

TRX ELISA Kit

【はじめに】

ヒトチオレドキシン(TRX)は、成人T細胞白血病(adult T cell leukemia: ATL)の研究過程で1989年淀井淳司らによりATL由来因子(ATL-derived factor: ADF)として遺伝子クローニングされた、分子量約12kDa、アミノ酸105個の蛋白質です。TRXは大腸菌からヒトまでよく保存された活性部位をもち、種を超えて生体内外の酸化・還元(レドックス)制御に重要な役割を果たしています。TRXは酸化ストレスなど種々のストレスで誘導、放出され、これらのストレスに対する防御タンパク質としての働きを持ち、血清/血漿TRX値は種々の疾患において酸化ストレスの良い指標となることが報告されています。

TRX ELISA Kitは、異なるエピトープを認識する2種のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法にて、ヒトTRXを測定する試薬です。

本試薬では、ヒトTRX1のみ検出し、ミトコンドリア由来のTRX2、ヒト以外のTRX1は検出しません。

【測定原理】

TRX ELISA Kitは、異なるエピトープを認識する2種のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法にて、ヒトTRXを測定する試薬です。抗ヒトTRXモノクローナル抗体を感作したマイクロウェルに、サンプルを添加し、抗原-抗体反応をさせます。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトTRXモノクローナル抗体を添加して反応させ、抗体-抗原-標識抗体の複合物を形成させます。洗浄後、基質溶液(TMB)を添加し、酵素(ペルオキシダーゼ)により発色させ、反応停止後、吸光度(A450)を測定してヒトTRXを検出します。

【キット構成】

Material	Quantity
	96tests
① Assay diluent	40ml × 1 vial
② TRX calibrator (Lyophilized)	2vials*
③ Microwell strips coated with anti-TRX antibody	8-well strip × 12strips
④ Conjugate reagent (Peroxidase conjugated anti-TRX monoclonal antibody) × 101 conc.	0.3ml × 1 vial
⑤ Conjugate diluent	14ml × 2 vials
⑥ Substrate reagent	20ml × 1 vial
⑦ Stop solution (0.25mol/L H ₂ SO ₄ irritant)	15ml × 1 vial
⑧ 10× Wash concentrate	100ml × 1 vial
⑨ Plate for sample dilution	96wells(1sheet)

*Quantity of reconstituted TRX calibrator is printed on the label.

準備するもの

- ・ マイクロプレートリーダー
- ・ プレートウォッシャーまたは洗浄びん
- ・ マイクロピペット
- ・ マルチチャンネルマイクロピペット
- ・ マイクロプレートホルダー
- ・ ダミーのマイクロウェル(自動洗浄機使用時)
- ・ リザーバー

【操作法】

■ 試薬の調製

1. 洗浄液

⑧10× Wash concentrate (10× 洗浄濃縮液) 100 ml を蒸留水 900 ml と混ぜて希釈します。

2. 標準液

正確な測定をするためには各アッセイごとに標準液を調製します。

- a) ②TRX calibrator (TRX キャリブレーター)を①Assay diluent (アッセイ希釈液) 1000μl で溶解

します。

- b) 溶解したキャリブレーターを①Assay diluent (アッセイ希釈液)で段階的に希釈して下さい。標準液として6サンプル用意することをお勧めします。0 ng/mlの標準液としては①Assay diluent (アッセイ希釈液)を使用してください。

3. 標識抗体液

④Conjugate reagent (ペルオキシダーゼ標識抗 TRX モノクローナル抗体)は使用直前に希釈して下さい。④Conjugate reagent (ペルオキシダーゼ標識抗 TRX モノクローナル抗体)と⑤Conjugate diluent (標識抗体希釈液)を1:101の比で混合します(例えば④Conjugate reagent (ペルオキシダーゼ標識抗 TRX モノクローナル抗体)10 μ lを⑤Conjugate diluent (標識抗体希釈液)1000 μ lに添加します)。

*希釈した標識抗体は不安定なので、一回のアッセイに必要な分だけ標識抗体液を調製するようにして下さい。

*微生物や金属イオンの混入を避けるため新しいチップと容器を使用して下さい。

4. 他の試薬

(③Microwell strips coated with anti-TRX antibody (抗 TRX 抗体をコーティングしたマイクロウェルストリップ)、⑥基質溶液、及び⑦反応停止液)はそのままお使い下さい。

■ 操作法の概略

⑨Plate for sample dilution (希釈調製用プレート)に TRX 標準液或いはサンプルを①Assay diluent (アッセイ希釈液)と 1:10 の比で(例えば TRX 標準液或いはサンプル 25 μ l を①Assay diluent (アッセイ希釈液) 250 μ l に)希釈します。

↓

希釈した TRX 標準液或いはサンプル 220 μ l/well を③Microwell strips coated with anti-TRX antibody (抗 TRX 抗体をコーティングしたマイクロウェルストリップ)に添加します。

↓

インキュベーション(2時間、25 $^{\circ}$ C)

↓

洗浄 300 μ l/well x 5 回

↓

標識抗体液 200 μ l/well

↓

インキュベーション(2時間、25 $^{\circ}$ C)

↓

洗浄 300 μ l/well x 5 回

↓

⑥Substrate reagent (基質溶液) 100 μ l/well

↓

インキュベーション(30 分、25 $^{\circ}$ C)

↓

⑦Stop solution (反応停止液) 100 μ l/well

↓

吸光度測定(450/620 nm)

【操作上の留意点】

- (1) キットの構成は、室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)に戻してから使用して下さい。
- (2) 抗体感作マイクロウェルは湿気を嫌いますので、十分室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)に戻してから開封して下さい。また、開封後はアルミ袋のチャックを確実に締めて保存して下さい。
- (3) 検体は新鮮なものを用いて下さい。検体を保存する場合は、小分けして-20 $^{\circ}$ C以下で凍結保存して下さい。また、凍結融解のくり返しは避けて下さい。
- (4) ⑧10 \times Wash concentrate (10 \times 洗浄濃縮液)は、2~8 $^{\circ}$ Cに保存したとき、白濁が認められる場

合がありますが、試薬性能に影響はありません。調製時、十分溶解してから使用して下さい。

- (5) 本試薬の構成品のうち、Assay diluentには0.09%アジ化ナトリウム(NaN_3)を添加してあります。濃度は0.09%ですので毒物には該当しませんが、過って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば、医師の手当てを受けて下さい。また、アジ化ナトリウムは、配管中で爆発性のアジ化銅やアジ化鉛を形成することが報告されています。これらの物質の形成を防ぐため、アジ化ナトリウムを含んだ廃液は十分量の水で洗い流して下さい。
- (6) 本試薬の構成品のうち、Stop Solutionには、0.25mol/L硫酸(H_2SO_4)を用いています。使用の際には十分注意して取り扱って下さい。
- (7) 本試薬は研究用試薬です。ヒトの体内に用いたり、診断の目的に使用しないで下さい。

【参考文献】

Kogaki, et al. J. Clin. Lab. Anal. 10:257-260, 1996

Nakamura, et al. Int. Immunol. 8:603-611, 1996

Nakamura, et al. Cancer Det. Prev. 24:53-60, 2000

レドックス・バイオサイエンス株式会社
〒606-8396 京都市左京区川端通丸太町下
る下堤町 82-1 恵美須ビル 3 階

TEL:075-762-1770,

FAX: 075-762-1775

E-MAIL:info@rbs-i.com

URL:<http://www.rbs-i.com>