

製品コード MK133

研究用

Takara

Mouse Albumin EIA Kit

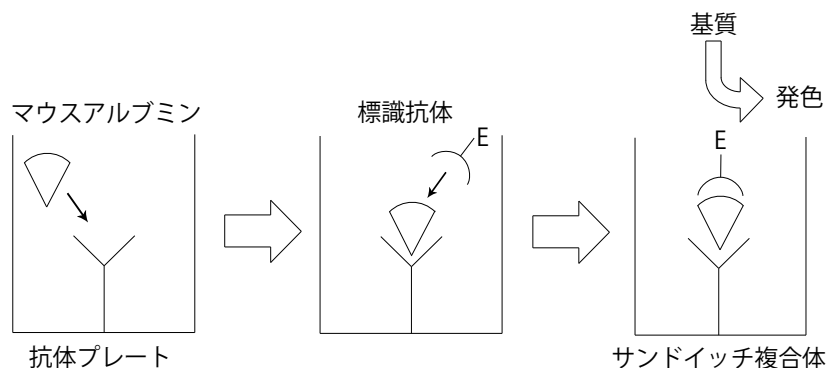
説明書

v201509Da

アルブミンは血中に存在する分子量約 66,000 のタンパク質で、非常に高濃度に存在しています。マウス胚の発生過程では、初期の肝臓原基組織の構築は胎生 9 日目ごろから始まり、胎生 13 ~ 17 日にかけて肝実質細胞と周囲の結合組織および関連の血管系組織（門脈、動脈、静脈、類洞）が形づくられていきます。アルブミンはその中でも肝臓という内胚葉組織の成熟分化マーカーとされており、胎生期までは AFP (α -フェトプロテイン) という糖タンパク質が肝実質細胞から産生されて血清中の主要タンパク質となっていますが、新生（誕生）が近づくとともに AFP 産生からアルブミン産生へとその割合が次第に逆転していきます。

本キットは、マウスアルブミンを抗原として取得した 2 種のラットモノクローナル抗体を用いて構築したサンドイッチタイプのマウスアルブミン定量キットです。*in vitro* および *in vivo* でのマウスアルブミンの簡易定量が可能です。また、モノクローナル抗体を使用しており、他の動物種のアルブミンとは差反応しませんので特異性に優れています。

I. 測定原理



II. キットの内容 (96 回用)

- | | |
|--|-----------|
| (1) Antibody Coated Microtiter plate
抗マウスアルブミンモノクローナル抗体コーティングプレート
(96 well : 8 well × 12 strips) | 1 plate |
| (2) Antibody-POD Conjugate (凍結乾燥品)
ペルオキシダーゼ標識抗マウスアルブミンモノクローナル抗体 | 11 ml 用 |
| (3) Standard Mouse Albumin (凍結乾燥品)
血漿由来マウスアルブミン 640 ng | 1 ml 用 |
| (4) Sample Diluent
25% ブロックエース含有 PBS 含防腐剤 | 11 ml × 2 |
| (5) Substrate Solution (TMBZ)
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン溶液 | 12 ml |

III. 保存 4℃

IV. キット以外に必要な試薬および器具 (主なもの)

- ・ Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)
洗浄液成分 (10 × PBS; 50 ml × 5 本、Tween 20; 3 ml) と反応停止液 (60 ml) のセットです。
 - ※ 本品は、1 N 硫酸を含まないペルオキシダーゼ反応停止液です。
 - ※ 反応停止液として 1 N 硫酸も使用できます。1 N 硫酸の取扱いには十分にご注意ください。
- ・ ピペット、マイクロピペットおよびチップ
- ・ マイクロプレートリーダー (450 nm 設定で吸光度 3.5 まで測定可能なもの)
- ・ 蒸留水

V. 使用目的

マウスの血液中、尿中および細胞培養上清・細胞抽出液中のアルブミン量の測定

※本キットは研究用です。人や動物の診断目的には使用できません。

VI. 使用方法

1. 検体

- ・ マウス血漿、血清、尿、培養細胞抽出液、細胞培養上清等を用いる。
- ・ マウス抗原に反応する。他動物に交差反応しない。
- ・ 検体は 2 ~ 10°C に保存し、12 時間を過ぎて測定する場合は凍結保存する。
- ・ 血液サンプル、腹水サンプルの場合は、少なくとも 4,000 倍以上希釈して測定する。希釈を行う場合、まず 100 倍希釈液を作製し、その希釈液の一部をさらに 40 倍希釈するなどの 2 段階希釈で希釈液を作製する。
- ・ 尿サンプルの場合は、原液 ~ 10 倍希釈で測定するとよい。
- ・ サンプルの希釈には検体希釈液 [(4) Sample Diluent] を用いる。

2. 試薬調製

- ・ 抗体プレート [(1) Antibody Coated Microtiterplate]
使用前に室温に戻してから開封する。
- ・ 標識抗体液
(2) Antibody-POD Conjugate を蒸留水 11 ml で溶解する。
溶解後 1 週間は 4°C で安定である。それ以上保存する場合には -20°C で凍結する。
この状態で 1 カ月安定である。ただし、凍結融解は一度までにとどめる。
- ・ マウスアルブミン標準液
(3) Standard Mouse Albumin に蒸留水を 1 ml 加え溶解し、マウスアルブミン標準液 (640 ng/ml) を調製する。これを (4) Sample Diluent で用時段階希釈して、640、320、160、80、40、20、10 ng/ml の各濃度の標準液を調製しておく。ゼロ濃度は (4) Sample Diluent を用いる。マウスアルブミン標準液 (640 ng/ml) は 4°C 保存では 1 週間安定、-20°C 保存では 1 カ月安定である。

-
- 基質液 [(5) Substrate Solution (TMBZ)]
反応に用いる前に室温にもどし、そのまま使用する。
使用前に基質液が濃い青色に変色していないか確認する。金属イオンと反応すると呈色するおそれがあるので、特に水道水が混入しないよう注意する。数回に分けて使用する場合はあらかじめ必要量を取り分けるようにする。
 - 反応停止液 (Stop Solution)
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) の Stop Solution をそのまま用いる。
※ 粘度の高い溶液であるため投入後、プレートミキサー等で十分に攪拌してください。
 - 洗浄用 PBS
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) の 10 × PBS 1 本 (50 ml) を蒸留水で 500 ml に希釈し、十分に混合後、洗浄用バッファー (PBS) として使用する。

3. 操作法

測定は二重測定で行う。

キット中の各試薬ならびにサンプルは使用前に室温にもどし、泡立てないように混和し、液を均一にしてから用いる。

1. 各濃度のマウスアルブミン標準液およびサンプルを 100 μ l ずつマイクロピペットで抗体プレートの各ウェルに 2 連ずつ加え、室温 (20 ~ 30°C) で 1 時間反応させる。(第一反応)
※ 標準液およびサンプルはあらかじめ別の 96 穴プレート等を利用して用意し、8 連ピペットなどですみやかに (5 分以内に) 投入する。プレート内の測定値の信頼を高めるためにも、1 列目と 12 列目とに標準液の希釈系列をおくとよい。
2. 反応液を捨て、PBS で 3 回洗浄後、標識抗体液を 100 μ l ずつ 8 連ピペットで各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30°C) で 1 時間反応させる。(第二反応)
3. 反応液を捨て、PBS で 4 回洗浄後、(5) Substrate Solution (TMBZ) を 100 μ l ずつ 8 連ピペットで各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30°C) で 15 分反応させる。(第三反応)
4. 反応停止液 (Stop Solution) * を 100 μ l ずつ、(5) Substrate Solution (TMBZ) を入れた順番に各ウェルに加え、反応を停止させた後よく混和する。
* : 反応停止液 (Stop Solution) は粘度の高い溶液であるため、添加後プレートミキサー等で十分混合してください。
5. 蒸留水を対照としてゼロ調整し、波長 450 nm で吸光度を測定する。発色は反応停止後 1 時間までは安定である。
6. グラフ用紙の横軸に各標準液の濃度を、縦軸に対応する吸光度をプロットして標準曲線を作成し、検体の吸光度から対応するマウスアルブミン濃度を読み取る。

<添加回収試験>

さまざまな濃度の検体サンプルを等量ずつ混合し、予想される理論値と実測値から回収率を調べた。

サンプル A	サンプル B	理論値 (A+B)/2	実測値	添加回収率 (%)
318.7	124.6	221.7	213.9	96.5
318.7	68.5	193.6	229.4	118.5
124.6	68.5	96.6	96.7	100.1
320.0	160.0	240.0	240.3	100.1
160.0	80.0	120.0	108.5	90.4
80.0	318.7	199.4	186.2	93.4
40.0	124.6	82.3	73.8	89.6

(単位：ng/ml)

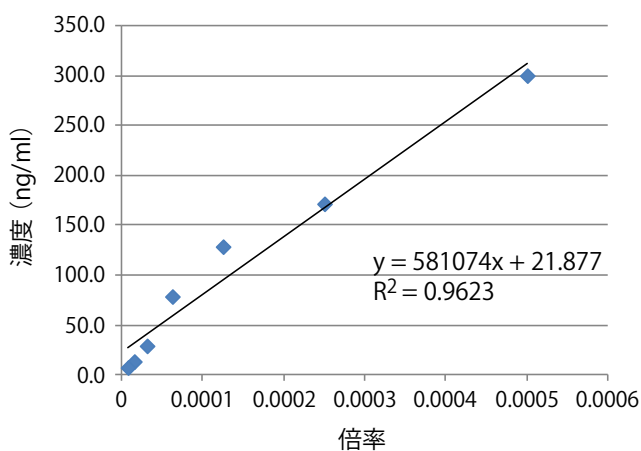
結果：89.6～118.5%の回収率であった。

VIII. 測定例

1. サンプルの希釈曲線

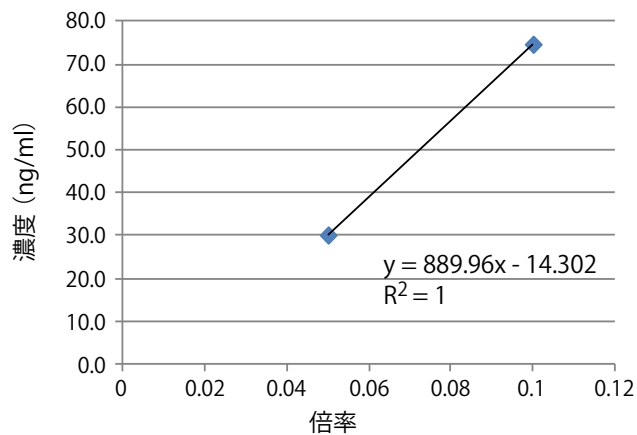
<マウスのプール血清サンプルの測定例>

倍率		マウス血清アルブミン (ng/ml)
× 2,000	(0.0005)	300.5
× 4,000	(0.00025)	171.8
× 8,000	(0.000125)	128.8
× 16,000	(0.0000625)	78.7
× 32,000	(0.0000313)	29.1
× 64,000	(0.0000156)	13.4
× 128,000	(0.0000078)	7.4



<マウス尿サンプルの測定例>

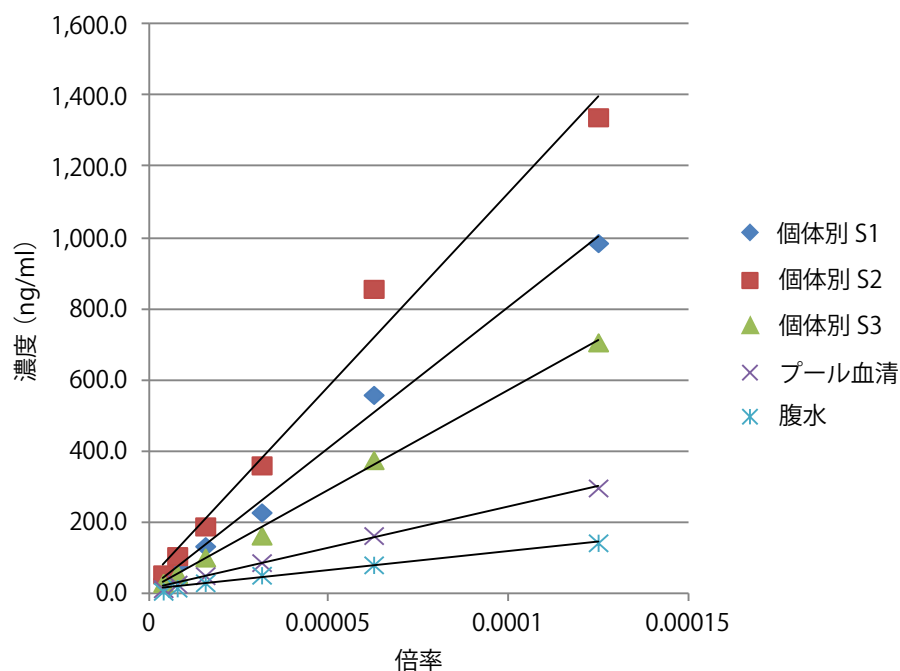
倍率		マウス尿アルブミン (ng/ml)
× 10	(0.1)	74.7
× 20	(0.05)	30.2



<個体別血清および腹水の測定例>

個体別マウス血清、プールしたマウス血清および腹水を、それぞれ2,000倍から希釈系列を作製して測定した。8,000倍希釈から希釈曲線をグラフ化した。

		C57BL6			ICR 8W	Scid
倍率		個体別 S1 (ng/ml)	個体別 S2 (ng/ml)	個体別 S3 (ng/ml)	プール血清 (ng/ml)	腹水 (ng/ml)
× 2,000	(0.0005)	1047.9	1152.5	990.5	619.1	292.9
× 4,000	(0.00025)	1395.9	1370.5	1012.1	464.2	226.7
× 8,000	(0.000125)	984.6	1338.6	705.3	295.5	141.2
× 16,000	(0.0000625)	557.4	855.8	374.0	161.5	79.2
× 32,000	(0.0000313)	226.6	359.1	161.7	85.4	49.9
× 64,000	(0.0000156)	131.7	187.3	99.9	48.7	28.6
× 128,000	(0.0000078)	75.7	103.7	53.2	25.0	13.5
× 256,000	(0.0000039)	40.4	52.3	28.3	12.0	4.6



X. 関連製品

Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)
Personal Microplate Washer (製品コード MK950)
Anti-Mouse Albumin, Monoclonal (Clone M-Alb 151-1) (製品コード M234)
Human Albumin EIA Kit (製品コード MK132)

XI. 使用上の注意

1. ロット番号の異なるキットおよび試薬を混ぜて使用しないでください。
2. 保存もしくは反応中に試薬を強い光に当てないでください。
3. (5) Substrate Solution (TMBZ) および反応停止液 (Stop solution) に用いるピペット等は金属が使われていないものを用いてください。
4. (5) Substrate Solution (TMBZ) や反応停止液 (Stop solution) は手や粘膜につかないようご注意ください。
5. 着色した (5) Substrate Solution (TMBZ) は使用しないでください。
6. 各反応は時間、温度の影響を受けるので測定ごとに標準曲線を作成してください。
7. 血液検体の取り扱いには十分注意してください。

XII. 注意

- ・本製品は、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

TakaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社