

ミエリン塩基性タンパク質 ELISA キット

使用説明書

本キットは研究用試薬であり、疾病の診断若しくはその補助の目的で使用することはできない。

【使用目的】

本ELISAキットは、脳脊髄液(Cerebrospinal fluid, CSF)中のヒトミエリン塩基性タンパク質 (Myelin Basic Protein, MBP) の定量試薬です。本キットは研究用試薬であり、疾病の診断・治療には使用する事は出来ません。

【概要】

ミエリン (髄鞘) は神経細胞の軸索を取り囲んでいる物質であり、絶縁体の役割を果たしています。中枢神経系ではミエリンの30%がMBPで構成されています。1)MBPの機能は完全には解明されていませんが、立体構造のサポートをしていると考えられています。ヒトMBPは分子量18.5kDaのタンパク質で、2 残基のフェニルアラニンで結合している3つのセグメント (A : 1-43残基、B : 44-89残基、C : 90-170残基) に分けることができます。1), 2) セグメントAとセグメントCはそれぞれMBPのN末端、C末端に該当し、高い相同性を示します。CSF中でのMBPの免疫応答性は主にセグメントBに由来しており、セグメントA、セグメントCは検出限界以下もしくは非常に低濃度で存在しています。3), 4)

【測定原理】

本キットは、3ステップのサンドイッチELISA 法を原理としてヒトMBP を測定します。

抗ヒト MBP 抗体を固相したプレート (抗体プレート) に、標準液又は検体を加えて反応させると、溶液中のヒトMBP が抗体プレートに結合します (第 1 反応)。次にビオチン化ヒトMBP抗体を反応させ (第 2 反応)、さらに西洋ワ

ザペルオキシダーゼ (HRP) 標識ストレプトアビジンを反応させます (第 3 反応)。次に基質液を加えて発色させ (発色反応)、450 nm および 630 nm における吸光度 A_{450} , A_{630} を測定します。各測定結果から、 A_{450} - A_{630} を計算し、各サンプルの測定結果とします。標準液の測定結果より標準曲線を求め、検体中のヒトMBP 濃度を算出します。

【形状・構造等 (キットの構成)】

CAL-108-A - CAL-108F MBP Calibrator A-F

A-Fと表記された6本のバイアルは、ヒトMBP標準液 (血清、アジ化ナトリウム含有) の凍結乾燥品です。Aは0 ng/mL、B-Fはおおよそ0.3-11 ng/mLで、正確な値はキットに同封されているcalibration cardをご参照ください。

2 - 8 °Cで保管し、使用前に純水 1 mLで溶解してください。溶解後は良く混合し、直ちに使用してください。標準液中のMBP濃度は製造会社の使用している標準物質を用いて規定していますが、本キット以外で測定した際に、異なる濃度を示す場合があります。Calibratorは常温出荷です。

CTR-108-I - CTR-108-II MBP Controls I & II

I, IIと表記された2本のバイアルは、それぞれ低濃度、高濃度のヒトMBPを含むコントロール液 (血清、アジ化ナトリウム含有) の凍結乾燥品です。正確な濃度はキットに同封されているcalibration cardをご参照ください。2 - 8 °Cで保管し、使用前に純水 1 mLで溶解してください。溶解後は良く混合し、直ちに使用してください。

PLT-108 Anti-MBP Antibody Coated Microtitration

Strips

マウス抗MBPモノクローナル抗体を固相化した96ウェルプレートです。

除湿剤の入ったアルミパウチ袋に入れてありますので、2-8℃で保管してください。

BCC-108 MBP Biotin Conjugate Concentrate

0.4 mL の検出用抗体濃縮液（非水銀系防腐剤含有）です。

2-8℃で保管し、使用前にMBP Conjugate Diluentで希釈してください。

CND-208 MBP Conjugate Diluent

12 mL の検出用抗体希釈液（非水銀系防腐剤含有）です。

2-8℃で保管してください。

SAR-108 MBP Streptavidin-Enzyme Conjugate-Ready-to-use (RTU)

12 mL のストレプトアビジン-HRP（非水銀系防腐剤含有）です。

2-8℃で保管してください。

TMB-100 TMB Chromogen Solution

12 mL のTMB溶液（過酸化水素含有）です。

2-8℃で保管してください。

STP-100 Stopping Solution

12 mL の 0.2 M 硫酸水溶液です。

2-30℃で保管してください。

WSH-100 Wash Concentrate A

60 mL の濃縮洗浄液（非イオン性界面活性剤含有）です。

2-30℃で保管し、使用時は純粋で2.5倍希釈してください。

以下はキットに含まれない

1. プレートリーダー
2. プレートシェイカー
3. プレートウォッシャー
4. マイクロピペット
5. ボルテックスミキサー
6. 純水

【注意事項】

■本キットに関して

- 1) 本キットは研究用です。
- 2) 測定操作にあたっては、感染の危険性を避けるために、マスク及びディスポーズブルゴム手袋、実験着及び保護眼鏡を着けて操作してください。また、取扱い後は手をよく洗ってください。
- 3) 製造番号の異なるキット中の構成試薬を組み合わせ使用しないでください。
- 4) 使用期限を過ぎたキットは使用しないで下さい。

■本キットの使用に際して

- 1) 使用する際には、使用説明書をよく読んでください。
- 2) 検量線は使用するたびに測定してください。
- 3) 試薬は使用前に室温に戻し、使用前に転倒混和してください。
- 4) 異なる濃度の標準液を分注する際は、ピペットチップを交換してください。また、検体や試薬を添加する場合も、ピペットチップを交換してください。
- 5) コンタミネーションや試薬の劣化を避けるために、純水を使用して下さい。
- 6) 不完全な洗浄は再現性の低下を招きますので、ご注意ください。
- 7) TMB反応時間のばらつきが生じない様にご注意ください。
- 8) 直射日光や高温多湿を避けてください。

【検体調製】

1. 脳脊髄液(CSF)を使用してください。

2. 溶血、高脂血症、黄疸検体は使用しないでください
3. CSF採取、輸送、保管方法は各施設で基準を設定してください。
4. 検体の凍結融解を控えてください。溶解は3回を超えないようにしてください。

【測定方法】

1. 試薬の調製法・保存法

全ての試薬は使用前に室温（18-25℃）に戻してください。一度の試験で全ての試薬を使用しない場合は、必要となる分量のみ使用し、残りは使用説明書に記載の保管条件で保管してください。

(1) MBP Calibrator A-F、MBP Controls I & II
1 mLの純水を加え、タッピングして溶解してください。良く混合して、溶解後は直ちにご使用ください。

(2) 洗浄液

純水で2.5倍希釈して使用して下さい。

希釈後は1カ月間室温で保管、使用できます

(3) MBP Antibody-Biotin Conjugate Solution
まず、測定に必要なMBP Antibody-Biotin Conjugate 溶液量を計算していただき（100 μL/ウェル）、必要十分な液量を調製してください。

MBP Biotin Conjugate Concentrate溶液（×50）を、MBP Conjugate Diluent 溶液で50倍希釈してください（例：MBP Biotin Conjugate Concentrate 220μLを、11 mLのMBP Conjugate Diluentで希釈する）。

(4) マイクロプレート

まず、測定に必要なウェル数を確認して下さい。

使用しないストリップは枠から外し、パウチに入れて保管してください。

2. 操作方法

標準液及び検体は、**2重測定**をお薦めします。

※ 検体中のMBP濃度がCalibrator Fよりも高濃度の場合、Calibrator Aで希釈してそくていしてください。

(1) 各構成試薬を18-25℃に戻します。

(2) 洗浄液、各濃度の標準液、コントロール溶液を調製し

ます。

(3) 抗体プレートのアルミラミネート袋を開封し、測定に必要なストリップだけを取り出します。データシート、プレートマップ等で標準液や試料の位置を確認します。

(4) **各濃度の標準液又は試料**を各ウェルに **100 μL**ずつ加えます。標準液は測定ごと、抗体プレートごとに必ず測定します。ウェルに添加する際は、ウェル底面に直接添加し、壁面への付着、泡の発生を可能な限り避けてください。

(5) プレートシェイカーで**600-800rpm**浸透しながら、**室温(23±2℃)**で **60 分間**反応させます。＜第1反応＞

(6) プレートウォッシャーを使用して、**5回**洗浄します。洗浄液は、1回の洗浄当たり **350μL/ウェル**使用します。

(7) **MBP Antibody-Biotin Conjugate Solution**を各ウェルに **100 μL**ずつ加え、プレートシェイカーで**600-800rpm**浸透しながら、**室温(23±2℃)**で **60 分間**反応させます。＜第2反応＞

(8) プレートウォッシャーを使用して、**5回**洗浄します。洗浄液は、1回の洗浄当たり **350μL/ウェル**使用します。

(9) **MBP Streptavidin-Enzyme Conjugate-Ready-to-use (RTU)**を各ウェルに **100 μL**ずつ加え、プレートシェイカーで**600-800rpm**浸透しながら、**室温(23±2℃)**で **30 分間**反応させます。＜第3反応＞

(10) プレートウォッシャーを使用して、**5回**洗浄します。洗浄液は、1回の洗浄当たり **350μL/ウェル**使用します。

(11) **TMB Chromogen Solution**を抗体プレートの各ウェルに **100 μL**ずつ加え、プレートシェイカーで**600-800rpm**浸透しながら、**室温(23±2℃)**で **8-12分間**反応させます。＜発色反応＞

(12) **Stopping Solution**を抗体プレートの各ウェルに **100 μL**ずつ加えます。基質液を添加した際と同一の順序で添加してください。

(13) プレートリーダーにより各ウェルの**450 nm**（2波長測定の場合には対照波長 **630 nm**）における吸光度を測定します。

3. ヒトMBP濃度の算出方法

各濃度の標準液及び検体の吸光度の平均値から標準液 0 ng/mL の吸光度（ブランク値）の平均値を差し引いて、各実質吸光度を算出します。

X 軸に標準液の濃度を、Y 軸にその実質吸光度をプロットした両対数グラフを作成します。

多項式回帰式を用い、検量線を作成します。

検量線から試料の実質吸光度に対応する、MBP濃度を読みとります。

サンプル中のMBP濃度は、読み取った濃度に前処理時の検体希釈倍率を乗じて容積補正し算出します。

測定したOD値が検量線上限值以上となった場合は、適宜希釈し再測定を行ってください。

Well Number	Well Contents	Mean Absorbance	Conc. (ng/mL)
A1, A2	Calibrator A	0.063 (Blank)	0
B1, B2	B	0.037	0.35
C1, C2	C	0.123	0.8
D1, D2	D	0.392	1.8
E1, E2	E	1.281	4.2
F1, F2	F	3.671	10.5

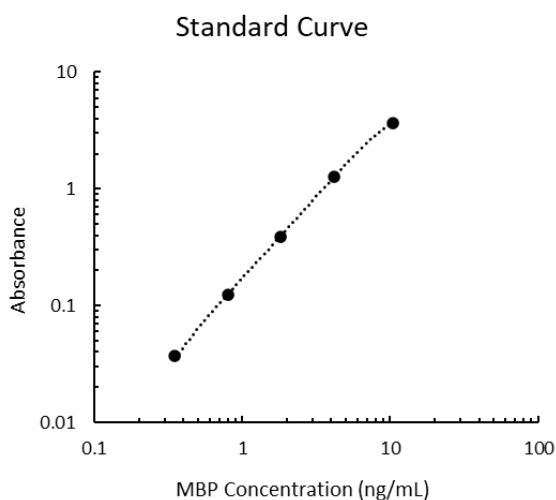


図1 標準曲線 例

【性能】

1. 最低検出感度

本キットの最低検出感度は、0.093 ng/mLです。

2. 再現性

3種類の管理検体を測定し、CV<10%の値を示します。各管理検体を n=4で、6回測定しました。

Sample	Mean Conc.	Within Run		Between Run		Total	
	(ng/mL)	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Pool-1	0.661	0.039	5.93%	0.022	3.39%	0.045	6.84%
Pool-2	1.745	0.027	1.56%	0.045	2.60%	0.053	3.03%
Pool-3	2.046	0.04	1.94%	0.034	1.67%	0.052	2.56%

3. 添加回収試験

異なる2種類の濃度のMBPを各検体に添加し測定しました。

Sample	Endogeneous Conc.(ng/mL)	Expected Conc.(ng/mL)	Observed Conc.(ng/mL)	% Recovery
1	0.752	1.638	1.787	109
2	1.358	2.189	2.228	102

4. 直線性試験

高濃度のMBPを添加した検体を、サンプル希釈液で希釈し測定しました。

Sample	Dilution Factor	Expected Conc. (ng/mL)	Observed Conc. (ng/mL)	% Recovery
1	1:2	8.932	N/A	N/A
	1:4	4.466	4.121	92%
	1:8	2.233	2.261	101%
	1:16	1.117	1.173	105%
	1:32	0.558	0.570	102%
2	1:80	8.503	N/A	N/A
	1:160	4.252	4.315	101%
	1:320	2.126	2.254	106%
3	1:640	1.063	1.200	113%
	1:25	5.092	N/A	N/A
	1:50	2.546	2.596	102%
	1:100	1.273	1.387	109%
	1:200	0.637	0.750	118%
	1:400	0.318	0.353	111%

5. 特異性

本キットに使用している抗体はヒトMBPに特異的であり、ウシMBP 20 ng/mLに反応しない事を確認しています。

6. 共存物質の影響

共存物質の存在下でMBP濃度を測定しても、±10%以内の濃度を示しました。

Interferent	Interferent Dose	Sample MBP (ng/mL)	Dosed Sample MBP (ng/mL)	MBP Difference (ng/mL)	% Difference to Reference
Hemoglobin	5 mg/mL	2.51	2.4	-0.11	-4.4
	2.5 mg/mL	2.61	2.54	-0.07	-2.8
	1 mg/mL	2.62	2.63	0.01	0.4
	0.1 mg/mL	2.73	2.63	-0.1	-3.4
Biotin	1200 ng/mL	2.28	2.25	-0.03	-1.5
	600 ng/mL	2.47	2.56	0.09	3.8
	200 ng/mL	2.67	2.66	-0.01	-0.4
Intralipids	20 mg/mL	2.54	2.58	0.04	1.8
	10 mg/mL	2.63	2.70	0.07	2.7
Bilirubin	0.66 mg/mL	2.64	2.59	-0.05	-2.1
	0.2 mg/mL	2.61	2.65	0.04	1.6

【References】

1. Eylar EH, Brostoff S, Hashim G, Caccam J, Burnett P: Basic A1 protein of the myelin membrane: the complete amino acid sequence. J Biol Chem 246:5770-5784, 1971.
2. Whitaker JN: Immunochemical comparisons among myelin basic proteins. Comp Biochem Physiol 59B: 299-306, 1978.
3. Whitaker JN, Gupta M, Smith OF: Epitopes of immunoreactive myelin basic protein in human cerebrospinal fluid. Ann Neurol 20:329-336, 1986.
4. Whitaker JN, Herman PK: Human myelin basic protein peptide 69-89; immunochemical features and use in immunoassays of cerebrospinal fluid. J Neuroimmunol 19:47-57, 1988.
5. HHS Publication, 5th ed., 2007. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Available <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5>
6. DHHS (NIOSH) Publication No. 78-127, August 1976. Current Intelligence Bulletin 13 - Explosive Azide Hazard. Available <http://www.cdc.gov/niosh>.
7. Kricka L. Interferences in immunoassays – still a threat. Clin Chem 2000; 46: 1037-1038.

【問い合わせ先】

株式会社TKResearch
info@tkresearch.co.jp

MBP ELISA

【製造販売元】

Ansh Labs

445 Medical Center Blvd.
Webster, TX 77598-4217 U.S.A.