

*本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用しないで下さい。

*下記 web 上に掲載しているプロトコールの最新版を確認の上、操作して下さい。

<https://www.cellspect.com>

【測定の意義】

生体は、エネルギー産生に酸素を利用し、その過程において活性酸素を生成します。活性酸素は DNA、細胞等を傷つけ、種々の臓器障害を惹起します。そのため生体は抗酸化物質を合成し、また外部から摂取することによって活性酸素を捕捉し、その傷害から生体を防御しています。抗酸化物質と活性酸素のバランスが崩れると酸化ストレスとなり、動脈硬化やアルツハイマーなど、様々な疾病の原因となります。

ヘム代謝物である胆汁色素の一つ、ビリルビンは生体内の強力な低分子抗酸化物質です。ビリルビンは抗酸化栄養素とは異なり摂取量による変動が無いため、血中濃度は通常一定です。また、ビリルビンは分子内水素結合を形成する特異な分子構造のため、疎水性から親水性への相互変換が可能であり、細胞膜を自由に通過します。このため、血液循環系に限らず、組織や細胞内にも普遍的に存在する理想的な低分子抗酸化物質です。

バイオピリンは、自殺的抗酸化物質であるビリルビンが活性酸素と反応した際に生じる最終酸化産物です。バイオピリンは、ビタミン C や E など他の抗酸化栄養素とは異なり、生体中のレドックス環境によりビリルビンに還元されることはなく、速やかに尿中に排泄されます。このため、酸化ストレスにより消費されるビリルビン量の増加は、尿中バイオピリン量の増加として現れます。これらの特徴から、バイオピリンは、生体内のレドックス状態を示すリアルタイム型の酸化ストレスマーカーとして期待されています。尿中バイオピリンレベルは外科的ストレス、虚血性心疾患、敗血症、心身症および心理的・社会的ストレスなどに応答すると報告されています。

【測定原理】

本キットはビリルビンとその酸化代謝物であるバイオピリンに特異的である抗ビリルビンモノクローナル抗体 24G7 を用いた競合法 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) キットです。

- ① HRP (Horseradish peroxidase) 標識抗体と、試料中のバイオピリンとを反応させます。
- ② 反応液を、抗原を固相化したウェルに移します。未反応な標識抗体が抗原を介してウェルに結合します。
- ③ ウェルに結合しなかった抗体を洗浄操作により除去します。
- ④ 発色基質を加え、吸光度を測定し、検量線よりバイオピリン濃度を求めます。

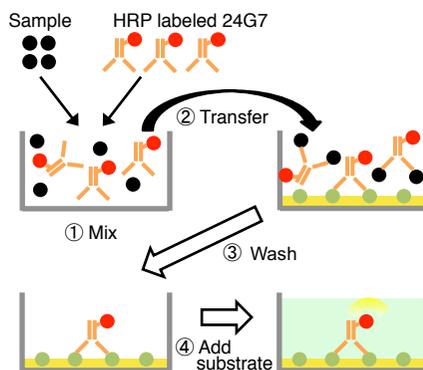


図 1 : 測定概略

【キット内容】

合計 96 測定分 (商品コード: BP01D)		
1.	抗原固相化プレート	×1
2.	前処理用プレート	×1
3.	HRP 標識 24G7 抗体 (100×)	0.15 mL×1
4.	抗体希釈液	15 mL×1 ●
5.	発色基質 (TMB)	12 mL×1 遮光ボトル
6.	標準試料: ビリルビン (濃度は遮光袋ラベルに記載*)	×1 遮光バイアル
7.	試料希釈液	8 mL×1 ●
8.	洗浄液 (20×)	37.5 mL×1 ●
9.	反応停止液 (1 mol/L 硫酸)	12 mL×1 ●
10.	マイクロプレートシール	×1
11.	標準試料調整用遮光チューブ	×7

※ 1 u は、抗ビリルビンモノクローナル抗体 24G7 エピトープ 1 μmol に相当します。ビリルビンとバイオピリンはともに 24G7 エピトープを一つずつ持ちます。このため、トレーサビリティの確実なビリルビンを標準試料として用いています。

【キット以外に必要な器具・試薬】

- マイクロプレートリーダー
- マイクロピペットおよびチップ
- マルチチャンネルピペット
- メスシリンダー
- サンプルチューブ
- マイクロプレートシェーカー
- ペーパータオル
- マルチチャンネルピペット用 リザーバー
- 精製水

【測定試料の注意点】

- 尿サンプルは新鮮なもの又は-20°C 以下で遮光保存したものを使用して下さい。保存料は使用しないでください。
- サンプルはタンパク質低吸着タイプのチューブに採取してください。
- サンプルに浮遊物や沈殿物が見られる場合は、遠心分離を行い、上清をアッセイ検体としてください。
- サンプル中のビリルビンは正の誤差を与えます。
- 本法は、その得られる数値を保証するものではありません。

【操作方法】

※標準試料や抗原固相化プレート、発色基質、反応中のプレートを遮光してください。

1. 試薬の調製

(1) 標準試料の調製

・標準試料の溶解

標準試料のボトルに、1 mL の試料希釈液を添加し、30 分静置して完全に溶解させます。溶解後の標準試料は、標準試料ボトルが入っている遮光袋に記載の濃度となりますので、6.4u/L となるよう、適に試料希釈液で希釈してください。(溶解させた後は遮光して冷蔵保存し、当日中に使用しない場合は冷凍して保管してください)

・検量線試料の調製

調製した標準試料(ビリルビン 6.4 u/L)を試料希釈液にて 2 倍 (3.2 u/L)、4 倍 (1.6 u/L)、8 倍 (0.8 u/L)、16 倍 (0.4u/L)、32 倍希釈 (0.2 u/L)、64 倍希釈 (0.1 u/L)して、スタンダードを調製します(調整には付属の遮光チューブをご使用ください)。検量線には 0.1 u/L から 6.4 u/L を使用します。

(2) サンプルの調製

サンプルを試料希釈液で 4 倍以上に希釈します。

(3) HRP 標識 24G7 抗体試薬の調製

HRP 標識 24G7 抗体 (100×) 全量を抗体希釈液のボトルへ添加します。

(4) 洗浄液の調製

洗浄液 (20×) 全量を精製水で 20 倍に希釈します。

2. 測定方法

(1) 試料希釈液、各検量線試料、サンプルを前処理用プレートのウェルに 20 μ L ずつ分注します。(各検体 2 ウェルずつ)。

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

▲ : 試料希釈液
● : 検量線試料
(ビリルビン濃度)
① : 0.1 u/L
② : 0.2 u/L
③ : 0.4 u/L
④ : 0.8 u/L
⑤ : 1.6 u/L
⑥ : 3.2 u/L
⑦ : 6.4 u/L
○ : サンプル

図 2 : プレート上のサンプル・検量線試料配置例

(2) (1)の各ウェルに、HRP 標識 24G7 抗体試薬 120 μ L を添加し、ピペティング等でよく攪拌します。マイクロプレートシールを貼り付け、遮光して室温で 1 時間反応させます。

(3) (2)の反応時間終了直前に、抗原固相化プレートのウェルを必要量バックから取り出し、希釈済みの洗浄液にて洗浄します。

※洗浄操作

A) 洗浄液 300 μ L をウェルに添加します。

B) 洗浄液を廃棄します。

C) A)および B)を 2 回繰り返します (合計 3 回)。

D) ペーパータオルに叩きつけるようにしてしっかりと液を切ります。

(4) (2)の反応液 100 μ L を、洗浄済みの(3)のプレートに添加します。マイクロプレートシェーカーで振とうした後、遮光して室温で 30 分間反応させます。

(5) (4)の反応液を廃棄し、(3)と同様に洗浄します。

(6) 発色基質 100 μ L を(5)の各ウェルに添加します。マイクロプレートシェーカーで振とうした後、遮光して室温で 30 分間反応させます。

(7) 反応停止液 100 μ L を(6)の各ウェルに添加します。

(8) 450 nm の吸光度を測定します。

3. 測定値の算出

(1) 検体ごとに吸光度の平均値を求めます。

(2) 検量線試料のバイオピリン濃度に対する吸光度をプロットし、検量線を作成します。

(3) 検量線よりサンプルのバイオピリン濃度を読み取ります。

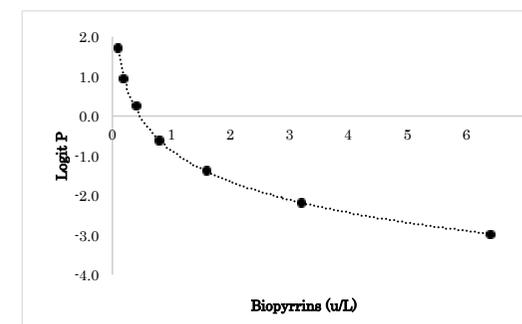
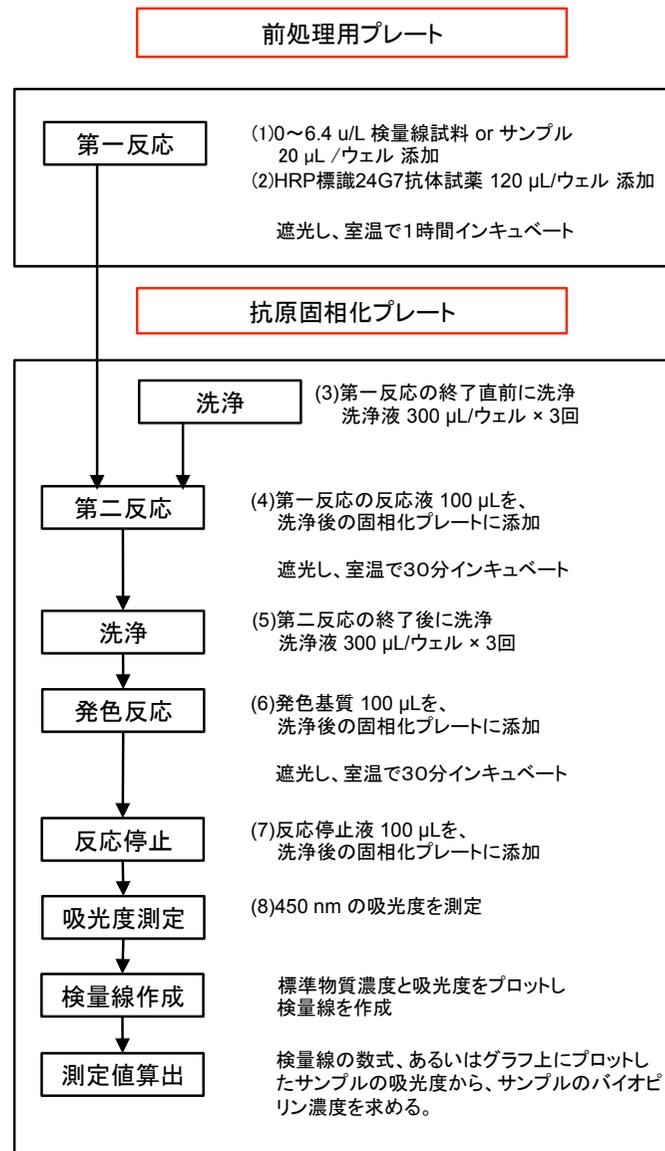


図 3 : 検量線の例

※標準試料や抗原固相化プレート、発色基質、反応中のプレートを遮光してください。

バイオピリン ELISA 測定フローチャート



【測定の注意点】

- 測定試料の取り扱い
 - サンプルは採取後、すみやかに測定または凍結保存 (-20℃以下・遮光) してください。凍結融解を繰り返さないでください。
 - サンプルはタンパク質低吸着タイプのチューブに採取してください。
 - サンプル中のビリルビンは正誤差を与えます。
 - 浮遊物や沈殿物が見られる場合は遠心分離を行い、上清をアッセイ検体としてください。
- 測定
 - 標準試料や抗原固相化プレート、発色基質、反応中のプレートを遮光してください。
 - 別ロットの試薬は使用しないでください。
 - 検量線は測定毎に作成してください。
 - 洗浄後の抗原固相化プレートは、測定終了まで乾燥させないでください。
 - 抗原固相化プレートは、底面に抗原が固相化されていますので、ピペットとの接触によって抗原がはがれると、ばらつきの原因になります。ピペットがプレートの底面や壁面に触れないようにしてください。
 - プレートの温度のムラは測定値のばらつきの原因となります。
 - A) 試薬及びプレートは、必ず室温(20~25℃)に戻してから使用して下さい。
 - B) 反応は必ず室温で行ってください。また、室内でも温度差や風当たりなどで、温度ムラの生じる箇所があります。エアコンの吹き出し口近辺などの温風や冷風の当たる場所、熱源近辺、窓際などの日光の当たる場所などでは使用しないでください。
 - C) 長時間プレートに触っていると、プレートが温まりプレート内で温度差が生じます。プレートにはなるべく接しないようにしてください。
 - 試薬は順番通り、正確なタイムコースで滴下して下さい。また、反応時間は正確にとってください。
 - 停止液は強酸です。取り扱いには十分に注意して下さい。
- 本キットを分割使用する際の注意
 - 標準試料は当日中に使用しない場合、キャップをしっかりと閉め、冷凍保存してください。希釈した検量線試料は廃棄し、再調整して下さい。
 - 標準試料以外の試薬は、しっかりとキャップを閉め、冷蔵保存して下さい。
 - 未使用の抗原固相化プレートは、乾燥剤を同封の上、遮光してチャック袋で保管してください。
 - 標準試料以外の試薬・抗原固相化プレートは開封後冷蔵で一週間保管が可能です。

【製品仕様】

測定範囲： 0.1 ～ 6.4 u/L

(1u は、抗ビリルビンモノクローナル抗体 24G7 エピトープ 1 μmol に相当します)

アッセイ数：96 well

測定方法： ELISA 法

測定波長：450 nm

測定試料：尿

【参考文献】

- 1.) Yamaguchi, T., Shioji, I., Sugimoto, A., Komoda, Y., & Nakajima, H. Epitope of 24G7 anti-bilirubin monoclonal antibody. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1289(1), 110-114. 1996

【製造販売業者】

セルスペクト株式会社 岩手県盛岡市北飯岡 2-4-23

※Metallogenics™およびレドックスアッセイ™は、セルスペクト（株）の 試薬キットの名称です。

問い合わせ先

セルスペクト株式会社

〒020-0857 岩手県盛岡市北飯岡 2-4-23

TEL： 019-134-6616

FAX： 019-903-0559

e-mail： support@cellspect.com

URL： <https://www.cellspect.com>

※ 取扱説明書、測定プロトコール等、製品に関する最新の情報は、下記弊社 website の商品詳細ページで御確認下さい。

<https://www.cellspect.com/>

※ 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではありません。あらかじめご了承ください。

※ 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダーを用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承ください。

※ 品質に関してのお問い合わせの際は試薬キット包装袋に貼付の Lot No. をご確認の上、お問い合わせ下さい。

※ 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコールは予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切にご使用下さい。

※ 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については付属の製品安全データシート（MSDS）に従って下さい。