EnBio RCAS for ERα

Code: ERA-SRC

保存条件:

2-8℃（ コンポーネントⅠ ）

-80℃（ コンポーネントⅡ ）

保証期限:

保証期限は箱上部ラベルに記載しています。

出荷時点において最低 4 週間の保証期限を確保しています。

警告:

本製品は試験研究用に製造されたものであり、ヒト、動物の診断目的での使用は絶対にしないで下さい。また、人体への投与は絶対にしないでください。

製品の仕様はやむを得ず変更される場合がありますので、あらかじめご了承ください。

目次　　ページ

１．　はじめに……1
２．　キットの特長……1
３．　アッセイ原理……1
４．　キットの内容……4
５．　キット使用上の注意……4
６．　アッセイ方法……6
７．　アッセイ精度の評価……12
８．　詳細な解析を行う場合……12
９．　応用例……12
１０．参考データ……16
１１．トラブルシューティングガイド……17
１２．参考情報……18
１３．製品リスト……19

1. はじめに

Estrogen receptor (ER) α などの核内受容体による生体内での遺伝子発現調節には、リガンドと核内受容体との結合だけではなく、コアクチベーターなどコファクターと称されるタンパク質との複合体の形成が関与していることが、近年の研究で明らかになりつつあります。本キットはアッセイ系にコアクチベーターを加えることで化学物質-核内受容体-コアクチベーターからなる複合体の形成を検出します。既存のバインディングアッセイ法は核内受容体への化学物質の結合を検出するのに対し、本キットでは遺伝子発現調節に関与する複合体の形成を検出するため、バインディングアッセイ法と比較して化学物質の ERα に対するリガンド作用をより正確に評価できます。

2. キットの特長

- 全行程で、操作時間は約 3 時間で終了します。
- 操作方法、必要器材は抗体を用いた ELISA 法と同様です。
- 放射性物質、蛍光物質を利用していないため、特殊な装置や設備は不要です。
- 96 穴マイクロタイタープレートを利用している為、多数のサンプルの同時アッセイが可能です。
- アッセイに必要な試薬類はすべてキットに含まれています。
- プレートはストリップタイプ (12 ウェル / ストリップ) となっていますので、分割使用が可能です。

3. アッセイ原理

ERα はアゴニストと結合することで立体構造が変化し、コアクチベーター (SRC1) と結合して複合体を形成します。本キットでは、96 穴マイクロタイタープレート上に SRC1 を固相化し、この複合体の形成を検出します。

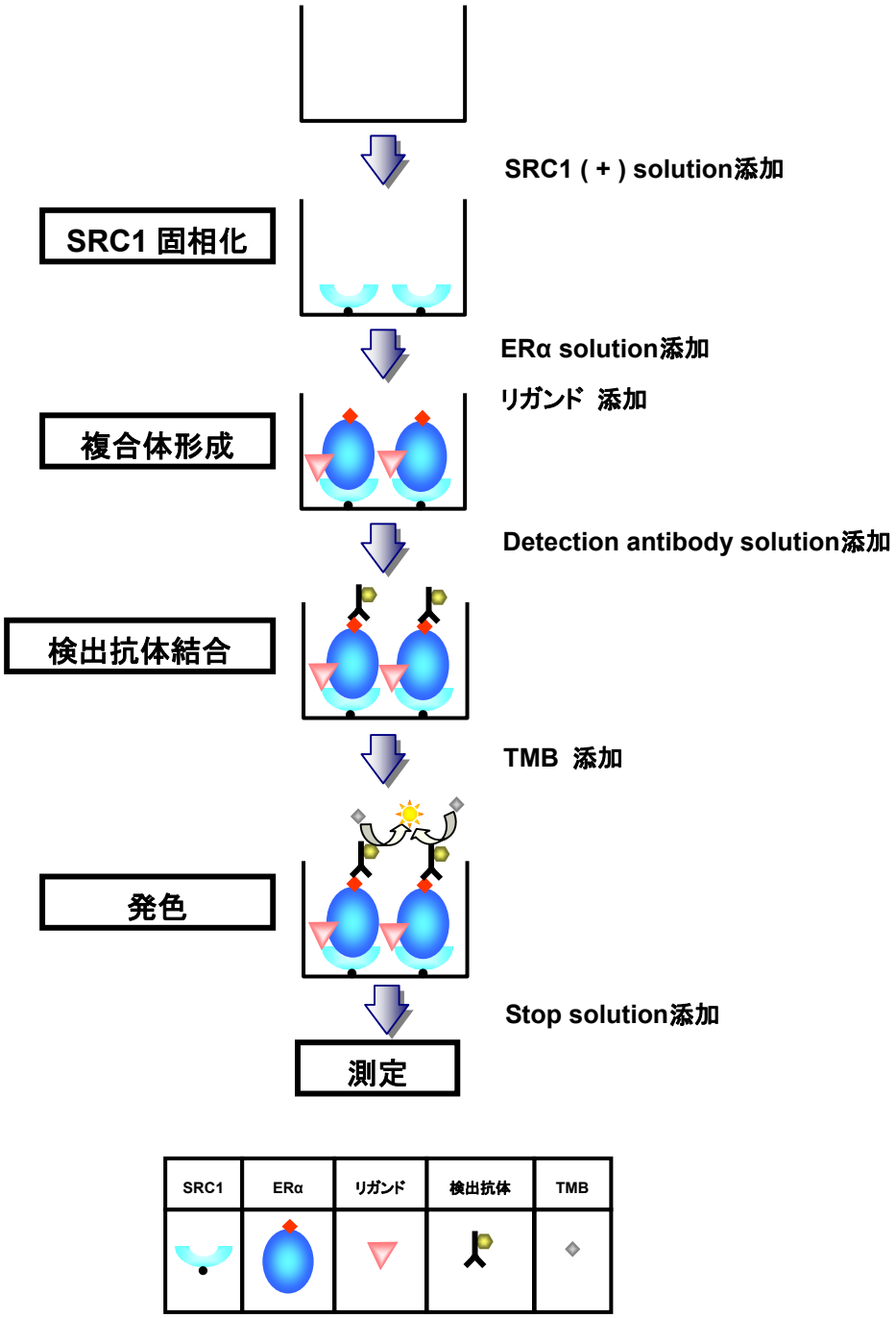
実際のアッセイでは、はじめに核内受容体結合領域を含む SRC1 ペプチドをプレートに固相化させます。次に、SRC1 を固相化したプレート内で組換えヒト ERα とサンプルを反応させます。プレートを洗浄後、さらに西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識した検出抗体を反応させます。プレート洗浄後、HRP の基質であるテトラメチルベンジジン (TMB) を加えて酵素反応をおこない、一定時間後反応を停止します。この溶液の吸光度を 450 nm で測定することにより、サンプルのリガンド作用を検出します。

アゴニスト様物質と結合した ERα は立体構造が変化し、プレートに固相化した SRC1 とさらに結合し複合体を形成します。その結果、吸光度はリガンド容量依存的に上昇します。

本キットにはアゴニストとして β-Estradiol (E2) が添付されております。

図 1 にアッセイ原理を示します。

図 1. アッセイ原理



本キットでE2をリガンドとしてアゴニスト様作用検出アッセイを行った際の典型的なデータを図2に示します。発色時の参考にして下さい。

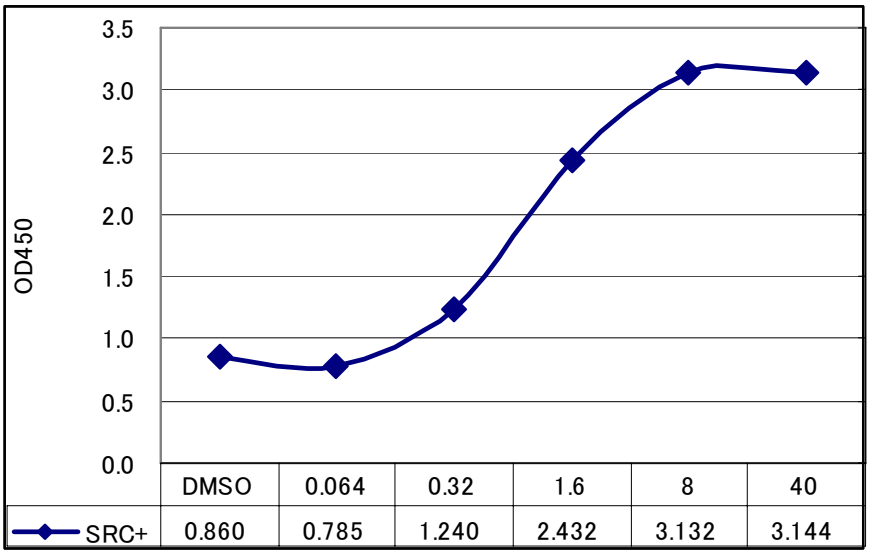
E2の最高濃度を40 nMとし、5倍希釈系列を作製しアッセイを行っております。

A: 反応曲線と測定値を示します。

B: Aを測定した際の停止液添加前のウェルの様子を示します。

図 2

A



	DMSO	0.064	0.32	1.6	8	40
SRC+	0.860	0.785	1.240	2.432	3.132	3.144

E2 (nM)

B

E2(nM)	DMSO	0.064	0.32	1.6	8	40

4. キットの内容

本キットには、以下に示すものが含まれています。各試薬の調製法については “6 アッセイ方法” の項を参照してください。

キット構成

コンポーネントⅠは試薬 1 - 試薬 11 （ 保存温度は 2～8℃ ）

コンポーネントⅡは試薬 12 （ 保存温度は -80℃ ）から構成されております。

コンポーネント No.	試薬 No.	ラベル記載名	文章中での呼称	内容量
Ⅰ 2～8℃保存	1	リーフレット		1 部
	2	Microtiter plate	プレート	96 wells / 8 ストリップ 1 袋 （ アルミ袋 ）
	3	Assay buffer < RCAS >	Assay buffer	30 mL 1 本 (30 mL PP ボトル)
	4	100× Detection antibody < ERα >	100× Detect-ion antibody	0.14 mL 1 本 (1.7 mL プラスチックチューブ)
	5	Stop solution (2.7% 硫酸)	Stop solution	14 mL 1 本 (15 mL PP ボトル)
	6	Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	DMSO	4 mL 1 本 (5 mL ガラスチューブ)
	7	ERα agonist β-Estradiol, 0.8μM in DMSO	E2	0.3 mL 1 本 (1.5 mL ガラスチューブ)
	8	100× SRC1 peptide	SRC1	0.2 mL 1 本 (1.7 mL プラスチックチューブ)
	9	Plate seal	シール	1 枚
	10	10× Wash buffer, phosphate	10× Wash buffer	50 mL 1 本 (60 mL PP ボトル)
	11	TMB substrate	TMB	25 mL 1 本
Ⅱ -80℃保存	12	ERα	ERα	3 本 (0.2 mL PCR チューブ)

5. キット使用上の注意

- 本製品は、試験研究用に製造されたものです。人、動物の診断目的での使用は絶対にしないでください。また、人体への投与は絶対にしないでください。
- 危険を伴う場合がありますので、試薬について基本的な知識のある方以外は使用しないでください。
- 実験中は適切な保護服を常に着用し、試薬が皮膚や目等に直接触れたり、体内に入ることのないよう注意深取り扱ってください。万一、そのようなことが起きた場合には直ちに大量の水で洗浄するなどし、医師の指示を受けてください。
- 使用する前にラベル表示(品名)を確認してください。

- 試薬取り扱いの際は、新しいチップ・ピペット等を利用してください。
- サンプル、試薬類は分注する前によく攪拌してください。攪拌はピペッティングまたは転倒混和により行い、ボルテックスミキサーなどによる激しい攪拌は避けてください。特に ERα は不安定な試薬のため、溶解、サンプル溶液との混合はピペッティングなど穏やかな攪拌条件で行ってください。
- SRC1（＋）solution、SRC1（－）solution、ERα solution 及び Detection antibody solution の調製は使用直前に行って下さい。
- プレートの底面を汚さないようにしてください。底面が汚れていると吸光度測定が正確に行われません。データのバラツキの原因になります。
- コントロールおよびサンプルは各濃度で n=2 以上のアッセイを推奨いたします。
- 異なる製品ロット間、異なる RCAS キット間での試薬の使い回しはしないでください。
- 洗浄操作は特に重要ですので、必ず各ステップで完全に、かつ各ウェルとも同じ様に洗浄してください。特に Wash buffer の残余はバラツキの原因になりますので、洗浄後は完全に除去してください。
- 試薬を加える順番、反応時間は方法の欄に書かれている内容に従ってください。

6. アッセイ方法

アッセイを始める前に必ずお読みください。

(1) 必要な器具および試薬

- マイクロピペットおよびチップ（1-20 μL、20-200 μL 及び 100-1,000 μL）
- ディスポーザブルガラス製テストチューブあるいはディスポーザブルプレート（サンプル調製用及び保存用）
- ポリプロピレン製チューブ（SRC1（+）solution、SRC1（-）solution 及び Detection antibody solution 調製用）
- メスシリンダー（500 mL）
- 蒸留水あるいは脱イオン水
- DMSO（サンプル調製用としてキットに添付してありますが、不足する場合は和光純薬工業社製の DMSO（Cat. No. 046-26023）をご使用ください）
- マイクロプレート用振とう機
- 450nm で測定可能なマイクロプレート用吸光度計
- 8 連マイクロピペット（200 μL）
- アイスボックス（ERα solution、100× Detection antibody、Assay buffer 及び Detection antibody solution の一時的保管のために使用します）
- ストップウォッチ

(2) キットの準備

アッセイ開始の ***30 分前*** までに、キットを実験台の上に出し***室温*** に戻します。

また、***100× Detection antibody*** 及び ***Assay Buffer*** は箱より出し ***2～8℃に保管*** 或いは***氷中*** で維持してください。

アッセイを開始する前に DMSO が融解していない場合は、37℃で加温し融解してください。

(3) Wash buffer の調製

10× Wash buffer 50 mL に蒸留水あるいは脱イオン水を加えて最終容量を 500 mL に調整し、泡立てないように注意しながら、よく混和します。

10× Wash buffer は低温で析出していることがあります。室温に戻した後、転倒混和により十分に再溶解してからご使用ください。

調製後 2～8℃で保存してください。その場合 30 日以内にご使用ください。

(4) SRC1 (+) solution の調製

12 ウェル分のアッセイを行うには 1.5 mL の SRC1 (+) solution が必要となります。

まず、SRC1 が融解していることを確認後、ピペッティングにより穏やかに混合します。

融解していない場合は、37℃で加温し融解してください。

次に、Assay buffer をチューブに分取します。

最後に、分取した Assay buffer に、Assay buffer の ***1/100 量*** の SRC1 を添加し、転倒混和により穏やかに混合します。

ボルテックスミキサーなどによる激しい攪拌は行わないでください。

調製は（6）の操作を行う直前に行って下さい。調製した solution は使用するまで***室温*** で維持して下さい。

一度調製した SRC1 (+) solution は冷凍・冷蔵保存しないで下さい。

(5) SRC1 (-) solution の調製

プレートブランクをアッセイする時に使用する solution です。プレートブランクについては "8 詳細な解析を行う場合" の項を参照してください。

12 ウェル分のアッセイを行うには 1.5 mL の SRC1 (-) solution が必要となります。

まず、DMSO が融解していることを確認します。

次に、Assay buffer をチューブに分取します。

最後に、分取した Assay buffer に、Assay buffer の ***1/100 量*** の DMSO を添加し、転倒混和により穏やかに混合します。

ボルテックスミキサーなどによる激しい攪拌は行わないでください。

調製は（6）の操作を行う直前に行って下さい。調製した solution は使用するまで***室温*** で維持して下さい。

一度調製した SRC1 (-) solution は冷凍・冷蔵保存しないで下さい。

(6) プレートの準備

アルミ袋を開封し、プレートを取り出してください。プレートはストリップタイプになっています。使用しないストリップはフレームから外して乾燥剤の入ったアルミ袋に戻し、しっかりと密封することで、2～8℃に保存することが可能です。その場合、キットの保証期限内にご使用ください。ストリップはフレームからはずれやすいため、予め油性ペンでストリップをナンバリングし、ビニールテープ等でストリップをフレームに固定してください

(7) SRC1 (+) solution 、SRC1 (-) solution の添加 (SRC1 固相化プレート作製)

a. すべてのウェルに 8 連マイクロピペットを用いて、***200-300 μL*** ずつ wash buffer を満たします。次にデカンテーションにより全てのウェル中の溶液を除いた後、紙タオル等におしつけて残液を完全に取り除きます (Wash buffer の調製法は前項を参照してください) 。

b. a の操作をさらに 2 回繰り返してください (合計 3 回の洗浄操作を行います) 。

c. ***1 ウェルあたり 100 μL*** の SRC1 (+) solution を添加します。

d. プレートをシールで覆い、マイクロプレート用振とう機を用いて溶液がシールにつかない程度の強さで振とうしながら、***室温 (20～28℃)*** で ***1 時間*** 反応させます。

・この反応の間に (8) - (10) の作業を行います。

・翌日アッセイを行う場合、ステップ c の操作後、プレートをシールで覆い 4℃で一昼夜静置して作製することも可能です。

・弊社ではマイクロプレート用振とう機として TAITEC 社製バイオシェーカー (型名 M・BR-022) を使用し 800 rpm で振とうしています。

・プレートブランクをアッセイする際は “8 詳細な解析を行う場合” の項を参照してください。

(8) DMSO、E2 の準備

本キットでは DMSO をネガティブ・コントロールとして、E2 をポジティブ・コントロールとして使用します。

DMSO と E2 は***室温*** にて融解させた後、ピペッティングにより穏やかに混合します。

1 ウェル分のアッセイを行うには 5 μL のコントロールが必要となります。

E2 の原液 5 μL をアッセイに供した場合の最終濃度は 40 nM です。

(9) サンプル溶液の調製

DMSO にて調製してください。調製にはディスポーザブルガラス製テストチューブあるいはディスポーザブルプレートを用いてください。

1 ウェル分のアッセイを行うには 5 μL のサンプル溶液が必要となります。

サンプル溶液 5 μL をアッセイに供した場合の最終濃度はサンプル溶液濃度の ***1/20*** です (例：サンプル溶液濃度が 1 mM の場合、サンプルの最終濃度は 50 μM となります) 。

(10) ERα solution の調製

12 ウェル分のアッセイを行うには 1.5 mL の ERα solution が必要となります。

ERα を***氷中*** で融解後 Assay buffer にて希釈し、転倒混和により穏やかに混合します。

ボルテックスミキサーなどによる激しい攪拌は行わないでください。

希釈倍率はコンポーネント II が入っている容器および袋のラベルに記載されています。

調製は（11）- ステップ a の洗浄操作を行う直前に行って下さい。調製した solution は使用するまで***氷中*** で維持して下さい。

ERα solution は凍結融解により活性が著しく低下します。そのため、一度調製した ERα solution は冷凍・冷蔵保存しないで下さい。

(11) ERα、サンプル溶液の添加（複合体形成）

a. SRC1 固相化プレート作製開始から 1 時間後、デカンテーションにより全てのウェル中の溶液を除きます。

b. すべてのウェルに 8 連マイクロピペットを用いて、***200-300 μL*** ずつ wash buffer を満たします。次にデカンテーションにより全てのウェル中の溶液を除いた後、紙タオル等におしつけて残液を完全に取り除きます。

c. b の操作をさらに 2 回繰り返してください（合計 3 回の洗浄操作を行います）。

d. SRC1 固相化プレートに ***1 ウェルあたり 95 μL*** の ERα solution を添加します。

e. サンプル溶液を ***1 ウェルあたり 5 μL*** 添加します。アッセイ毎に DMSO を 5 μL 添加したネガティブ・コントロールのウェル及び E2 を 5 μL 添加したポジティブ・コントロールのウェルも準備します。

f. プレートをシールで覆い、マイクロプレート用振とう機を用いて溶液がシールにつかない程度の強さで振とうしながら、***室温（20～28℃）*** で ***1 時間*** 反応させます。

・この反応の間に（12）の作業を行います。

・弊社ではマイクロプレート用振とう機として TAITEC 社製バイオシェーカー（型名 M・BR-022）を使用し 800 rpm で振とうしています。

(12) Detection antibody solution の調製

12 ウェル分のアッセイを行うには 1.5 mL の Detection antibody solution が必要となります。

まず、100× Detection antibody を***氷中*** に維持し、ピペッティングにより穏やかに混合します。

次に、Wash buffer をチューブに分取します。

最後に、分取した Wash buffer に、Wash buffer の ***1/100 量*** の 100× Detection antibody を添加し、転倒混和により穏やかに混合します。

ボルテックスミキサーなどによる激しい攪拌は行わないでください。

調製は（13）- ステップ a の洗浄操作を行う直前に行って下さい。調製した solution は使用

するまで***氷中*** で維持して下さい。

一度調製した Detection antibody solution は冷凍・冷蔵保存しないで下さい。

(13) 検出抗体の添加（ 検出抗体結合 ）

a. 複合体形成開始から 1 時間後、デカンテーションにより全てのウェル中の溶液を除きます。

b. すべてのウェルに 8 連マイクロピペットを用いて、***200-300 μL*** ずつ wash buffer を満たします。次にデカンテーションにより全てのウェル中の溶液を除いた後、紙タオル等におしつけて残液を完全に取り除きます。

c. b の操作をさらに 2 回繰り返してください（ 合計 3 回の洗浄操作を行います ）。

d. ***1 ウェルあたり 100 μL*** の Detection antibody solution を添加します。

e. プレートをシールで覆い、マイクロプレート用振とう機を用いて溶液がシールにつかない程度の強さで振とうしながら***室温（20～28℃）*** で ***30 分間*** 反応させます。

・この反応の間に（14）の作業を行います。

・弊社ではマイクロプレート用振とう機として TAITEC 社製バイオシェーカー（ 型名 M・BR-022 ）を使用し 800 rpm で振とうしています。

(14) TMB の準備

12 ウェル分のアッセイを行うには 1.5 mL の TMB が必要となります。

TMB はそのまま使用します。

残りの TMB を保存する場合は 2-8℃にて行ってください。TMB の分注には必ず新品のピペットチップなどを使用してください。分注作業時に不純物が混入したり、古くなった TMB は分解し薄青色に変化します。そのような TMB は使用しないでください。

(15) 発色、測定

a. 検出抗体結合開始から 30 分後、デカンテーションにより全てのウェル中の溶液を除きます。

b. すべてのウェルに 8 連マイクロピペットを用いて、***200-300 μL*** ずつ wash buffer を満たします。次にデカンテーションにより全てのウェル中の溶液を除いた後、紙タオル等におしつけて残液を完全に取り除きます。

c. b の操作をさらに 2 回繰り返してください（ 合計 3 回の洗浄操作を行います ）。

d. ***1 ウェルあたり 100 μL*** の TMB を添加します。

＊TMB、Stop solution のプレートへの分注は、反応時間に誤差が生じないように、ストップウォッチなどを使い、一定の間隔で実施するようにしてください。

e. ***室温（ 20～28℃ ）で静置*** し、***20 分間*** 発色反応をします（ 青色に変化します ）。***反応***

中は振とうをしないでください。

＊発色反応時間は 20 分間を上限としてください。発色反応は室温などの影響を受けることがあります。長時間の発色反応はネガティブ・コントロール（DMSO）の発色も上昇させるので注意してください。

f. 発色反応後、***1 ウェルあたり 100 μL*** の Stop solution を添加します（黄色に変化します）。

g. 溶液を均一にするため、プレートリーダーの撹拌機能を使用するかタッピングを行うことでよく撹拌します。
タッピングを行う際には、プレートを実験台の上におき、それぞれの辺を 4-5 回程度たたきます。液が飛び散らないように注意してください。

h. 30 分以内に ***450 nm*** の吸光度を測定します。

7. アッセイ精度の評価

ポジティブ・コントロール（E2）とネガティブ・コントロール（DMSO）の吸光度の差が **0.8** 以下である場合、サンプルの正確なアッセイ値が得られていない可能性があります。“11. トラブルシューティングガイド”の項を参照し、正確なアッセイ値を得るために再試験を行ってください。

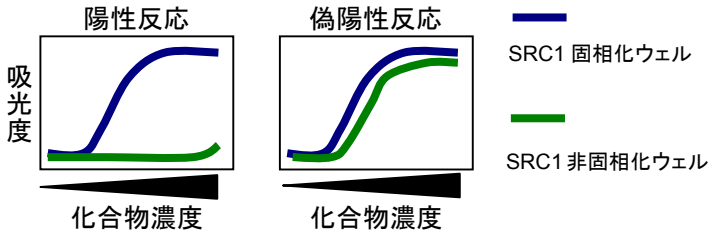
8. 詳細な解析を行う場合

サンプルの性質によってはサンプル- ERα 複合体が SRC1 非依存的にウェルに結合し偽陽性反応を起すことがあります。また、サンプルの濃度依存性の確認など、より正確にサンプルの反応性を確認する必要がある場合は以下の方法を実施してください。

① サンプルの希釈系列を何点か調製し、反応曲線を確認する。

② プレートブランクとして SRC1 を固相化しないウェル（固相化時に 1 ウェルあたり 100 μL の SRC1（-）solution を添加）と SRC1 固相化ウェルとを作製し、サンプルのアッセイを同時に行い吸光度を確認する。SRC1 固相化ウェルのシグナルと SRC1 非固相化ウェルのシグナルとを比較することで偽陽性反応かどうかの判定が可能になります。

図 3. 偽陽性反応



9. 応用例

キット製造毎に確認を行っておりませんので、各製造ロットにおける作動を保証しておりませんが、以下のような応用的な使用が可能と考えられます。

9-1. アンタゴニストアッセイ

EC80（最大活性の 80%の活性を示すアゴニストの濃度）のアゴニストとサンプルを同時に添加することでアッセイを行えると考えられます。

以下に原理を示します。

予め一定濃度のアゴニストを混合したアンタゴニスト様物質を ERα と反応させると、アゴニスト - ERα 複合体だけでなくアンタゴニスト様物質 - ERα 複合体が形成されます。アンタゴニスト様物質 - ERα 複合体は SRC1 と結合しないため、SRC1 との複合体形成が可能なアゴニスト - ERα 複合体量が減少し、SRC1 - アゴニスト - ERα 複合体量が減少します。その結果、吸光度はサン

プル用量依存的に減少します。

以下にアッセイ例を記載します。
予め競合アゴニストの濃度依存性反応曲線から EC80 を決定する必要があります。

例：アンタゴニストとして ICI182,780 を、競合アゴニストとして E2 を使用する場合、
E2 の EC80 はおおよそ 3 nM です。

6 - (8) のステップで、ネガティブ・コントロールとして 120 nM E2 と DMSO を 1:1 で混合した溶液を準備します。ポジティブ・コントロールとして 120 nM E2 と 200 μM ICI182,780 を 1:1 で混合した溶液を準備します。

6 - (9) のステップで、120 nM E2 を調製し、サンプルと 1:1 の比率で混合したサンプル溶液を準備します。

6 - (11) - e のステップで、サンプル溶液を ***1 ウェルあたり 5 μL*** 添加します。アッセイ毎に DMSO + 120 nM E2 の混合液を 5 μL 添加したネガティブ・コントロールのウェル及び 200 μM ICI182,780+ 120 nM E2 の混合液を 5 μL 添加したポジティブ・コントロールのウェルも準備します。

以下に、E2 を競合アゴニストとした場合のアンタゴニストアッセイ例を示します。

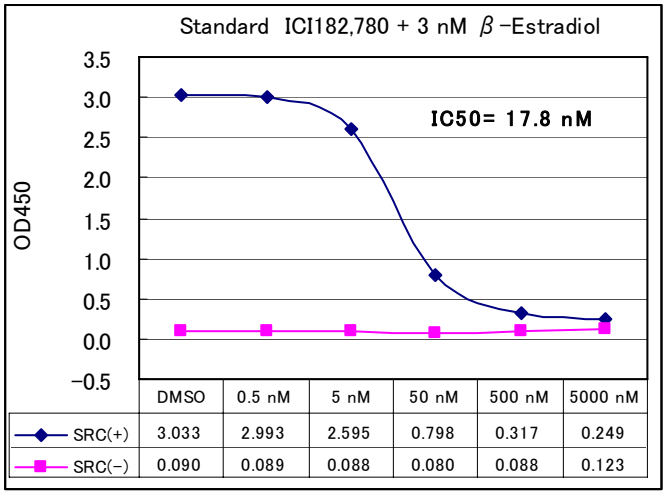


図 4. ICI182,780 (antagonist, 3 nM E2 共存下) の濃度依存性曲線。

参考までに、弊社で使用しているアンタゴニストの品番を記しておきます。

試薬名	メーカー	カタログ番号
ICI 182,780	TOCRIS	1047

9-2. DMSO 以外の溶媒を使用する場合

アゴニスト様作用検出アッセイについて

標準アゴニストとサンプルの反応液の組成をそろえてアッセイを行い、キットの保証範囲内の反応性（ネガティブ・コントロールとポジティブコントロールの吸光度差が 0.8 以上）を示すようであれば、アッセイが行えると考えられます。下記に予備検討の方法例を記載します。

アンタゴニスト様作用検出アッセイについて

競合アゴニスト DMSO 溶液とサンプルを 1:1 の割合で混合した際に、レセプター溶液に添加する前にアゴニストまたはサンプルが析出を起こす危険性があるため、DMSO 以外の溶媒ではアッセイが行えません。

例： サンプル溶媒にエタノールを使用した場合のアゴニスト様作用検出アッセイにおける予備検討

6 -（10） のステップで、コンポーネントⅡに記載されている希釈倍率の ***0.95 倍の希釈倍率*** で ERα を Assay Buffer に希釈してください（ 例えば希釈倍率が 100 倍と記載されている場合、95 倍の希釈倍率で希釈します）。

6-（11）- d のステップで、***1 ウェルあたり 90 μL*** の ERα solution を添加します。
6-（11）- e のステップで、標準アゴニスト溶液（DMSO 溶液）5 μL およびエタノール 5 μL を添加します。
6-（11）- f 以降は通常の操作を行い、アッセイします。

予備検討で問題がなければ、下記のとおりにアッセイを行なうことが可能です。

例： サンプル溶媒がエタノールの場合のアッセイ方法

6 -（10） のステップで、コンポーネントⅡに記載されている希釈倍率の ***0.95 倍の希釈倍率*** で ERα を Assay Buffer に希釈してください（ 例えば希釈倍率が 100 倍と記載されている場合、95 倍の希釈倍率で希釈します ）。

6-（11）- d のステップで、***1 ウェルあたり 90 μL*** の ERα solution を添加します。

6-（11）- e のステップで、以下の表のように溶液を添加します。

	DMSO	E2	エタノール	サンプル
サンプルウェル	5 μL			5 μL
ポジティブ・コントロールウェル		5 μL	5 μL	
ネガティブ・コントロールウェル	5 μL		5 μL	

6-（11）- f 以降は通常の操作を行い、アッセイします。

10. 参考データ

本キットで標準化合物をアッセイした例、Z' factor 及び CV%値を以下に示します。

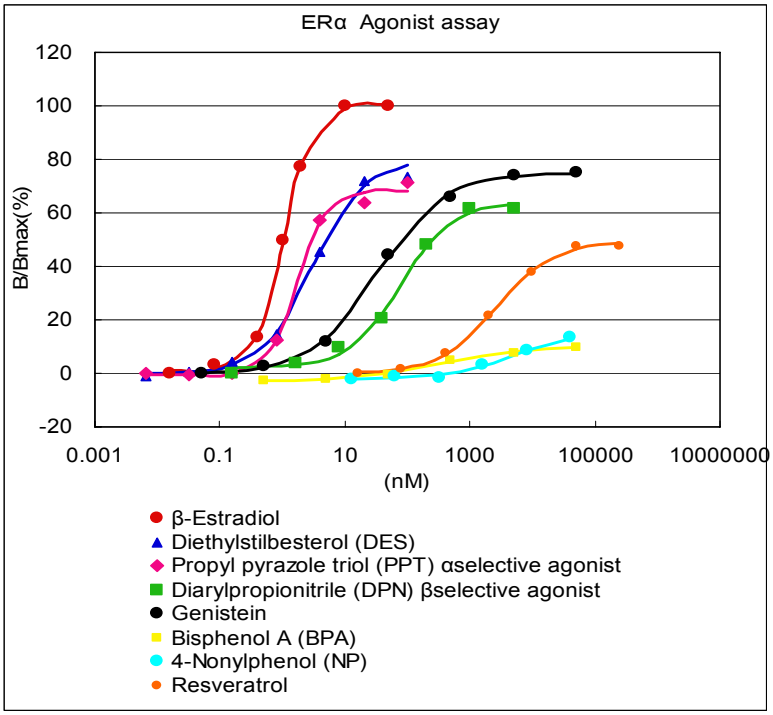


図 5. 17beta-estradiol (E2) , Diethylstilbestrol (DES) , Genistein, Propylpyrazoletriol (PPT) , 4-Nonylphenol, Diaryl-propionitrile (DPN) , Bisphenol A 及び Resveratrol の濃度依存性曲線。

	Concentration of E2		
	64 pM	0.32 nM	1.6 nM
n	6	6	6
mean Abs	0.542	0.883	2.320
SD	0.077	0.088	0.170
CV%	14.22	9.92	7.33

Z' factor 0.747 (8 nM E2、n=24)

B/Bmax : ネガティブ・コントロールの活性を 0%、ポジティブ・コントロールの活性を 100%とした際の相対活性値です。

算出式を以下に示します。

B/Bmax = (C – B) / (A – B) %

A : (ポジティブ・コントロールの SRC1 (+) の OD450 値)

– (ポジティブ・コントロールの SRC1 (-) の OD450 値)

B : (ネガティブ・コントロールの SRC1 (+) の OD450 値)

– (ネガティブ・コントロールの SRC1 (-) の OD450 値)

C : (サンプルの SRC1 (+) の OD450 値)

– (サンプルの SRC1 (-) の OD450 値)

11. トラブルシューティングガイド

(1) 吸光度が低すぎる

1.1) 吸光度計の測定波長が 450 nm になっていることを確認してください。
1.2) 反応時間と温度を確認してください。反応温度が低いとポジティブ・コントロール添加時の吸光度が低下します。
1.3) 使用前に TMB が室温に戻っていることを確認してください。
1.4) 試薬の調製法を確認してください。
1.5) 試薬の保存法を確認してください。
1.6) Stop solution を加えた後、30 分以内に吸光度を測定してください。
1.7) 振とう時の攪拌が十分であることを確認してください。

(2) 吸光度が高すぎる / ネガティブ・コントロールの値が高すぎる

2.1) ERα solution の調製、サンプル溶液と ERα solution の混合などはピペッティングや転倒混和など穏やかな条件で行ってください（ ボルテックスミキサーの使用を避けてください ）。
2.2) 洗浄の各ステップでウェルが wash buffer で満たされていることを確認してください。また、デカンテーションにより wash buffer を除いた後、プレートを紙タオルに打ちつける等して wash buffer が完全に除かれていることを確認してください。
2.3) 反応時間と温度を確認してください。反応温度が高いとネガティブ・コントロールの吸光度が上昇します。
2.4) 試薬の調製法を確認してください。
2.5) TMB が劣化して青味がかっている場合は使用しないでください。
2.6) シールに水滴がついてない事を確認してください。マイクロプレート用振とう機が発熱しプレートの温度が上昇している可能性があります。プレートの下にキムワイプ等の紙を敷くと温度上昇を緩和することが可能です。

(3) アッセイの精度、再現性が低い

3.1） マイクロピペットの容量がきちんと補正されていることを確認してください。
3.2） ネガティブ・コントロール、ポジティブ・コントロールの調製法を確認してください。
3.3） マルチチャンネルピペットをご使用の際は試薬毎にチップおよび分注用容器をかえ、各溶液が混ざらないようにしてください。
3.4） 洗浄が十分であるか確認してください。
3.5） TMB が劣化して青味がかっている場合は使用しないでください。
3.6） シールに水滴がついてない事を確認してください。マイクロプレート用振とう機が発熱しプレートの温度が上昇している可能性があります。プレートの下にキムワイプ等の紙を敷くと温度上昇を緩和することが可能です。

12. 参考情報

核内受容体によってはプラスチック製品からの可塑剤などの溶出あるいはガラス製品からの剥離剤などの溶出の影響を受けることがあります。参考までに、弊社で影響がないことを確認したプラスチック製品およびガラス製品を以下に記載します。

	容量	メーカー	カタログ番号	用途
ガラスチューブ S-07 茶色	1.5 mL	日電理化	250192	検体保存
ガラスチューブ S-08 茶色	2 mL	日電理化	250183	検体保存
ガラスチューブ SV-8 茶色	8 mL	日電理化	250866	検体保存
ガラスチューブ SV-15 茶色	15 mL	日電理化	250868	検体保存
ポリプロピレン製チューブ	15 mL	IWAKI	2325-015	溶液調製
ポリプロピレン製チューブ	50 mL	IWAKI	2345-050	溶液調製
ディスポーザブルプレート	96 well	Corning	COSTAR 3363	検体希釈、コントロール調製など
マイクロチューブ	1.5 mL	QSP	509-GRD	検体希釈、コントロール調製など
マイクロタイターチューブ	1.2 mL	QSP	845-Q	検体希釈、コントロール調製など
Pipette Tip Yellow	200 μL	QSP	110	溶液分取、溶液分注など
Pipette Tip Blue	1000 μL	QSP	111	溶液分取、溶液分注など
Pipette Tip	5000 μL	GILSON	F123969	溶液分取など
Pipette Tip*1	20 μL	RAININ	GPS-L10	検体分注など
Pipette Tip*2	250 μL	RAININ	GPS-L250	検体分取、検体分注など
Pipette Tip*3	300 μL	BIOHIT	790302	溶液分注など

*1 : 8 チャンネル マルチチャンネルピペット 0.5-10 μL (RAININ) 用 Tip

*2 : 8 チャンネル マルチチャンネルピペット 020-200 μL (RAININ) 用 Tip

*3 : プロライン電子ピペッター 8 チャンネル 25-250 μL (BIOHIT) 用 Tip

参考までに、弊社で使用しているマイクロプレート用しんとう機の機種と回転数を記載しておきます。

メーカー　TAITEC

機種　M-BR-022

回転数　800 rpm

13. 製品リスト

製品コード	製品名	価格（税別）
ERA-SRC	EnBio RCAS for ERα	¥100,000
ERB-SRC	EnBio RCAS for ERβ	¥100,000
PPARA-CBP	EnBio RCAS for PPARα	¥100,000
PPARG-CBP	EnBio RCAS for PPARγ	¥100,000
PPARD-CBP	EnBio RCAS for PPARδ	¥100,000
LXRA-SRC	EnBio RCAS for LXRα	¥100,000
MR-SRC	EnBio RCAS for MR	¥100,000
VDR-SRC	EnBio RCAS for VDR	¥100,000
TRA-SRC	EnBio RCAS for TRα	¥100,000
TRB-SRC	EnBio RCAS for TRβ	¥100,000
RXRA-SRC	EnBio RCAS for RXRα	¥100,000
RXRB-SRC	EnBio RCAS for RXRβ	¥100,000
RXRG-SRC	EnBio RCAS for RXRγ	¥100,000
ERS-SRC	EnBio RCAS subtype set for ER（α, β）	¥160,000
PPARS-CBP	EnBio RCAS subtype set for PPAR（α, γ, δ）	¥240,000
TRS-SRC	EnBio RCAS subtype set for TR (α, β）	¥160,000
RXRS-SRC	EnBio RCAS subtype set for RXR（α, γ, δ）	¥240,000

製造元:

藤倉化成株式会社

メディカル材料部　つくば分室

〒305-0062

茨城県つくば市赤塚字牛ヶ渕 586-9　池田理化ビル2階

Tel:029-839-9464

Fax:029-839-9465

E-mail:ENBIO@fkkasei.co.jp

クイック プロトコール

STEP 1: キット準備

1. 使用しないプレートストリップをフレームから外してアルミ袋に戻し、冷蔵庫に保管。100×Detection antibody 及び Assay Buffer を取り出し冷蔵庫に保管或いは氷中で維持
2. 箱を室温に 30 分程度放置

STEP 2: SRC1 固相化プレートの作製

1. 1 ウェルあたり 300 μL の wash buffer で 3 回洗浄
2. 1 ウェルあたり 100 μL の SRC1 (+) solution を添加
3. 室温で 1 時間、振とうしながら反応

(この間にサンプル溶液、ERα solution を準備)

4. 1 ウェルあたり 300 μL の wash buffer で 3 回洗浄

STEP 3: ERα、サンプル溶液の添加

1. 1 ウェルあたり 95 μL の ERα solution を添加し、続いて 5 μL の DMSO、E2 あるいはサンプル溶液を添加
2. 室温で 1 時間、振とうしながら反応

(この間に Detection antibody solution を準備)

3. 1 ウェルあたり 300 μL の wash buffer で 3 回洗浄

STEP 4: 検出抗体の添加

1. 1 ウェルあたり 100 μL の Detection antibody solution を添加
2. 室温で 30 分間、振とうしながら反応

(この間に TMB を準備)

3. 1 ウェルあたり 300 μL の wash buffer で 3 回洗浄

STEP 5: 発色、測定

1. 1 ウェルあたり 100 μL の TMB を添加
2. 室温で 20 分間静置 (振とうはしない)
3. 1 ウェルあたり 100 μL の Stop solution を添加
4. 30 分以内に 450 nm の吸光度を測定
5. 結果を解析

プレートレイアウト

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												