

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。

【全般的な注意】

本ELISAキットは、血清、血漿その他サンプル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。

- 1.本キットは、サンプル中のヒト MBP を測定するキットであり、それ以外の目的に使用しないでください。
- 2.使用する際には、使用説明書をよく読んでください。
- 3.使用する機器の添付文書及び取扱い説明書をよく読んでから使用してください。

【形状・構造等（キットの構成）】

1ヶ月以内に使用する場合は、2 - 8℃で保管できるが、長期保管の場合はそれぞれ下記の条件に従って保管してください。

長期保管：冷凍（-20℃以下）、*1 遮光

構成試薬名	容量	成分名等
① 抗体プレート Micro ELISA Plate (Dismountable)	96ウェル x 1 枚	抗ヒト MBP 抗体 固相化プレート
② 標準液 (1000 pg) Reference Standard	2 本	ヒト MBP ほか
③ 2 次抗体原液 (x 100) Concentrated Biotinylated Detection Ab (100x)	120µL x 1 本	ビオチン標識抗ヒト MBP 抗体ほか
④ 酵素標識streptavidin原液 (x 100) *1 Concentrated HRP Conjugate (100x)	120µL x 1本	西洋ワサビペルオキシダーゼ標識streptavidinほか

長期保管：冷蔵（2 - 8℃）、*1 遮光

構成試薬名	容量	成分名等
⑤ サンプル希釈液 Reference Standard & Sample Diluent	20 mL x 1本	緩衝液ほか
⑥ 2 次抗体希釈液 Biotinylated Detection Ab Diluent	14 mL x 1本	緩衝液ほか
⑦ HRP-ストレプトアビジン希釈 液 HRP Conjugate Diluent	14 mL x 1本	緩衝液ほか
⑧ 洗浄液原液 (x 25) Concentrated Wash Buffer (25x)	30 mL x 1本	緩衝液ほか
⑨ 基質液 *1 Substrate Reagent	10 mL x 1本	3, 3', 5, 5'-テトラメ チルベンジジンほか

長期保管：室温

構成試薬名	容量	成分名等
⑩ 反応停止液 Stop Solution	10 mL x 1本	硫酸ほか
⑪ プレートシール Plate Sealer		

注意：蒸発やコンタミネーションを防ぐために、全ての試薬ボトルの蓋は確実に締めてください。

ボトルに入っている液量は表示の液量より多くなっていますので、希釈の際は必要量を分取してください。

【使用目的】

血清、血漿その他サンプル中のヒトMBPの定量

【測定原理】

本キットは、ELISA 法を原理としてヒトMBP を測定します。測定原理概要を図 1 に示します。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）、さらに西洋ワサビペルオキシダーゼ（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 における吸光度を測定します。標準液の吸光度より標準曲線を求め、検体中のヒトMBP 濃度を算出します。



図 1 測定原理 概要

【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ザブルゴム手袋、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) 新しく開封した抗体プレートに水滴様の物質が付着している場合がございますが、試験結果には影響を及ぼさないの
で、そのままご使用ください。また、未使用のウェルは、アルミ袋に戻し前述の保管条件で保管いただけます。

4) 溶解した標準液や、希釈した 2 次抗体溶液、酵素標識ストレプトアビジン溶液は用事調製となりますので、再利用しないでください。

5) マイクロプレートリーダーは、吸光度が0-3.5の範囲で測定でき、450±10 nm が測定できる機器をご使用ください。ご使用に当たっては機器の取扱説明書をよく読み、測定
の 15 分前には電源を入れてください。

6) 製造番号の異なるキット中の構成試薬を組み合わせ
て使用しないでください。

7) 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。

8) 使用期限を過ぎたキットは使用しないで下さい。

■ 検体に関して

1) 採血容器は再利用せず、エンドキシンフリーの製品をご
使用ください。溶血や脂質を多く含む検体はELISA測定
に適さない場合があります。

2) 検体は採取後2-8℃に保管し、7日以内に測定して
ください。また、長期保管する場合は、

-20℃であれば1ヶ月、-80℃であれば3か月以内に測定
してください。検体の凍結融解は避けてください。緩やかに融
解した後は、遠心分離で沈殿物を除いてから使用してくだ
さい。(≤3 months).

3) 測定値が検量線範囲に入らない場合は、適切な希釈
倍率で希釈してから測定してください。

4) 本使用説明書に記載されていない検体を用いる場合
は、事前に測定できることを検証してください。

5) 細胞溶解液等を使用した検体を測定する場合、緩衝
液に含まれる化学物質の影響でばらつきが大きくなる場合
があります。

6) リコンビナントタンパク質は、固相抗体、二次抗体の認
識配列の不一致から検出できない場合があります。

【検体調製】

血清：採血後室温で 1 時間（もしくは 2-8℃で一晩）静置し、遠心分離（1000 x g, 20 分間, 2-8℃）してください。遠心分離後の上清を測定にご使用ください。

血漿：EDTA-2Na採血管を用いて採血し、30分以内に遠心分離（1000 x g, 15 分間, 2-8℃）してください。遠心分離後の上清を測定にご使用ください。

組織抽出物：組織からの抽出方法の詳細は文献等をご確認ください。一般的に、溶血が測定結果に影響を及ぼす事が多いため、組織を細かく切断した後、あらかじめ氷冷したPBS(0.01M, pH=7.4)でよく洗浄してください。洗浄後、組織重量を測定し、PBSに懸濁（組織重量(g)：PBS (mL) = 1：9）し、ガラスホモジナイザー等を用いて組織を破碎してください。十分破碎した後に、超音波破碎もしくは凍結融解法を用いて、さらに細胞を破碎してください。破碎液は遠心分離（5000 x g, 5-10 分間, 2-8℃）してください。遠心分離後の上清を測定にご使用ください。

培養細胞：接着細胞は、PBSで洗浄し、培地を除いたのち、トリプシン処理などで剥離させてください。細胞を遠心分離（1000 x g, 5 分間, 2-8℃）で回収後、氷冷したPBSで3回洗浄してください。1×10⁶ 個の細胞を 150-250μLの氷冷したPBSで懸濁し、超音波破碎もしくは凍結融解法により細胞を破碎してください。破碎液は遠心分離（1500 x g, 10 分間, 2-8℃）してください。遠心分離後の上清を測定にご使用ください。

培養上清やその他の溶液：破碎液は遠心分離（1000 x g, 20 分間, 2-8℃）してください。遠心分離後の上清を測定にご使用ください。

【測定方法】

1. 必要器具、機器等

- (1) メスシリンダー
- (2) メスピペット
- (3) マイクロピペット及びチップ
- (4) ウォーターバス
- (5) プレートウォッシャー

(6) インキュベーター

(7) ペーパータオル

(8) プレートリーダー（測定波長：450 nm）

(9) マイクロチューブ等（容量1.5 mL 以上の密閉可能な容器）

2. 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) 洗浄液

洗浄用原液全量（30 mL）に精製水を 720 mL の割合で混和し調製します。洗浄用原液に結晶が析出している場合は、40℃のウォーターバスで緩やかに攪拌し、溶解後に調製します。

(2) 標準液

標準液を10000 x g で 1 分間遠心した後、サンプル希釈液 1.0 mLを加え、複数回転倒混和しながら、室温で 10 分間溶解させます。完全に溶解した後、ピペティングで全体をよく攪拌します。この溶解液を 1000 pg/mLとして以下の試験に使用してください。（サンプル希釈液を添加し、1-2分後に、ボルテックスミキサーで軽く攪拌して溶解しても良いですが、泡が発生した場合は、低速の遠心分離で泡を除去した後に以下の試験に使用してください。）

溶解後は、以下の図のように段階希釈を行い、1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 0 pg/mLの標準液を調製してください。

段階希釈方法：7本のマイクロチューブを良いし、500μLのサンプル希釈液をそれぞれ添加します。1000 pg/mLの標準液 500μLを添加し、混合することで500 pg/mLの標準液を調製します。以下同様に 2 倍希釈を行います。なお 0 ng/mL 標準液はサンプル希釈液を使用します。

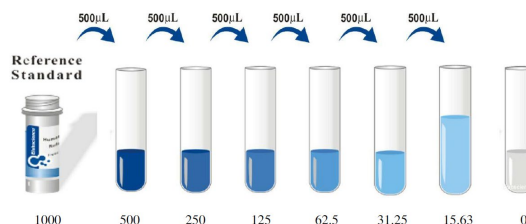


図2 標準液の希釈方法

(3) 2次抗体溶液

まず、測定に必要な2次抗体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。2次抗体原液(x100)を800 x gで1分間遠心した後、2次抗体希釈液で100倍希釈してください(2次抗体原液(x100) : 2次抗体希釈液 = 1 : 99)

(4) 酵素標識ストレプトアビジン溶液

まず、測定に必要な酵素標識ストレプトアビジン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。

酵素標識ストレプトアビジン原液(x100)を800 x gで1分間遠心した後、HRP-ストレプトアビジン希釈液で100倍希釈してください(酵素標識ストレプトアビジン原液(x100) : HRP-ストレプトアビジン希釈液 = 1 : 99)

3. 操作方法

操作方法の概略を図3に示しました。

標準液及び検体は、2重測定をお勧めします。

- (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) プレートシールで抗体プレートをカバーし、37℃で90分間静置し、反応させます。〈第1反応〉
- (6) 液ハネ等しないように注意して抗体プレートからプレートシールを取り除き、各ウェルの液を完全に除去します。続いて、直ちに調製した2次抗体液を各ウェルに100 μLずつ加えます。洗浄は行わないでください。
- (7) プレートシールで抗体プレートをカバーし、37℃で60分間静置し、反応させます。〈第2反応〉
- (8) 液ハネ等しないように注意して抗体プレートからプレートシールを取り除き、各ウェルの液を完全に除去します。続いて、洗浄液を抗体プレートの各ウェルに350 μLずつ加え1分間静置した後、プレートウォッシャーでウェルの液を完

全に吸引除去します。この洗浄と吸引の操作をさらに3回繰り返した後、抗体プレートを逆さにしてペーパータオル等に軽く叩きつけ、ウェル内に残った洗浄液を除去します。洗浄後は直ちに次の工程を実施し、乾燥させないでください。

(9) 調製した酵素標識ストレプトアビジン溶液を各ウェルに100 μLずつ加えます。プレートシールで抗体プレートをカバーし、37℃で30分間静置し、反応させます。〈第3反応〉

(10) (8)と同様にウェルを5回洗浄します。

(11) 基質液を抗体プレートの各ウェルに90 μLずつ加え、新しいプレートシールで抗体プレートをカバーし、37℃で15分間静置し、反応させます。〈発色反応〉

プレートは遮光してください。発色度合いによって発色反応時間は適切に設定していただけますが、30分を超えないようにしてください。また、吸光度測定の前には、プレートリーダーの電源を入れることを推奨しております。

(12) 液ハネ等しないように注意して抗体プレートからプレートシールを取り除き、反応停止液を抗体プレートの各ウェルに50 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650 nm)における吸光度を測定します。

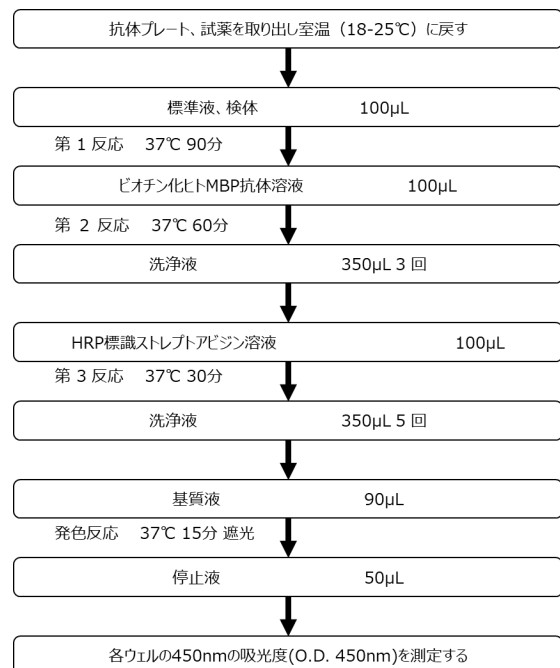


図3 測定方法の概略

4. 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ます。適切な回帰式を用い、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。

pg/mL	O.D.	Corrected O.D.
1000	2.42	2.332
500	1.689	1.601
250	0.927	0.839
125	0.478	0.39
62.5	0.297	0.209
31.25	0.19	0.102
15.63	0.14	0.052
0	0.088	-

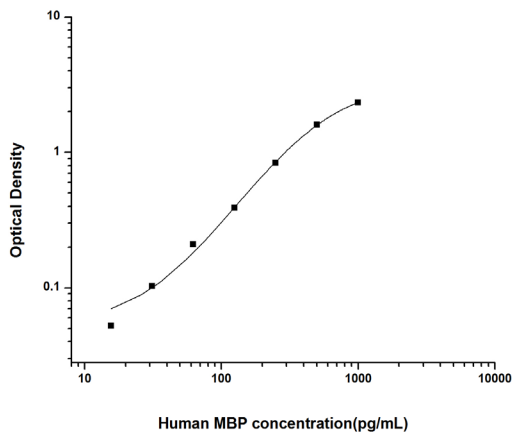


図4 標準曲線 例

【性能】

1. 最低検出感度

本キットの最低検出感度は、9.38 pg/mLです。

2. 定量範囲

本キットの定量範囲は、15.63 – 1000 pg/mLです。

3. 特異性

他のアナログとの間に交差反応性は認められませんでした。

4. 再現性

3種類の管理検体を測定し、CV<10%の値を示します。

Intra-assay Precision：3種類の管理検体を1プレートでそれぞれ20回測定しました。

Sample	1	2	3
n	20	20	20
平均値 (pg/mL)	53.45	148.17	412.6
標準偏差	2.89	8.48	17.29
CV (%)	5.41	5.72	4.19

Inter-assay Precision: 3種類の管理検体を1プレートでそれぞれ20回、3プレートで測定しました。

Sample	1	2	3
n	20	20	20
平均値 (pg/mL)	55.17	140.51	436.13
標準偏差	3.4	7.52	17.01
CV (%)	6.16	5.35	3.9

5. 添加回収試験

異なる3種類の濃度のMBPを各検体に添加し測定しました。

Sample Type	Range (%)	Recovery (%)
血清 (n=8)	87-101	93
EDTA血漿(n=8)	90-103	95
細胞培養上清 (n=8)	88-99	94

6. 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。

		血清 (n=5)	EDTA血漿 (n=5)	細胞培養上清 (n=5)
1:2	Range (%)	97-111	95-113	91-106
	Average (%)	102	103	97
1:4	Range (%)	93-104	80-92	87-98
	Average (%)	98	85	92
1:8	Range (%)	91-103	80-91	88-100
	Average (%)	98	86	94
1:16	Range (%)	90-102	87-98	86-98
	Average (%)	96	93	93

【問い合わせ先】

株式会社TKResearch
info@tkresearch.co.jp

Declaration

1. Limited by current conditions and scientific technology, we can't conduct comprehensive identification and analysis on all the raw material provided. So there might be some qualitative and technical risks for users using the kit.
2. This assay is designed to eliminate interference by factors present in biological samples. Until all factors have been tested in the ELISA immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded.
3. The final experimental results will be closely related to the validity of products, operational skills of the operators, the experimental environments and so on. We are only responsible for the kit itself, but not for the samples consumed during the assay. The users should calculate the possible amount of the samples used in the whole test. Please reserve sufficient samples in advance.
4. To get the best results, please only use the reagents supplied by the manufacturer and strictly comply with the instructions.
5. Incorrect results may occur because of incorrect operations during the reagents preparation and loading, as well as incorrect parameter settings of the Micro-plate reader. Please read the instructions carefully and adjust the instrument prior to the experiment.
6. Even the same operator might get different results in two separate experiments. In order to get reproducible results, the operation of every step in the assay should be controlled.
7. Every kit has strictly passed QC test. However, results from end users might be inconsistent with our data due to some

variables such as transportation conditions, different lab equipment, and so on. Intra-assay variance among kits from different batches might arise from the above reasons too.

8. Kits from different manufacturers or other methods for testing the same analyte could bring out inconsistent results, since we haven't compared our products with those from other manufacturers.

9. The kit is designed for research use only, we will not be responsible for any issues if the kit is applied in clinical diagnosis or any other related procedures.

Human MBP(Myelin Basic Protein) ELISA Kit

【製造販売元】

Elabscience®

Phone: 240-252-7368(USA)

240-252-7376(USA)

Email: techsupport@elabscience.com

Website: www.elabscience.com