

研究用

Takara

RetroNectin[®] EIA Kit

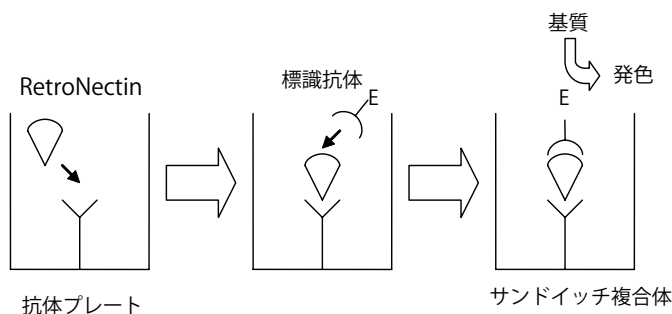
説明書

RetroNectin (リコンビナントヒトフィブロネクチン CH-296) は、ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメイン (C-domain)、ヘパリン結合ドメイン (H-domain) および CS-1 部位の 3 種類の機能性ドメインを含む組換えタンパク質です。哺乳類細胞への遺伝子導入方法としてしばしば用いられる組換えレトロウイルスベクターと RetroNectin を併用する遺伝子導入法は、RetroNectin 分子上に、細胞接着ドメインとアフィニティーを持つ動物細胞とヘパリンドメインに結合するレトロウイルスベクターの両者を近接した位置関係に配座することにより、導入効率を格段に高めることができます。

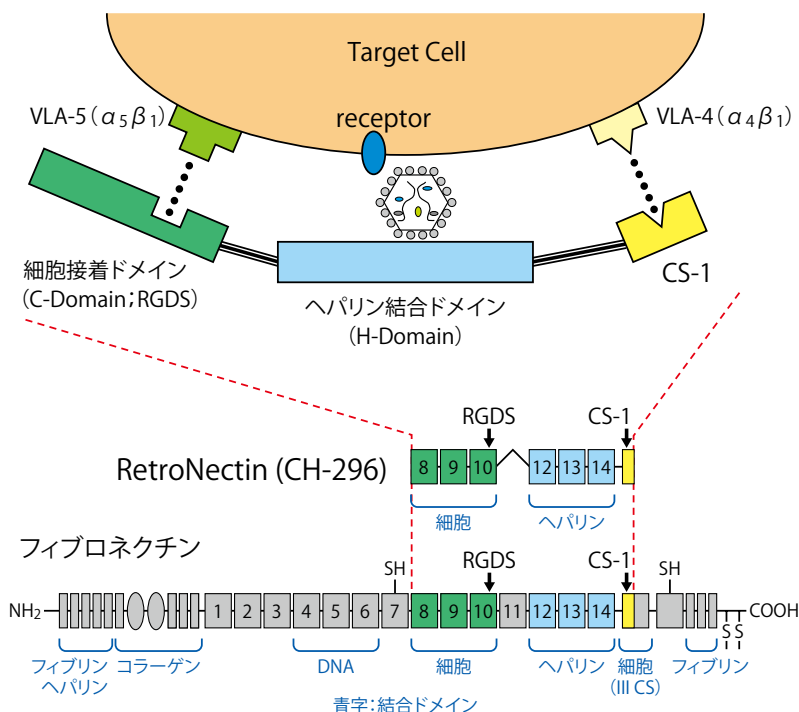
また、RetroNectin は、体外でのリンパ球大量培養の際の器材上マトリックスとしても利用され効果をあげていることから、リンパ球拡大培養用補助剤などの用途で多方面に使用されています。

本キットは、ヒトフィブロネクチンと全く交差反応しない RetroNectin 特異的モノクローナル抗体を、捕捉抗体として固相にプレコート化したサンドイッチタイプの ELISA キットです。ヒト血液成分共存下でも阻害を受けることなく、RetroNectin 量のモニタリングを容易に行うことができます。RetroNectin をコーティングした Dish などからの遊離量や、RetroNectin 存在下で培養した細胞の凍結保存液や細胞洗浄液中の RetroNectin 残存量を高感度に定量できます。

I. 測定原理



<参考：RetroNectin とフィブロネクチンの構造および RetroNectin での遺伝子導入のモデル図>



II. 内容

(1) Antibody Coated Microtiterplate 抗 RetroNectin モノクローナル抗体プレート (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 RetroNectin 抗体	11 ml 用
(3) Standard (凍結乾燥品) RetroNectin 標準品 200 ng	1 ml 用
(4) Sample Diluent 25% ブロッカーカゼイン含有 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

- RetroNectin を用いた遺伝子導入細胞の凍結保存液や細胞洗浄液中の残留 RetroNectin の検出
- RetroNectin を用いたリンパ球拡大培養サンプル中の残留 RetroNectin の検出

VI. 使用方法

1. 検体

- RetroNectin 存在下で培養した細胞の保存液や洗浄液などを検体として用いる。
- 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。
- 血液中のような高タンパク質溶液中ではマトリックス効果により抗原が低値となる傾向がある。そのため、検体は原液測定と同時に、(4) Sample Diluent を用いて 2 ～ 8 倍の希釈系列を作製し、同時に評価することを推奨する。

(注意)

RetroNectin は、細胞結合ドメインを持つタンパク質です。細胞成分が存在することで、抗原抗体反応がわずかに影響を受ける場合があります。

RetroNectin と接触処理を行った細胞に対して洗浄後に残留する RetroNectin 濃度を測定する際に、接触細胞と洗浄液とを一括した懸濁物として ELISA 測定を行う場合は、界面活性剤 NP-40 (CAS No.9016-45-9) を共存させると効果的です。終濃度として 1% になるように NP-40 存在下でサンプルを調製するか、もしくは添付の (4) Sample Diluent に NP-40 を 1% になるように添加した溶液で細胞を懸濁して測定サンプルを調製してください。1%NP-40 を含むサンプル 100 μ l を使用しても抗原抗体反応は阻害されません。

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。
- RetroNectin 標準液
(3) Standard に蒸留水を 1 ml 加えて溶解し、RetroNectin 標準液 (200 ng/ml) を調製する。これを (4) Sample Diluent で用時段階希釈して、200、100、50、25、12.5、6.25、3.125 ng/ml の各濃度の標準液を調製する。ゼロ濃度には (4) Sample Diluent を用いる。
溶解した RetroNectin 標準液 (200 ng/ml) は 4℃ 保存では 1 週間、-20℃ 保存では 1 カ月安定である。
- 標識抗体液
(2) Antibody-POD Conjugate を蒸留水 11 ml で溶解する。
溶解後は、4℃ 保存で 1 週間安定である。それ以上保存する場合には -20℃ で凍結保存し、1 カ月以内に使用する。ただし、凍結は 1 度までとする。
- 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 μ l 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 Standard および検体を 100 μ l ずつマイクロピペットで各 well に 2 連ずつ加え、室温 (20 ~ 30℃) で 1 時間反応させる。サンプルはあらかじめ別の 96 well プレートに用意し、8 連ピペット等ですみやかに (5 分以内) 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 μ l ずつ 8 連ピペットで各 well 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 μ l ずつ 8 連ピペットで各 well に加え、室温 (20 ~ 30℃) で 15 分間反応させる。(第三反応)
4. Stop Solution を 100 μ l ずつ、(5) Substrate Solution (TMBZ) を入れた順番に各 well 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、検体の吸光度から対応する RetroNectin 濃度を読み取る。

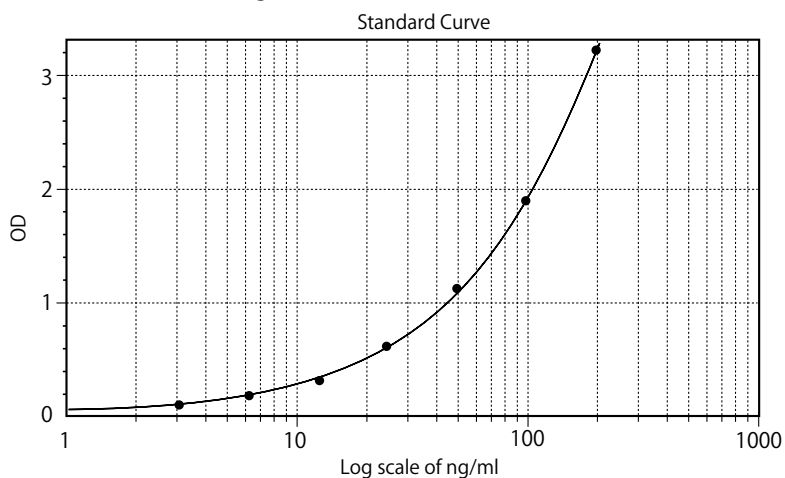
VII. 性能

1. 標準曲線 (RetroNectin 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。

最小検出感度：3.125 ng/ml



RetroNectin 濃度 (ng/ml)	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	0.0
A ₄₅₀	3.201	1.889	1.122	0.618	0.307	0.175	0.111	0.040

2. 再現性

<同時再現性試験>

ヒト血清に RetroNectin を添加して作製した 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)	SD	CV(%)
コントロール A	77.652	3.516	4.5
コントロール B	34.277	0.630	1.8
コントロール C	19.622	0.653	3.3

結果：CV = 5%以下と良好な同時再現性が確認できた。

<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、再現性試験を実施した。

検体 (n=3)	平均値 (ng/ml)	SD	CV(%)
コントロール A	72.756	3.339	4.9
コントロール B	32.996	1.240	1.9
コントロール C	18.516	0.787	3.4

結果：CV = 5%以下と良好な日差再現性が得られた。

3. 添加回収

さまざまな RetroNectin 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	A+B/2 (理論値)	A+B/2 (実測値)	回収率 (%)
121.880	88.629	105.255	103.074	97.93
121.880	53.195	87.538	88.849	101.50
121.880	29.404	75.642	75.445	99.74
121.880	17.205	69.543	67.020	96.37
121.880	6.521	64.201	61.442	95.70
121.880	0.086	60.983	57.660	94.55
88.629	53.195	70.912	69.218	97.61
88.629	29.404	59.017	55.746	94.46
88.629	17.205	52.917	48.110	90.92
88.629	6.521	47.575	43.878	92.23
88.629	0.086	44.358	42.042	94.78
53.195	29.404	41.300	40.593	98.29
53.195	17.205	35.200	35.841	101.82
53.195	6.521	29.858	31.327	104.92
53.195	0.086	26.641	26.032	97.72
29.404	17.205	23.305	21.244	91.16
29.404	6.521	17.963	15.768	87.78
29.404	0.086	14.745	15.193	103.04
17.205	6.521	11.863	12.671	106.81
17.205	0.086	8.646	9.786	113.19
6.521	0.086	3.304	3.597	108.88

単位：ng/ml

結果：おおむね良好な添加回収試験結果を得た。

4. サンプルの凍結融解の影響

凍結融解が及ぼす影響を調べるために、ヒト血清に RetroNectin 標準品を添加し、25℃と－80℃での凍結融解を繰り返して、その融解ごとにサンプリングを行った。最終サンプルを得たのち、すべてのサンプルを同時に定量した。また加温の影響を調べるため 37℃に 1～2 時間静置したのち定量を行った。

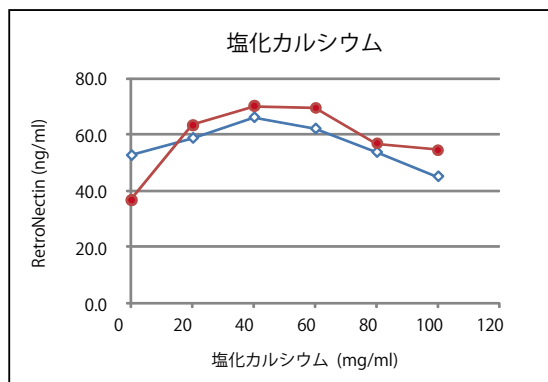
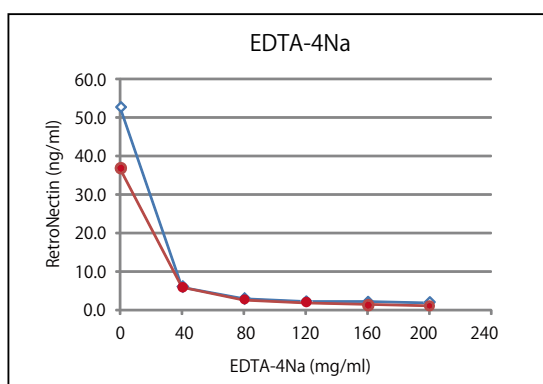
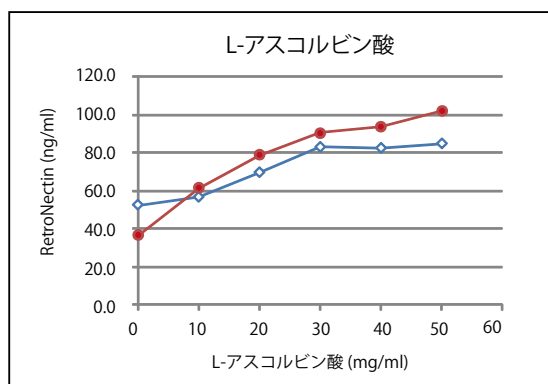
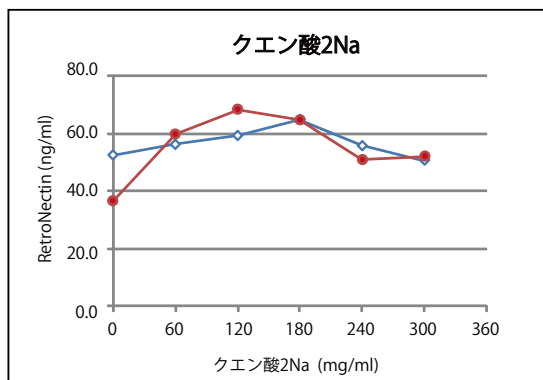
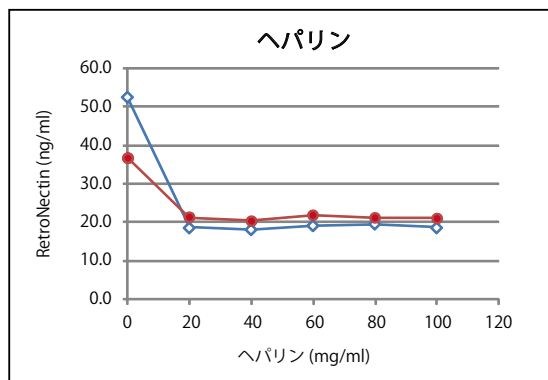
n=2	サンプル A 濃度	サンプル B 濃度	n=2	サンプル A 濃度	サンプル B 濃度
凍結融解 0 回	52.463	36.666	加温 37℃ 0 時間	52.463	36.666
凍結融解 1 回	51.567	26.149	加温 37℃ 1 時間	46.986	32.385
凍結融解 2 回	55.204	42.596	加温 37℃ 2 時間	45.529	34.614
凍結融解 3 回	50.550	34.868			
凍結融解 4 回	57.566	35.306			
凍結融解 5 回	49.710	32.385			

単位：ng/ml

結果：凍結融解による影響は少なく、加温については若干 RetroNectin 量の低下が見られた。血中酵素による影響である可能性が考えられる。

5. 共存物質の影響

サンプル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みた。
グラフ内の供試物質濃度は終濃度を示している。



◆ 血清
● 血漿

結果：ヘパリン血漿および EDTA 血漿サンプルでの測定は推奨しない。

6. 細胞凍結保存液の RetroNectin 測定結果

細胞凍結保存液に RetroNectin を一定濃度加え、RetroNectin 濃度を測定した。

細胞凍結保存液*構成成分 (* : 市販の細胞凍害保護液を使用)

RPMI 1640 無血清培地
ヒト血清アルブミン (終濃度 8%)
HES (Hydroxyethyl starch)
DMSO (Diethylsulfoxide)
生理食塩水

保存液 + High RetroNectin	測定値	177.589 ng/ml
	添加理論濃度	200 ng/ml
	添加回収	88.8%
保存液 + Low RetroNectin	測定値	23.182 ng/ml
	添加理論濃度	25 ng/ml
	添加回収	92.7%

※ 回収率 (%) = (理論濃度 / 測定値) × 100

※ High RetroNectin : RetroNectin 1 mg/ml のストック液 2 μ l を (4) Sample Diluent 1 ml に添加し 2,000 ng/ml とする。細胞保存液 90 μ l に 2,000 ng/ml 希釈溶液を 10 μ l 加える。
(添加理論濃度 200 ng/ml)

※ Low RetroNectin : RetroNectin 1 mg/ml のストック液 2 μ l を (4) Sample Diluent 1 ml に添加し 2,000 ng/ml とする。この溶液 125 μ l に (4) Sample Diluent 875 μ l を添加して 250 ng/ml とする。細胞保存液 90 μ l に 250 ng/ml 希釈溶液を 10 μ l 加える。
(添加理論濃度 25 ng/ml)

(注意)

RetroNectin は細胞表面と相互作用を持つ機能性タンパク質であり、抗凝固剤の一種であるヘパリンともアフィニティがあります。上記の細胞保存液への添加回収試験では、90%前後の回収率を得ることができましたが、血液サンプル (高濃度血漿タンパク質液) に RetroNectin を添加した場合の回収率は、85% を下回る場合があり、また回収率も安定しないことがありますのでご注意ください。

結果：細胞保存液における RetroNectin 測定結果は、理論濃度の 90% 前後であった。

VIII. 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) や 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. 関連製品

RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (製品コード T100A/B)
RetroNectin® Dish (RetroNectin Pre-coated Dish, 35 mm ϕ) (製品コード T110A)
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)
RetroNectin® GMP grade Recombinant Human Fibronectin Fragment CH-296
(製品コード T201)

X. 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。
- ・RetroNectin はタカラバイオ株式会社の登録商標です。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