

製品コード MK151

研究用

TAKARA

**Human Alpha Fetoprotein
(AFP) EIA Kit**

説明書

v201607Da

肝臓は一般的に解毒や糖および脂肪代謝などの生体内の代謝機能を有する臓器として知られています。また、近年では新たに発生段階での胎児期の肝臓は、実は重要な造血器官であり、特に胎生初期において骨髄が形成されるまでの間、造血幹細胞の保有・維持と血球細胞の産生を担っていることがわかってきました。マウスの発生段階を例にとると、胎生初期（胎齢 E9 頃）より、肝臓細胞特有のタンパク質発現として未分化初期マーカーの α フェトプロテインが発現し、やがて機能を持ったアルブミンなどが誘導されます。さらに出生に近づくにつれて、誕生直後から必要となるエネルギーの源であるグリコーゲンを蓄積して、必要に応じて各器官に供給するための様々な代謝酵素が発現するようになります。

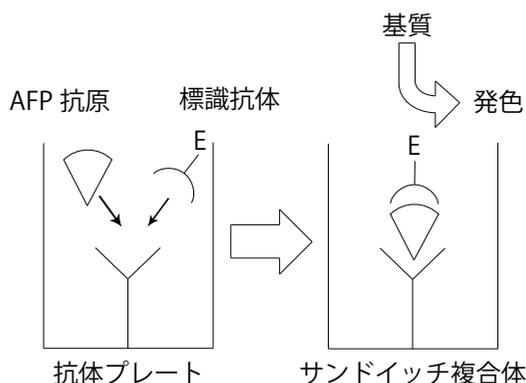
α フェトプロテイン (AFP) は、胎児期に肝臓や卵黄嚢で産生される分子量約 70,000、アミノ酸数 590 個から成るタンパク質で 1 本の糖鎖を持っています。胎児期に造血機能を獲得するため体内につくられていると考えられますが、誕生と共にアルブミンがその機能をひきつぐことから、正常な成人ではほとんど血中で検出されません。その一方、急性肝炎・肝硬変・原発性の肝癌で血中濃度が急上昇することから、肝臓病の早期発見・特異的診断法に役立つ腫瘍マーカーの代表格として、CA19-9 (膵癌・胆管癌の検出にすぐれる糖鎖腫瘍抗原) や CEA (癌胎児性抗原として消化器系癌マーカー) とともに古くから注目されてきました。

近年、再生医療研究分野において、多能性幹細胞 (iPS 細胞・ES 細胞) からさまざまな臓器への分化が効率よく行われるようになってきました。この中で、未分化な幹細胞から高度に機能を有する肝臓細胞への分化を誘導する上で、 α フェトプロテイン測定とアルブミン測定とを並行して行うことで、肝臓細胞の分化ステージと細胞機能の獲得状態をリアルタイムに反映できる可能性があります。

本製品は、血清中および肝臓への分化過程で細胞培養上清に分泌されるヒト α フェトプロテインを特異的かつ高感度に測定できるモノクローナル抗体を用いた定量キットです。ウシ抗原への交差がないためウシ胎児血清の有無に関係なく測定ができ、細胞分化初期の低レベル量の分泌も培養上清をダイレクトに用いて検出可能です。

I. 測定原理

2 抗体 1 ステップ ELISA



II. キットの内容

(1) Antibody Coated Microtiterplate 抗ヒト AFP モノクローナル抗体コーティングプレート (96 ウェル：8 ウェル× 12 strips)	1 Plate
(2) Antibody-POD Conjugate (凍結乾燥品) ペルオキシダーゼ標識抗ヒト AFP モノクローナル抗体	11 ml 用
(3) Standard (凍結乾燥品) 精製 Human AFP (臍帯血由来精製市販品) 160 ng	1 ml 用
(4) Sample Diluent ブロックエース粉末含有 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. キット以外に必要な試薬や器具 (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、1N 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 1N 硫酸も使用できます。
1N 硫酸の取扱いには充分にご注意ください。
<ご注意> 1N 硫酸は腐食性があり、皮膚に接触するとただれ等を起こすことがあります。
手や粘膜についた場合は、ただちに多量の水で洗い流し、医師の指示に従ってください。
- 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)

IV. 保存 4℃

V. 使用目的

- ヒト血清または体液中のヒト α フェトプロテインを含有する検体の測定
- 肝分化細胞培養上清中のヒト α フェトプロテインの測定など細胞分化のモニタリングに有用
- 幼若期のブタ α フェトプロテインの測定も可能

注：本キットは研究用です。診断目的には使用できません。

VI. 使用方法

1. 検体

- 検体は 2～10℃に保存し、12 時間を過ぎて測定する場合は凍結保存する。
- 検体の希釈はあらかじめ予備検討が必要。高値が予想される検体を含む場合は (4) Sample Diluent を用いて希釈する。
- 正常血清検体の場合、標準では原液～2 倍程度希釈して用いる。
- 1 ステップ法のため、血漿サンプルを用いると標識抗体等が抗凝固剤の影響を受ける恐れがあるので、血清サンプルの使用が望ましい。
- 分化細胞の培養上清は、細胞の分化ステージ・細胞数により産生レベルが大きく変動するので、測定倍率について事前の予備検討が必要である。
- ウシ抗原には交差しないので血清培地成分の影響を受けずに細胞上清を直接測定できる。

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℃で安定である。それ以上保存する場合は -20℃で凍結保存する。
この状態で 1 ヶ月安定である。ただし、凍結融解は一度までにとどめる。
- Human AFP 標準液
(3) Standard に蒸留水を 1 ml 加えて溶解し、Human AFP 標準液 (160 ng/ml) を調製する。
これを (4) Sample Diluent で用時段階希釈して、80、40、20、10、5、2.5 ng/ml の各濃度の標準液を調製しておく。0 濃度は、(4) Sample Diluent を用いる。溶解した Human AFP 標準液 (160 ng/ml) は 4℃保存で 1 週間、-20℃保存では 1 ヶ月安定である。
- 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。
- 洗浄用 PBS
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid の 10 × PBS を蒸留水で 10 倍希釈して用いる。
本キットで 96 ウェル分の反応を行う場合、300 ml 程度の洗浄液が必要である。

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. 標識抗体液を 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加える。続いて、あらかじめ調製した各濃度の Human AFP 標準液および検体を 50 μ l ずつマイクロピペットで 2 連ずつ各ウェルに加え、5 秒間プレートミキサーで混合する。溶液の蒸発を防止するためにフィルムで包み、室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で 1 時間反応させる。
サンプルの投入は、あらかじめ別の 96 穴プレート等を利用して用意し、8 連ピペットなどで速やかに (5 分以内) 抗体プレートに投入する。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。37 $^{\circ}$ C の加温は抗原性をそこなう恐れがあるので、反応は室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で行う。(第一反応)
 2. 反応液を捨て、洗浄用 PBS で各ウェルを 5 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 $^{\circ}$ C) で 15 分間をめぐりに反応させる。(第二反応)
 3. 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。
 4. 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。
 5. 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 Human AFP 濃度を読み取る。

2. 再現性

<同時再現性試験>

3種類の濃度のAFP分泌細胞由来の培養上清をコントロールサンプルとして再現性試験を実施した。

検体 (n=8)	平均値 (ng/ml)	標準偏差 (ng/ml)	CV (%)
コントロール A	66.9	6.489	9.7
コントロール B	31.3	1.252	4.0
コントロール C	12.8	0.704	5.5

<日差再現性試験>

3日間にわたり3種類の濃度コントロールの定量を行い、日差再現性試験を実施した。

検体 (n=3)	平均値 (ng/ml)	標準偏差 (ng/ml)	CV (%)
コントロール A	64.2	1.926	3.0
コントロール B	29.8	1.788	6.0
コントロール C	11.6	1.021	8.8

3. 添加回収試験

様々な濃度の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 (%)
63.21	130.7	96.98	113.89	117.4
63.21	64.2	63.71	61.57	96.6
63.21	32.1	47.64	42.66	89.6
63.21	16.7	39.95	36.03	90.2
63.21	11.6	37.41	31.03	82.9
25.98	130.7	78.36	79.12	100.1
25.98	64.2	45.09	46.42	102.9
25.98	32.1	29.02	39.90	137.5
25.98	16.7	21.33	26.51	124.3
25.98	11.6	18.79	18.33	97.5
8.92	130.7	69.83	74.10	106.1
8.92	64.2	36.56	39.35	107.6
8.92	32.1	20.49	21.15	103.2
8.92	16.7	12.81	14.75	115.2
8.92	11.6	10.27	10.45	101.8

単位：ng/ml

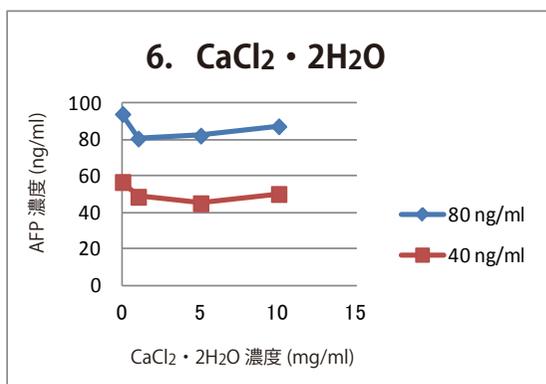
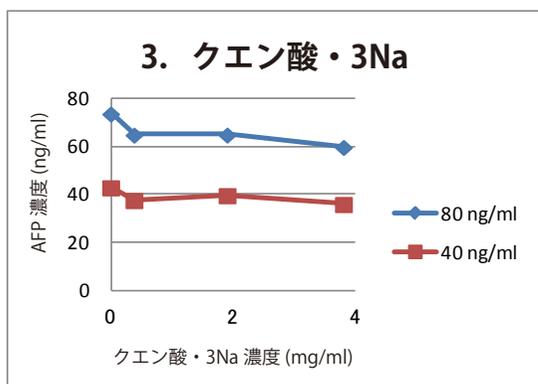
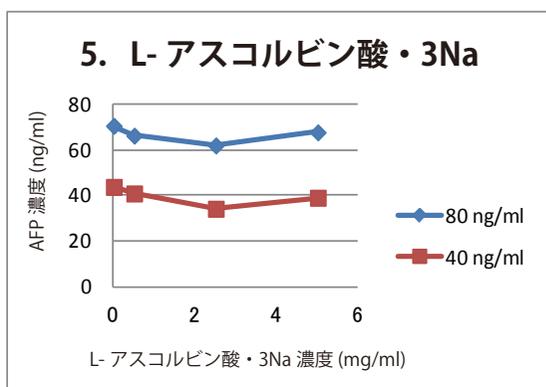
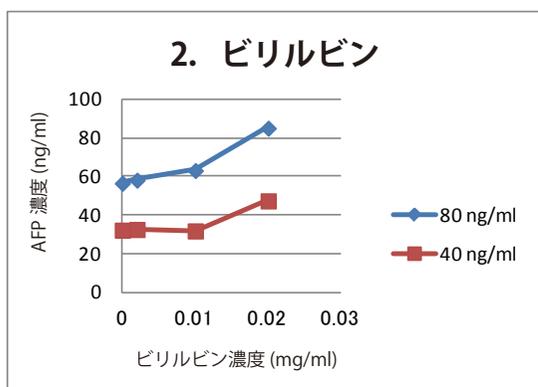
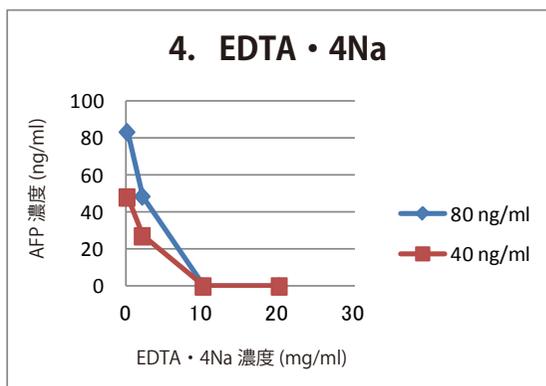
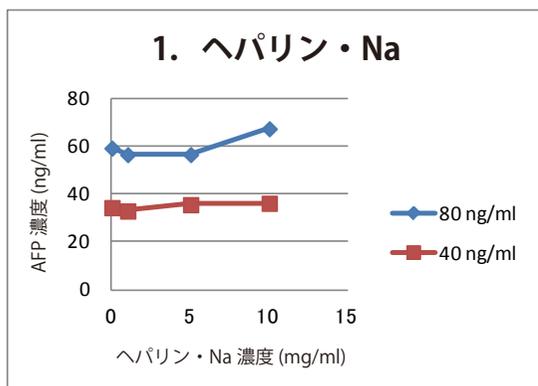
VIII. 測定に関する基本資料

1. 共存物質の影響

2種類の濃度の AFP 標準液 9 容量に対し、供試物質 1 容量を加え反応系に与える影響を見た。

グラフ内の供試物質濃度は終濃度で表されている。

注意：EDTA・4Na キレート剤により測定阻害が生じるので、抗凝固剤としての使用には注意が必要である。



2. サンプルの凍結融解の影響

Human AFP 抗原の凍結融解に対する影響を調べた。コントロールサンプルを用いて -80℃～25℃の凍結融解を連続して8回繰り返したサンプルと、初めて融解したサンプルを同時に定量した。

	凍結融解 8 回後	凍結融解 1 回
サンプル A	64.292	69.708
サンプル B	33.599	31.304
サンプル C	12.908	12.250

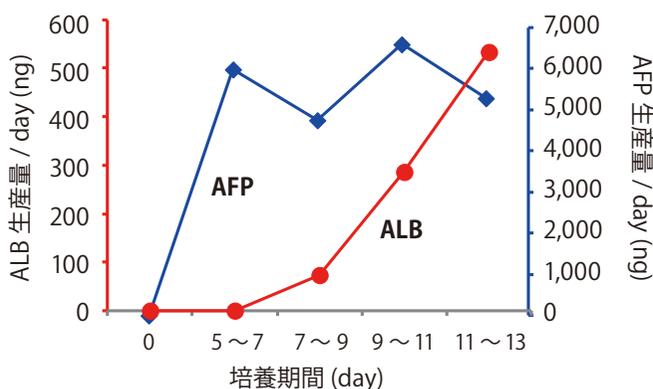
(単位：ng/ml)

結果：8 回程度の凍結融解では変化は見られなかった。

3. 測定例

未分化細胞の肝分化過程で上清中に分泌されたヒト α フェトプロテイン (AFP) とヒトアルブミン (ALB) のモニタリングを実施した。アルブミンの測定は Human Albumin EIA Kit (製品コード MK132) を用いて実施した。

グラフ中、横軸は培養期間、縦軸は各培養期間中 1 日あたりに培養液 1 ml 中に産生された AFP、ALB の総量 (ng) を表す。



結果：肝分化の過程で培養上清への α フェトプロテイン (AFP) とアルブミン (ALB) の分泌が認められた。

4. 各種動物血清との交差反応

各種動物血清の、原液および希釈系列を調製して本キットで測定した。

動物名	交差性
成ブタ	感度以下
マイクロミニブタ 生後 6 か月	感度以下
マイクロミニブタ 生後 10 日	◎ 交差あり 血清濃度値 約 2,000 ng/ml
ウシ胎児血清	× 交差なし

結果：生後 10 日目のマイクロミニブタ血清に確かな交差反応が認められた。ウシへの交差反応は認められない。その他の幼若動物 (生後 3 週間未満) の血清については反応性未確認。

IX. 使用上の注意

1. ロット番号の異なるキットの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あてないでください。
3. (5) Substrate Solution (TMBZ) および 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) および 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. 血液検体の取扱いには充分注意してください。

X. 関連製品

Human Albumin EIA Kit (製品コード MK132)
Monoclonal Antibody to Human Alpha Fetoprotein (製品コード M225)
Monoclonal Antibody to Human Albumin (製品コード M226)
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)
Personal Microplate Washer (製品コード MK950)

< ヒト iPS 細胞由来肝細胞培養キット >

Cellartis® Enhanced hiPS-HEP (from ChiPSC18) Kit (製品コード Y10050)
Cellartis® Enhanced hiPS-HEP (from ChiPSC22) Kit (製品コード Y10056)
Cellartis® Enhanced hiPS-HEP (from ChiPSC12) Kit (製品コード Y10058)

XI. 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。
- Cellartis は Takara Bio Europe AB の登録商標です。その他、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

テクニカルサポートライン

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

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社