottle (250ml) |
| • Washing Buffer | 洗浄原液 (6 倍濃度) | 50 ml - 1 bottle (50ml) |
| 6倍濃度の PBS に 0.3% Tween20 を添加したもの。 | | |
| • Standard plasma | 標準血漿 | 凍結乾燥 - 1 tube |
| 血漿を希釈して凍結乾燥したものを TAFI (ProCPR)標準品とした。 | | |
| • POD labeled mAb | POD 標識抗体 | 30 µl - 1 tube |
| HRP 標識抗体に EDTA 溶液、BlockAce(原液)を添加したもの。 | | |
| • 30% H ₂ O ₂ | 過酸化水素水(劇物) | 30 µl - 1 tube |
| • Color Developing Buffer | 発色液 | 20 ml - 1 bottle (50ml) |
| Citric acid、Na ₂ HPO ₄ を蒸留水に溶解したもの。 | | |
| • Stop Solution | 停止液 | 20 ml - 1 bottle (50ml) |
| 2 N H ₂ SO ₄ 溶液。 | | |
| • OPD tablet | OPD 錠 (劇物) | 2 錠 |
| • TAFI (ProCPR) ELISA KIT | 使用説明書 | 1 部 (4 枚) |

試薬の調製法

試薬の調製（事前に調製を行います）

- ・ 希釈液-希釈液容器内には、希釈原液が 40 ml 入っています。その容器内に蒸留水を加えて全量を 200 ml にします。
- ・ 洗浄液-洗浄原液容器内には、6 倍濃度の洗浄原液が 50 ml 入っています。適宜、容器を用意し、蒸留水を加えて全量を 300 ml にします(6 倍希釈)。析出がみられる場合がありますのでよく溶かしてからご使用ください。

試料及び標準血漿の調製（ELISA プレートの洗浄前に調製を行います）

- ・ 試料(血漿検体)は 1600 倍希釈になるように 2 段階で希釈します。調製した希釈液 980 μ l に血漿を**正確に 20 μ l** 加えてよく混和し、その内の **20 μ l** を希釈液 620 μ l に加え希釈調製します(1600 倍希釈)。標準血漿はキットに含まれる標準血漿チューブに、調製した希釈液を**正確に 1ml 加えて溶解します***。溶解した標準血漿に希釈液を用いて 2 倍希釈列で 7 ポイントを調製します(1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64)。Blank として希釈液のみの well を作ります。これらを用いて標準直線を作成します。溶解した標準血漿、試料(血漿検体)は検出感度上ばらつきが出る可能性があるため、氷上で 30 分以内に使用することをお勧めします。

*標準血漿に希釈液 1 ml を加えて溶解すると TAFI(proCPR)濃度は 48ng /ml となります。尚、標準血漿中の TAFI(proCPR) 濃度は Haematologic Technologies Inc.社製 Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor を基準にして決定しました。

POD 標識抗体及び OPD-H₂O₂ 発色液の調製

- ・ POD 標識抗体はキットに含まれる POD 標識抗体チューブ内に液体の状態に入っています。適宜、容器を用意し、希釈液 6 ml を加えて使用します。
- ・ OPD-H₂O₂ 発色液は OPD 錠(20 mg) 1 錠を発色液容器内に入れて 20 ml の発色液に溶かし、使用直前に 30 % H₂O₂ 10 μ l を加えて混ぜます(用時調製して下さい)。
- ・ OPD 錠(20 mg)は、1 錠余分に添付してあります。OPD 錠(20 mg)が変色していないのを確認してからご使用下さい。

ELISA 操作法

操作に用いる各試薬は**試薬の調製法**に基づき調製してください。

- 1) ELISA プレートの洗浄を行います。洗浄液を 300 μl / well 添加し、室温で 10 分間静置した後に液を捨てよく水分を取り除きます^{注1)}。
- 2) 調製した試料及び標準血漿を 50 μl / well 添加した後、室温にて1時間静置し、液を捨てます。
- 3) 洗浄液を 300 μl / well 添加し、液を捨てます。この洗浄操作を 3 回繰り返し、よく水分を取り除きます^{注1)}。
- 4) POD 標識抗体を 50 μl / well 添加した後、室温にて1時間静置し、液を捨てます。
- 5) 洗浄液 300 μl / well で 3 回洗浄し、洗浄液を捨てよく水分を取り除きます。
- 6) 用時調製した OPD-H₂O₂ 発色液を 100 μl / well 添加し、室温で遮光して 10 分間静置^{注2)}します。
- 7) 停止液を 100 μl / well 添加し、反応を停止します。
- 8) O.D. 492 nm を測定します。
- 9) 7 ポイントの 2 倍希釈標準血漿と Blank (希釈液のみ) の測定値から標準直線^{注3)}を作成し、各試料中の TAFI(proCPR)量を算出します。

注 1) 液を捨てるときはプレートを逆さに持って振り捨てた後、同じ要領で吸湿性の紙等をプレートに当てた状態にして液を振り落とすのが簡便です。液が残らないように注意しますが、乾燥は避けて下さい。

注 2) 発色時間は各ウェルで厳密に同じになるようにして下さい。

注 3) 標準直線を作成する際 O.D. 値が 1.2 以上のポイントは正確な TAFI(proCPR)量が測定できない可能性があるため計算から外して下さい。

操作上の注意

標準血漿、OPD 錠、OPD-H₂O₂ 発色液、過酸化水素水、停止液は直接皮膚や衣服等に触れないように注意してください。

ELISA プレートには強い衝撃を与えないように操作を行ってください。プレートが割れるだけでなく、測定値がばらつく原因になる可能性があります。

ELISA プレートに調製した試料及び標準血漿、POD 標識抗体を添加して室温にて1時間静置する際、プレートに上からシール等を貼り、蒸発を防ぐようにして下さい。

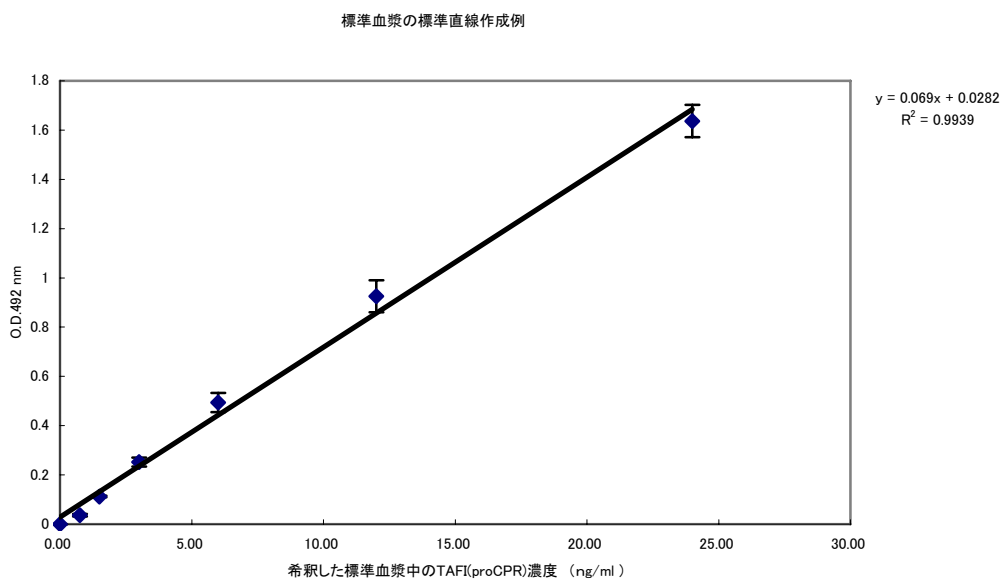
保存方法 2～10 °C 保存

標準血漿の標準直線作成例

希釈した標準血漿 (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64)の測定値(O.D.492nm)を下図のグラフにプロットします。Blank(希釈液のみ)を O.D.492nm のゼロ値に設定します。

標準血漿希釈率	TAFI(proCPR)濃度 (ng/ml)	測定値(O.D.492nm)
1	48	2.29
1/2	24	1.64
1/4	12	0.925
1/8	6.0	0.493
1/16	3.0	0.252
1/32	1.5	0.112
1/64	0.75	0.0367
希釈液のみ	0	0

標準血漿の希釈(1=TAFI(proCPR)の濃度 48 ng/ml)の O.D.492nm 値は 1.8 を超えたため、計算から外します。試料(血漿検体)の測定値(O.D.492nm)が1.2 を超えた場合には、試料(血漿検体)をさらに希釈して測定されることをお勧めします。



製造元 株式会社蛋白科学研究所

本社 研究所 所在地: 名古屋市瑞穂区中山町二丁目 18 番地

お問い合わせ先 TEL 052-841-8921 FAX 052-853-5112

e-mail proteinlabo@ybb.ne.jp home page <http://www.prsc.jp/>