

プロトコール

Mylc ELISA (Human IL-6) Kit

Cat.No. M01MD02001

■本キットに含まれているもの

<冷凍製品保存品>

Mylc 細胞 (1×10^6 cells / vial 保証) 凍結 (-150°C以下)

NiSO₄ 溶液 (400 µg / mL) 凍結 (-20°C)

<冷蔵製品保存品>

培地 (100mL) 冷蔵

ELISA Kit (BioLegend Cat.No. 430507) 冷蔵

- Anti-Human IL-6 Pre-coated 96-well Strip Microplate
- Human IL-6 Detection Antibody
- Human IL-6 Standard
- Avidin-HRP A
- Assay Buffer A
- Wash Buffer (20X)
- Substrate Solution F (*)
- Stop Solution (**)
- Plate Sealers

有効期限：1年

■注意事項

凍結細胞が届いたら素早く -150°C以下に保存して下さい(一時的に-80°C保存は可能ですが、できるだけ早く-150°C以下に移動させてください)。

■禁忌事項

本製品は、単回での研究用評価のみに使用可能です。

臨床等での再生医療行為及び、他の使用は認められていません。

<必要な機器等>

1. 恒温槽
2. 遠心機
3. 顕微鏡
4. CO₂ インキュベーター
5. アスピレーター (手動でも可)
6. セルカウンター (手動でも可)
7. 96well プレート (平底)
8. 遠沈管
9. ピペット
10. マイクロピペット
11. 超純水
12. ボルテックスミキサー
13. マイクロプレートリーダー
14. マイクロプレートウォッシャー (手動でも可)
15. プレートシェーカー

<Mylc 培養と培養上清調整手順>

1. 冷蔵の培地を室温に戻して下さい。
2. 10 mL の培地を遠沈管に入れます。
3. 凍結細胞バイアルを取り出し、37°Cに温めた恒温槽に浸け、軽く振りながら1分以内に氷晶が大豆粒程度になるまで解凍します。
4. 手順 2 で用意した遠沈管に、バイアル中の細胞を素早く入れます。細胞のロスを少なくする為、培地でバイアル内を数回共洗いして下さい。
5. 遠心 (300×g、5分、室温) して下さい。
6. 少し培地が残る程度に、上清をアスピレーターで除去します。
7. 細胞ペレットの入っている遠沈管に培地を 10 mL 入れて穏やかにピペッティングし懸濁して下さい。
8. 手順 5 ~7 に続いて、手順 5~6 を行って下さい。(培地で2回洗浄します。)
9. 2回洗浄後、1 mL の培地で穏やかにピペッティングし、セルカウントして下さい。
10. 96 well プレートで培養する場合、 1×10^5 cells / mL に調製して下さい。
11. 調製した細胞懸濁液をよく混ぜ、96 well プレート (平底) に 1×10^4 cells / 100 μ L / well で播種して下さい。
12. 細胞懸濁液の入ったウェルに評価サンプルを 100 μ L 入れて下さい。
添付されている NiSO₄ 溶液 (400 μ g / mL) はポジティブコントロールとして同様に 100 μ L 入れて下さい。Mylc 細胞を NiSO₄ (最終濃度 200 μ g / mL) と共に 24 時間培養した場合、IL-6 の産生ピークが認められます。
13. CO₂ インキュベーター内で培養を開始します。
14. 培養後、上清を回収し、測定サンプルとして ELISA 測定して下さい

<ELISA 測定：試薬と測定サンプルの準備>

1. 使用前に全ての試薬を取り出し、室温に戻します。この際、全ての標準液とサンプルを 2~3 回、転倒混和することを強くお勧めします。また、各アッセイには標準曲線が必要です。
2. Wash Buffer (20×) を超純水で希釈します。例えば、50 mL の Wash Buffer (20×) を 950 mL の超純水に入れ、1L の Wash Buffer (1×) に調製します。Wash Buffer (20×) で結晶が形成された場合は、溶解するまで室温に戻して混和します。
3. 凍結乾燥した Human IL-6 Standard に、バイアルのラベルに示されている量の Assay Buffer A を加えて、20 ng / mL のストック溶液を調製します。調製したストック溶液を室温で 15~20 分間静置し、軽くボルテックスして完全に混合させます。
4. 希釈が必要な測定サンプルは、希釈液として Assay Buffer A を使用してください。

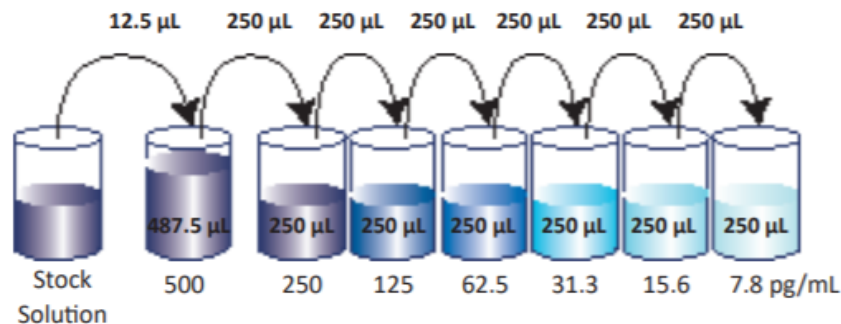
<ELISA 測定手順>

※ご使用にあたっての注意事項

異なるキットまたはロットの試薬を混合しないで下さい。異なるメーカーの試薬や抗体を

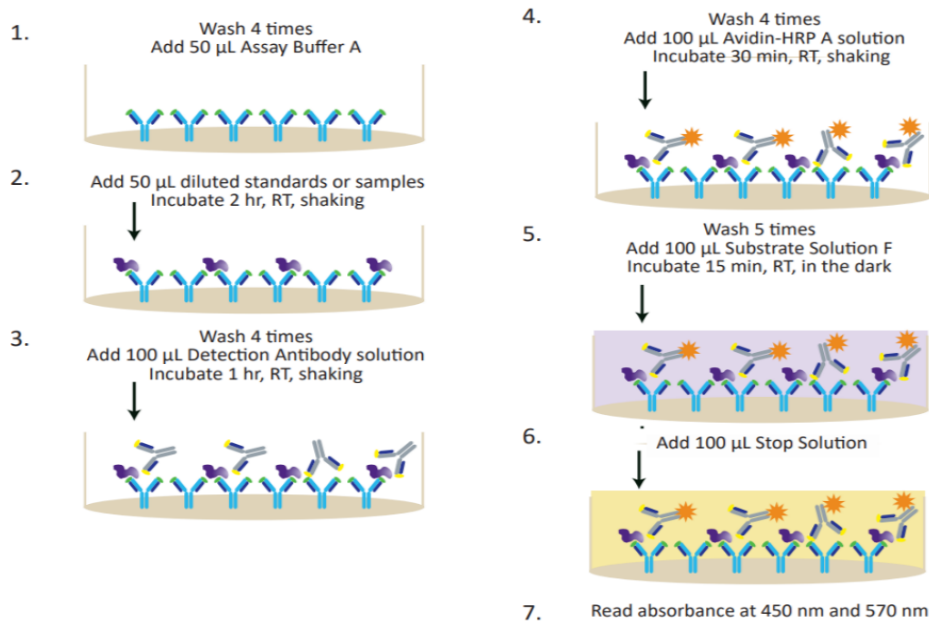
本キットで使用しないで下さい。

1. 全てのマイクロプレートストリップを使用しない場合、各ストリップを下から上に押し、余分なストリップを取り除きます。余分なストリップを付属の乾燥剤パックと一緒にホイルポーチに戻し、再度密封します。
2. 12.5 μL の Human IL-6 Standard (ストック溶液) を 487.5 μL の Assay Buffer A で希釈し、スタンダード溶液(500 pg / mL) を 500 μL 調製します。希釈液として Assay Buffer A を使用し、上記で作製した 500 pg / mL スタンダード溶液の 2 倍連続希釈を別々のチューブを使用して 6 回実行します。したがって、7 個のチューブ内のスタンダード濃度は、それぞれ 500 pg / mL、250 pg / mL、125 pg / mL、62.5 pg / mL、31.3 pg / mL、15.6 pg / mL、および 7.8 pg / mL となります。何も混ぜていない Assay Buffer A を (0 pg / mL) として使用します。



3. ウェルごとに 300 μL の Wash Buffer (1 \times) でプレートを 4 回洗浄し、吸収紙にプレートを上下逆にしてしっかり叩き、残っているバッファを吸い取ります。その後の洗浄は全て同様の操作を行う必要があります。
4. すべてのウェルに 50 μL の Assay Buffer A を入れます。
5. 50 μL の標準希釈液または測定サンプルを適切なウェルに入れます。
6. キットに含まれるシールでプレートを密封し、プレートシェーカーで 200 rpm で振とうしながら、室温で 2 時間インキュベートします。
7. ステップ 4 と同様に Wash Buffer (1 \times) でプレートを 4 回洗浄します。
8. 100 μL の Human IL-6 Detection Antibody を各ウェルに加え、シールでプレートを密封し、振とうしながら室温で 1 時間インキュベートします。
9. ステップ 4 と同様に Wash Buffer (1 \times) でプレートを 4 回洗浄します。
10. 100 μL の Avidin-HRP A を各ウェルに加え、シールでプレートを密封し、振とうしながら室温で 30 分間インキュベートします。
11. プレートを Wash Buffer (1 \times) で 5 回洗浄します。最後 (5 回目) の洗浄では、ウェルを Wash Buffer (1 \times) に 30 秒から 1 分間浸します。この操作により、バックグラウンドを最小限に抑えることができます。
12. 100 μL の Substrate Solution F を各ウェルに加え、暗所で 15 分間インキュベートします。humanIL-6 を含むウェルは、その濃度に比例した強度で青色に変化します。この操作でシールによるプレート密封の必要はありません。
13. 各ウェルに 100 μL の Stop Solution を加えて反応を停止します。溶液の色が青から黄色に変化します。
14. ステップ 14 の操作から 30 分以内に 450 nm の吸光度測定を行います。(参照波長: 570 nm)。

<手順の概要>



〈取り扱い注意事項〉

1. NiSO_4 溶液は、摂取・吸入または皮膚からの吸収により有害となる場合があります。目、手、顔の保護具を着用して下さい。詳細については、MSDS を参照して下さい。
2. 防腐剤を含む試薬は、摂取・吸入または皮膚からの吸収により有害となる場合があります。詳細については、MSDS を参照して下さい。
3. Substrate Solution F(*)は、吸入または摂取すると有害です。皮膚、目、衣服への接触を避けて下さい。
4. 感染性物質の血液媒介感染の可能性を減らす為に、NCCLS 規制に従ってすべての血清、血漿およびその他の体液を処理して下さい。
5. Stop Solution(**)には強酸が含まれています。目、手、顔の保護具を着用して下さい。
6. プレートを廃棄する前には、過剰量の水道水で洗い流して下さい。

《本製品に関するお問い合わせ》

マイキャン・テクノロジーズ株式会社

〒615-8245 京都府京都市西京区御陵大原 1-36 京大桂ベンチャープラザ

担当：品質保証部担当者

【Tel】 075-381-3008

【E-mail】 info2@micantechnologies.com

【URL】 <http://www.micantechnologies.com/>