

# EnBio Medaka Vitellogenin ELISA system

Code MEV-ELISA

96 wells

## STORAGE :

Store at  $-15\sim-30^{\circ}\text{C}$

## EXPIRY :

The expiry date is started on the package and will be at least 4 weeks from the date of dispatch.

## Warning

For research use only. Not recommended or intended for diagnosis of disease in humans or animals. Do not use internally or externally in humans or animals.

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
はじめに	2
キットの特長	2
測定原理	2
アッセイシステムの内容	3
キット使用上の注意	4
アッセイ方法	5
必要な器具および試薬	5
サンプルの調製	5
標準液の調製	6
溶液の調製	6
測定操作手順	7
測定値の算出法	8
コントロール血漿期待値	8
システムの性能	9
特異性	9
感度	9
再現性	9
Precision profile	10
添加回収試験	10
希釈直線性	10
トラブルシューティングガイド	11

## はじめに

ビテロゲニンとは、卵生動物が有する卵黄蛋白の 1 種で通常オスの血中にはごく僅かにしか検出されません。しかしながら、女性ホルモン作用を有する化学物質に曝されるとオスの血中濃度が顕著に上昇する為、内分泌攪乱物質測定の為のバイオマーカーとして注目されている物質です。

本アッセイキットはメダカ血漿中のビテロゲニン濃度を短時間で特異的に測定することが出来ます。

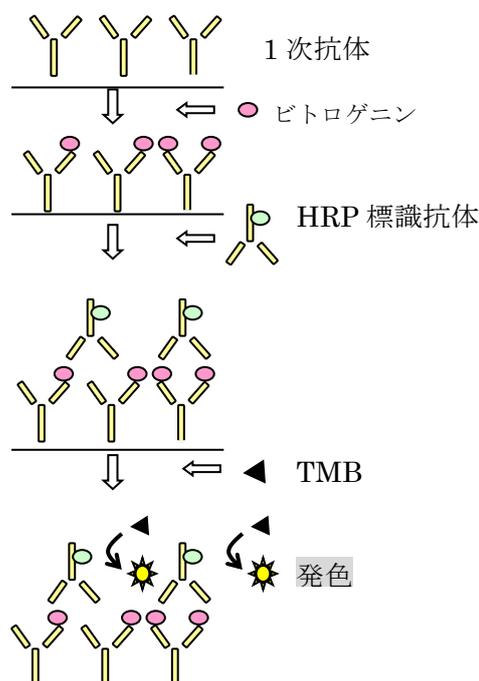
## キットの特長

- メダカビテロゲニンに特異的に反応するモノクローナル抗体を利用している為、高感度でメダカビテロゲニン濃度の測定がおこなえます。
- 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測定が可能です。
- 全行程で、操作時間は約 3 時間で終了します。
- アイソトープを利用しない為、特殊な装置、設備は不要です。
- プレートはストリップタイプ(8wells/strip)となっていますので、分割使用が可能です。
- 2~100 ng/ml のレンジで測定できます。
- 40 未知検体を duplicate でアッセイできます。

## 測定原理

メダカビテロゲニンに特異的に反応するモノクローナル抗体 2 種を用いたサンドイッチ ELISA アッセイです。

1 次抗体を固相化してある 96 穴マイクロタイタープレートにメダカ血漿サンプルを分注し、室温で 1 時間抗原抗体反応をおこなわせます。洗浄後、さらに西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識抗体を加え 1 時間室温で抗原と反応させます。洗浄後、最後に HRP の基質であるテトラメチルベンジジン (TMB) を加え酵素反応をおこない反応液の吸光度を 450nm で測定することにより、メダカ血漿中のビテロゲニンを定量する事が出来ます。



## アッセイシステムの内容

このアッセイシステムには、以下に示すものが含まれています。

1. **Antibody coated microtiter plate, 96 well**  
抗メダカビテロゲニン固相化 96 ウェルマイクロタイタープレート  
そのまま使用します。
2. **Medaka vitellogenin standard, 100ng/ml, 0.5ml**  
標準品の調製法については、標準品の調製の項目(P. 5)を参照してください。
3. **Assay buffer, 50ml**  
そのまま使用します。残りの溶液を保存する場合は-15~-30℃にて行ってください。その場合 30 日以内にご使用ください。
4. **Wash buffer concentrate, 40ml**  
10 倍濃縮洗浄原液  
希釈法は溶液の調製の項目(P. 5)を参照して下さい。
5. **Antibody - HRP concentrate, 0.07ml**  
HRP 標識抗メダカビテロゲニン抗体原液  
使用前に Antibody - HRP dilution buffer で希釈します。希釈法は溶液の調整の項目(P. 5)を参照して下さい。
6. **Antibody - HRP dilution buffer, 7ml**  
そのまま使用します。残りの溶液を保存する場合は-15~-30℃にて行ってください。その場合 30 日以内にご使用ください。
7. **TMB substrate, 25ml**  
そのまま使用します。残りの溶液を保存する場合は 2~8℃にて行ってください。その場合 30 日以内にご使用ください。
8. **Stop solution, 7ml**  
1 N 硫酸  
そのまま使用します。
9. **Plate cover, 1 枚**

## 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く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。
- このキットは分割使用が可能ですので、アッセイに必要な数のストリップ(8wells/strip)を取り出して、残りは袋内に密封し 2~8℃にて保存してください。その場合 30 日以内にご使用ください。
- 全ての試薬は室温に戻してからご使用ください。
- 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。また溶液類には蛋白質、活性剤が含まれているものもありますので、激しい攪拌による過剰な泡化は避けてください。
- コンタミネーションを防ぐため、分注の前後に各ウェルの上部を手で触れないでください。
- スタンダードおよびサンプルは必ず 2 重以上で測定してください。
- アッセイ毎に検量線を作成してください。
- 試薬類のプレートへの分注は、20 分以内で行ってください。
- 異なったロットの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。
- 試薬を加える順番、インキュベーション時間は方法の欄に書かれている内容に従ってください。

## 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。

注意：キットに含まれる全ての試薬を室温に戻してからアッセイを始めてください。特に、TMB substrate は必ず室温に戻してから使用してください。

## 必要な器具および試薬

### メダカ血漿サンプル調整

- ・ メダカ麻酔液(0.005%オイゲノール液)
- ・ プラスチックディッシュ(直径 60mm)
- ・ カミソリ
- ・ ピンセット
- ・ マイクロピペット(250  $\mu$ l)
- ・ マイクロチューブ(1.5ml)
- ・ 冷却遠心機(マイクロチューブ用)

※ 10  $\mu$ l キャピラリー管(ドラモンド社製など)：(必要な場合のみ)

### ELISA アッセイ

- ・ マイクロピペットおよびチップ (10~100  $\mu$ l、100~500  $\mu$ l)
- ・ ポリプロピレン製チューブ (サンプル希釈用)
- ・ メスシリンダー (500ml)
- ・ 蒸留水あるいは脱イオン水
- ・ マイクロプレート用振とう器
- ・ 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  $\mu$ l) (マイクロプレート洗浄用)

## サンプルの調整

メダカ血漿サンプル調整 (以下は、当社で行っている方法です)

1. 麻酔液(0.005%オイゲノール液)10ml を 60mm ディッシュに分注します。
2. Assay buffer 250  $\mu$  L をピペットで吸い、60mm ディッシュ蓋の上に注ぎ液胞をつくります。
3. 被検メダカをオイゲノール液にいれ麻酔をかけます。
4. 麻酔が効き始め、メダカの動きが鈍くなった時点(1分程度です)で、メダカを麻酔液からピンセット等で取り出します。
5. キムワイプ等で体表面に付着している水分を取り除き、メダカを 60mm ディッシュの蓋の上に置きます。
6. メダカの頭の部分を指で抑え尻尾の部分をカミソリで切断し、素早く頭の部分をつかみ、胴体の切断部分を液胞につけます。
7. 血液が出なくなったら液胞をマイクロピペットで回収し、1.5mL のマイクロチューブに入れ遠心するまで水中又は冷蔵保存します。
8. すべてのメダカの血液採取が終了した後、マイクロチューブを遠心(8,000rpm,4 $^{\circ}$ C,10分間)し上清を別のマイクロチューブに移し、メダカ血漿サンプルとします。

※ 採血量を正確に測定したい場合は、以下の手順で採血します。

- ① 1.5ml のマイクロチューブに 250  $\mu$ l の Assay buffer を入れます。
- ② メダカの尻尾部分を切断し、切断後の胴体部分にキャピラリーをあて、毛細管現象で上昇してくる血液を採取します。
- ③ 採取後の血液は、キャピラリー管の端から口で息を吹き込むことによりマイクロチューブの Assay buffer に入れます。1.5ml マイクロチューブは、遠心するまで氷中又は冷蔵保存します。
- ④ すべてのメダカの血液採取が終了した後、マイクロチューブを遠心 (8,000rpm, 4°C, 10 分間) し、上清を別のマイクロチューブに移し、メダカ血漿サンプルとします。

※ キャピラリー管を用いた場合、測定結果は、採取した血液量に対するビテロゲニン濃度として次式により換算します。

$$[(250 \mu\text{l} + \text{採血量}(\mu\text{l})) / \text{採血量}(\mu\text{l})] \times \text{ビテロゲニン濃度 (測定値)}$$

### サンプルの保存

サンプルの保存は-20°C以下にて行ってください。サンプルの凍結融解に関して3回までは測定値に特に変化を与えないことを確認していますが、必要最低限にしてください。

### 標準品の調整

#### メダカビテロゲニン標準品調整

1. Medaka vitellogenin standard 及び Assay buffer を室温で融解し、よく攪拌します。
2. Medaka vitellogenin standard : 100ng/mL を Assay buffer を用いて以下の希釈法により 10ng/mL, 20ng/mL, 50ng/mL の希釈系列を作製します。これらの希釈系列は2重測定をおこなった場合、ELISA アッセイ 2 回分に相当します。

	0ng/mL	10ng/mL	20ng/mL	50ng/mL	100ng/mL
標準液 : 100ng/mL	0	24	48	120	240
Assay buffer	240	216	192	120	0

$\mu$  L

### 標準液の保存

使用後、残りの標準液の保存は-20°C以下にて行ってください。その場合 14 日以内にご使用ください。

### 溶液の調整

#### Wash buffer

Wash buffer concentrate(10 倍濃縮洗浄原液, 40ml)の全量をメスシリンダーに移し、蒸留水あるいは脱イオン水を加えて最終容量を 400ml に調製し、よく混和してください。調製後 2~8°C 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。

#### 酵素抗体液

Antibody-HRP dilution buffer 6ml に Antibody-HRP concentrate(酵素抗体原液)を 60  $\mu$ l 添加し、よく混和してください。本操作は反応直前(15 分以内)に行ってください。分割使用

する場合は、使用量に応じて各試薬量を調節してください。酵素抗体液は 1 ウェルあたり 50  $\mu$ l 使用します。残った酵素抗体原液を保存する場合は 2~8°Cにて行ってください。その場合 30 日以内にご使用ください。

## 測定操作手順

1. Zero standard, 標準品および測定しようとしているサンプル数に十分な strip (8wells/strip)を用意します。
2. すべてのウェルに 8 連マイクロタイターピペットを用いて 200  $\mu$ l 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っている液を完全に取り除きます。この操作を 3 回繰り返してください(洗浄液の調製法は前項を参照してください)。
3. Zero standard ウェルに 50  $\mu$ l の Assay buffer を加えます。
4. 調製した各濃度の標準品をそれぞれのウェルに 50  $\mu$ l ずつ加えます(標準品の調製は‘標準品の調製’の項を参照してください)。
5. サンプル溶液をそれぞれのウェルに 50  $\mu$ l ずつ加えます。
6. プレートをシールで覆い、プレート振とう器を用いてサンプル溶液がシールにつかない程度に緩やかに振とうしながら室温で(20~28°C)で 1 時間反応させます。
7. 2. と同じ要領で洗浄します。
8. 全てのウェルに 50  $\mu$ l の酵素抗体液を加えます。(酵素抗体液の調製法は前項を参照してください)。
9. プレートをシールで覆い、プレート振とう器を用いてサンプル溶液がシールにつかない程度に緩やかに振とうしながら室温で(20~28°C)で 1 時間反応させます。
10. 2. と同じ要領で洗浄します。
11. 全てのウェルに 50  $\mu$ l の TMB substrate を加えます。
12. 室温(20~28°C)で正確に 20 分間静置します。振とうしないでください。
13. 全てのウェルに 50  $\mu$ l の Stop solution を加えます。
14. 30 分以内に 450nm の吸光度を測定します。

## 測定値の算出法

グラフ用紙を用意し、横軸に標準液の濃度を縦軸に各吸光度の平均値をプロットし、検量線を作成します。各サンプルの吸光度の平均値を用いて、標準曲線から求めた濃度と希釈倍率を掛け合わせた値がサンプルのビテロゲニン濃度(**ng/ml**)となります。

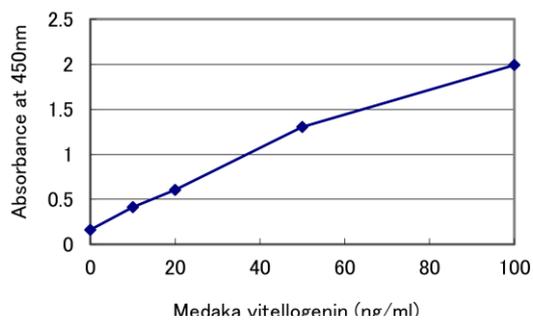


Figure 1. Typical standard curve

Table 1. Typical assay data

	Optical density	Zero standard subtracted
Zero standard	0.162	—
10ng/ml standard	0.412	0.250
20ng/ml standard	0.606	0.444
50ng/ml standard	1.303	1.141
100ng/ml standard	1.990	1.828

## システムの性能

### 特異性

この ELISA キットはメダカビテログニンに特異的です。メダカの他の血漿蛋白とは反応しません。

### 感度

2ng/ml

Zero standard(n=10)の吸光度から平均値と S.D.値を求め、平均値+2 x S.D.の吸光度を最低感度とし、標準曲線よりその濃度を算出しました。

### 再現性

#### 同時再現性

3種類のメダカ血漿をそれぞれ2重で合計10回測定したときのキットの同時再現性を示しています。

Table 2. 同時再現性

サンプル	平均値(ng/mL)	SD	CV(%)	n
高濃度	79.3	4.66	5.9	10
中濃度	38.3	2.37	6.2	10
低濃度	18.7	1.44	7.7	10

#### 日差再現性

3ロットのキットを使用して、3種類のメダカ血漿を2重で合計6回測定したときのキットの日差再現性を示しています。

Table 3. 日差再現性

サンプル	平均値(ng/mL)	SD	CV(%)	n
高濃度	75.1	1.66	2.2	6
中濃度	39.1	1.88	4.8	6
低濃度	17.4	1.49	8.5	6

### Precision profile

標準液を2重測定で6回測定を行い、各濃度の吸光度とその S.D.値から%CV を求めプロットしたものです。

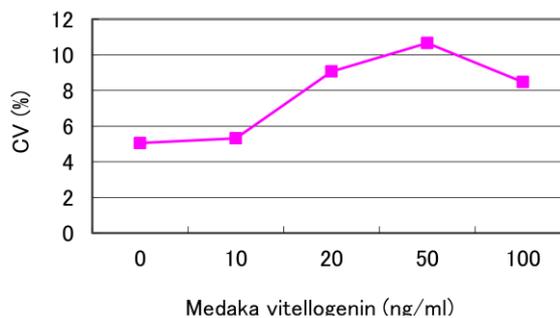


Fig.2 Precision profile

### 添加回収試験

メダカ血漿と既知濃度血漿 3 種類の 16, 34, 74 及び 0ng/ml を 1 : 1 の割合で混合したものをサンプルとして測定を行い、期待値に対する回収率を求めたものです。

Table 4. 添加回収試験

サンプル	添加量(ng/mL)	測定値(ng/mL)	期待値(ng/mL)	回収率(%)
1	0	34	34	-
	8	42	42	99.7
	17	53	51	105
	37	67	71	94.8
2	0	40	40	-
	8	44	48	91.9
	17	61	57	107
	37	76	77	98.4
3	0	13	13	-
	8	22	21	106
	17	34	30	111
	37	48	48	100
4	0	46	46	-
	8	56	54	103
	17	72	73	98.6
	37	84	83	101

### 希釈直線性

メダカ血漿 4 検体を Sample buffer により 20,40,80,160 倍 (サンプル 1~2) または 100,200,400,800 倍 (サンプル 3~4) 希釈し、その測定値から希釈直線性を示したものです。

Table 5. 希釈直線性

サンプル	希釈倍率	測定値(ng/mL)	期待値(ng/mL)	%
1	20	74.1	-	-
	40	39.4	37.1	106
	80	20.6	18.5	111
	160	9.0	9.3	97
2	20	71.4	-	-
	40	40.7	35.7	114
	80	20.2	17.9	113
	160	7.5	8.9	84
3	100	56.7	-	-
	200	31.0	28.4	109
	400	14.4	14.2	101
	800	6.8	7.1	96
4	100	70.1	-	-
	200	35.0	35.1	100
	400	16.6	17.5	95
	800	7.6	8.8	87

## 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 450nm になっていることを確認してください。
- 1.2) インキュベーション時間と温度を確認してください。
- 1.3) 使用前に試薬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。

### 2. 吸光度が高すぎる/zero standard 値が高すぎる

- 2.1) 洗浄の各ステップでウェルが洗浄液で満たされた後、完全に除かれていることを確認してください。
- 2.2) 洗浄操作後プレートを紙タオルに打ちつける等して洗浄液が完全に除かれていることを確認してください。
- 2.3) インキュベーション時間と温度を確認してください。
- 2.4) 試薬の調製法を確認してください。

### 3. 測定の精度、再現性が良くない

- 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) 標準溶液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。

製造元：

藤倉化成株式会社 メディカル材料部

〒340-0203 埼玉県久喜市桜田 5-13-1

Tel : 0480-57-1155

E-mail : ENBIO@fkkasei.co.jp