

製品コード MK136

研究用

Takara

Human IgG EIA Kit

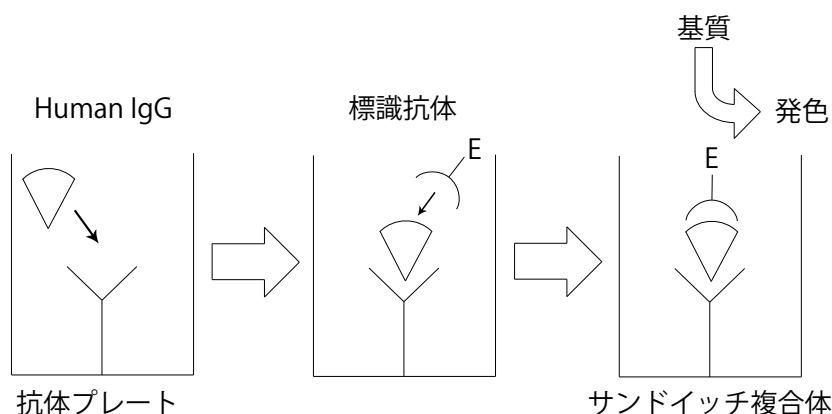
説明書

v202003Da

血漿タンパク質のグロブリンの1つである γ -グロブリンは免疫に関与していることから免疫グロブリン(Ig)と呼ばれ、IgG、IgA、IgM、IgD、IgEの5つの分子型が知られています。このIgの一種であるIgGは、活性化Bリンパ球より分化した形質細胞より産生され、各種の免疫抗体、感染性を失わせる中和抗体、また細菌を捕捉するオプソニン抗体として作用し、リンパ節・脾・骨髄・胸腺・小腸粘膜・気道粘膜などで産生される胎盤通過性の血漿蛋白です。IgGは細菌、ウイルス、薬物、組織抗原などの刺激に対する生体反応を示すので、血中のIgGを測定することにより、抗原刺激に対する生体反応の亢進、IgG産生部位の異常などを知ることができます。IgG高値を示す病態・疾患としては多クローン性高 γ -グロブリン血症、膠原病、無症候性M蛋白血症、慢性感染症、骨髄腫、IgG型多発性骨髄腫などが知られています。またIgG低値を示す病態・疾患としては無・低 γ -グロブリン血症、重症免疫不全症、ネフローゼ症候群などが知られています。

本キットは、Human IgGに特異的なモノクローナル抗体を用いた定量キットです。ヒト血液・体液中のIgG含量の簡易モニタリングなどに使用できます。

I. 測定原理



II. キットの内容

- | | |
|---|-----------|
| (1) Antibody Coated Microtiterplate
抗 Human IgG 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 Human IgG モノクローナル抗体 | 11 ml 用 |
| (3) Standard (凍結乾燥品)
Human IgG Fc region (組換え蛋白質) 640 ng* | 1 ml 用 |
| *：精製 Human IgG の量に換算した重量 | |
| (4) Sample Diluent
25%ブロッカー含有 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セ反応停止液です。
- 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°C

- V. 使用目的** ヒト血液・体液中、Human IgG を含有する検体の Human IgG 量の測定
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°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。
- 検体の希釈は後述する希釈曲線を参考に、高値が予想される検体を含む測定の場合は (4) Sample Diluent を用いて希釈する。
- ヒト血液検体の場合、標準では 10^5 倍以上希釈して用いるとよい。

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には -20℃ 凍結する。
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 IgG 標準液
(3) Standard に蒸留水を 1 ml 加えて溶解し、Human IgG 標準液 (640 ng/ml) を調製する。この standard は 精製 Human IgG の濃度に換算した濃度に設定されている。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する。ゼロ濃度は (4) Sample Diluent を用いる。溶解した Human IgG 標準液 (640 ng/ml) は 4℃ 保存では 1 週間安定で、-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 0.1% Tween 20 含有 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、さらに Tween 20 を 500 μl 添加する。十分に混合後、洗浄用バッファー (0.1% Tween 20/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。

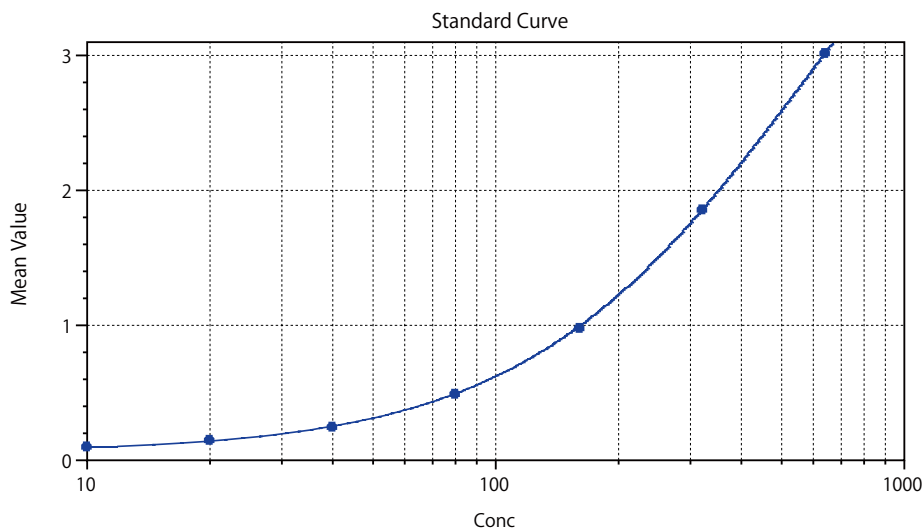
1. 各濃度の Human IgG 含有標準品およびサンプルを 100 μl ずつマイクロピペットで各ウェルに 2 連ずつ加え、室温 (20 ~ 30℃) で 1 時間反応させる。試薬ならびにサンプルはあらかじめ別の 96 ウェルプレートを利用して用意し、8 連ピペット等ですみやかに (5 分以内) 抗体プレートに投入する。プレート内の測定値の信頼を高めるためにも、1 列目と 12 列目とに標準液の希釈系列をおくとよい。
37℃ の加温は抗原性をそこなう恐れがあるので、反応は必ず室温 (20 ~ 30℃) で行う。
(第一反応)
2. 反応液を捨て、0.1 % Tween 20 含有 PBS で 3 回洗浄後、標識抗体液を 100 μl ずつ 8 連ピペット等で各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30℃) で 1 時間反応させる。(第二反応)
3. 反応液を捨て、0.1 % Tween 20 含有 PBS で 4 回洗浄後、(5) Substrate Solution (TMBZ) を 100 μl ずつ各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30℃) で 10 ~ 15 分反応させる。(第三反応)
4. Stop Solution を 100 μl 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。
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 Standard 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、サンプルの吸光度から対応する Human IgG 濃度を読み取る。

VII. 性能

1. 標準曲線 (Human IgG EIA Kit)

下記の標準曲線は代表的な一例である。正確な結果を得るためには、測定ごとに標準曲線を作成してください。

最少検出感度：10 ng/ml



$$4\text{-P Fit: } y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D:$$

A	B	C	D	R ²
0.0526	1.24	596	5.72	1

Human IgG 濃度 (ng/ml)	640	320	160	80	40	20	10	0
A ₄₅₀	3.009	1.853	0.977	0.489	0.250	0.144	0.092	0.043

(発色時間：15分)

2. 再現性

<同時再現性試験>

ヒト血清を希釈して作製した3種類の濃度コントロールを用いて再現性試験を実施した。

検体 (n = 16)	平均値 (ng/ml)	CV (%)
コントロール A	473.5	4.8
コントロール B	165.8	5.0
コントロール C	30.5	2.9

<日差再現性試験>

三日にわたり3種類の濃度コントロールの定量を行い、再現性試験を実施した。

検体 (n = 3)	平均値 (ng/ml)	CV (%)
コントロール A	448.2	4.0
コントロール B	158.5	4.1
コントロール C	29.2	6.7

3. 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	A + B (理論値)	A + B (実測値)	回収率 (%)
6.9	2.0	4.5	4.1	92
21.5	15.8	18.6	20.0	107
38.0	15.8	26.9	25.2	94
58.1	15.8	36.9	40.5	110
21.5	123.2	72.4	63.1	87
150.0	30.9	75.2	90.5	83
181.4	15.8	98.6	99.7	101
150.0	72.1	109.1	111.0	98
181.4	38.0	109.7	125.2	114
58.1	181.4	119.7	130.5	109
126.0	123.2	124.6	105.8	85
231.6	58.1	144.8	144.2	100
181.4	123.2	152.3	140.6	92
231.6	126.0	178.8	183.3	103
233.6	72.1	194.0	152.8	127
382.0	15.8	198.9	239.9	121
231.6	181.4	206.5	210.4	102
382.0	58.1	220.0	258.7	118
382.0	123.2	252.6	260.7	103
382.0	231.6	306.8	340.2	111

単位：ng/ml

4. Human IgG サブクラスの反応性

500 ng/ml 濃度に調製した Myeloma 由来各種精製 IgG サンプルを用いて、各 Human IgG サブクラスへの反応性を調べた。

Human Ig	IgG1 κ	IgG1 λ	IgG2 κ	IgG2 λ	IgG3 κ	IgG3 λ	IgG4 κ	IgG4 λ
A450	2.227	1.611	1.254	0.714	0.263	0.043	0.388	0.171

5. 各種動物血清サンプルとの交差反応

各種動物血清中の抗体との交差反応性を調べた。

STD (ng/ml)	動物血清各種 (希釈倍率)									STD (ng/ml)
	1×10^2	1×10^5	2×10^5	1×10^2	1×10^5	2×10^5	1×10^2	1×10^5	2×10^5	
640	ヒト 個人ドナー No. 1			ウマ (オス)			ウサギ			640
320	ヒト 個人ドナー No. 2			ウマ (メス)			ニワトリ			320
160	ヒト 個人ドナー No. 3			ブタ			ガチョウ			160
80	ヒト 個人ドナー No. 4			ヒト (プール血清)			七面鳥			80
40	ヒト 個人ドナー No. 5			イヌ			家鴨			40
20	ヒト 個人ドナー No. 6			モルモット			カニクイザル No. 1			20
10	ウシ			ラット			カニクイザル No. 2			10
0	ヤギ			マウス			カニクイザル No. 3			0

2.979	3.858	0.711	0.293	0.045	0.043	0.042	0.039	0.041	0.041	3.029
1.930	3.742	0.629	0.228	0.045	0.044	0.039	0.039	0.040	0.040	1.919
1.079	3.808	0.984	0.415	0.045	0.043	0.040	0.039	0.039	0.040	1.077
0.565	3.093	0.500	0.262	3.578	0.476	0.226	0.035	0.040	0.038	0.560
0.313	3.804	0.988	0.509	0.042	0.042	0.042	0.043	0.038	0.042	0.299
0.187	3.798	0.838	0.367	0.043	0.041	0.041	0.047	0.042	0.040	0.182
0.109	0.041	0.042	0.044	0.045	0.046	0.040	0.044	0.041	0.040	0.105
0.048	0.042	0.045	0.046	0.044	0.043	0.043	0.048	0.042	0.037	0.040

A₄₅₀ 測定値

ヒト以外の各種動物血清のサンプルでは、100倍希釈で交差反応を示さなかった。

6. ヒト随時尿での測定例

	希釈倍率			希釈倍率	
	× 11	× 110		× 11	× 110
No. 1	384	ND	No. 6	114	ND
No. 2	22	ND	No. 7	142	ND
No. 3	536	ND	No. 8	140	ND
No. 4	484	ND	No. 9	130	ND
No. 5	78	ND	No. 10	104	ND

測定値 (ng/ml) N = 2 ND = 測定範囲以下

ヒト随時尿 10 サンプルの測定を行った。ヒト尿サンプルは 11 倍希釈で測定が可能だった。

VIII. 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 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。

IX. 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

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