

Human Apoptosis Inhibitor of Macrophage (hAIM) 測定用 ELISA キット

序論

AIM (apoptosis inhibitor of macrophage)は、マクロファージから産生され血中に存在するタンパク質で、脂肪細胞やマクロファージ自身などに作用します¹⁾。AIM は、脂肪細胞に蓄積した中性脂肪を分解したりマクロファージの細胞死を抑制することなどにより、肥満、動脈硬化、糖尿病など様々な生活習慣病の病態に強い関連が認められます²⁻⁵⁾。近年では、肥満に伴う自己免疫疾患の発症機序に AIM が関わっていることが明らかにされています⁶⁾。このように、血中 AIM 量は現代社会で問題となっている種々の疾患の病態と関連しており、その測定が生活習慣病の診断・治療法の研究に有用である点が示唆されています。AIM は血中で IgM と結合しているため、抗体によっては正確な AIM 量が測定できない場合がありますが、本キットで用いる抗体は、IgM の影響を受けることなく、正確な AIM 量を測定することができます⁷⁾。

測定原理

本キットは、ヒト AIM(hAIM)タンパク質を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法による測定システムです。マイクロプレートには既に hAIM 特異抗体が固相化されています。

キャリブレーター及び、検体(細胞株の培養上清や血清などの生体試料)中の hAIM は、マイクロプレートの各ウェルに固相化された抗体と特異的に結合します。続いて、ビオチン標識された hAIM 特異抗体、さらに HRP 標識アビジンと反応させます。最後に、発色基質液(TMB)を添加し反応させることで、試料中の hAIM 量に応じた発色が得られます。硫酸で酵素反応を停止させたのち、一般的なプレートリーダーを用いて主波長 450nm(副波長 650nm 付近)で測光します。キャリブレーターを用いて検量線を作成し、試料の測定吸光度を検量線に代入することによって、試料中の hAIM 濃度を求めることができます。

キットの構成

○ 抗体固相化プレート	--- 1 枚 (6 ストリップ)
○ ビオチン標識抗体 (30 倍)	--- 1 本 (200 μ L)
○ HRP 標識アビジン (30 倍)	--- 1 本 (200 μ L)
○ 抗体希釈液	--- 1 本 (12 mL)
○ サンプル希釈液	--- 1 本 (30 mL)
○ 濃縮洗浄液 (20 倍)	--- 1 本 (30 mL)
○ TMB 基質液	--- 1 本 (12 mL)
○ 反応停止液 (硫酸)	--- 1 本 (12 mL)
○ hAIM 標準品 (凍結乾燥品)	--- 1 本 (使用直前に精製水 250 μ L を添加)

測定に必要なもの

- マイクロプレートリーダー(測定波長:450 nm [副波長 650nm 付近])
- ピペットあるいは、マルチチャンネルピペットと使い捨てチップ(10-1000 μ L が測り取れるもの)
- 希釈操作の容器(タンパク低吸着性)
- 洗浄液調製用のメスシリンダーあるいは、ビーカー(500 mL 容量)
- 精製水

操作上の注意

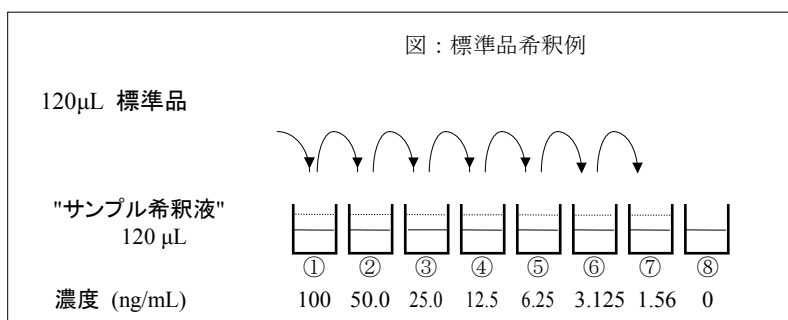
- 他のロットの試薬を混合して使用しないで下さい。
- 希釈調製した試薬は、当日中にご使用ください
- 操作を途中で中断しないで下さい。また、操作中のウェルを乾燥させたまま放置しないでください。
- 場合により、反応中の乾燥を防ぐ目的でプレートカバーを御用意ください。
- 検体および標準品の測定は、二重測定を推奨します。

サンプルの準備


細胞株の培養上清や血清などの生体試料は、任意の倍率までサンプル希釈液で希釈します。
血清の希釈の目安は、500~1000 倍です。

試薬の準備

- ビオチン標識抗体液
200 μ L の HRP 標識特異抗体を 5800 μ L の抗体希釈液で希釈し、6.0 mL 溶液とします
- HRP 標識アビジン溶液
200 μ L の HRP 標識特異抗体を 5800 μ L の抗体希釈液で希釈し、6.0 mL 溶液とします
- 洗浄液
25 mL の濃縮洗浄液を脱イオン水で希釈し、500 mL とします。
- hAIM キャリブレーター
hAIM 標準品を 250 μ L の精製水で完全に溶解します。この溶解液の hAIM 濃度は 200ng/mL となります。
希釈用チューブを 8 本用意し、それぞれへサンプル希釈液を 120 μ L ずつ添加します。うち 7 本のチューブを用いて、hAIM 標準品の 2 倍段階希釈を行い、以下のキャリブレーターを作成します。
#1; 100 ng/mL, #2; 50.0 ng/mL, #3; 25.0 ng/mL, #4; 12.5 ng/mL, #5; 6.25 ng/mL, #6; 3.125 ng/mL,
#7; 1.5625 ng/mL, #8; 0 ng/mL



測定方法

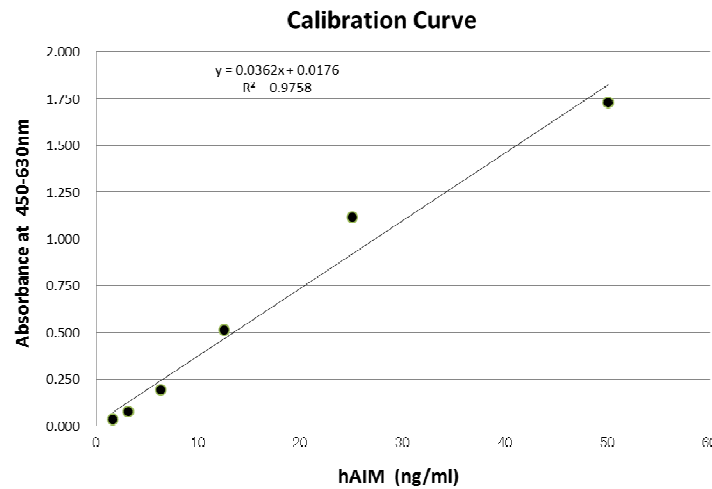
1. 300 μ L の洗浄液をウェルに添加し、常温(25°C)で 20 分間 浸漬します。(以降、 Flowchart 参照)
2. 300 μ L の洗浄液で 3 回、ウェルを洗浄し、液滴が残らないようにタッピングします。
3. 50 μ L ずつのキャリブレーター及び、検体を抗体固相化プレートのウェルに添加し、37°Cで 1 時間インキュベートします。
4. ウェルの洗浄操作を、2.と同様に行います。
5. 50 μ L のビオチン標識抗体液をウェルに添加し、37°Cで 1 時間インキュベートします。
6. ウェルの洗浄操作を、2.と同様に行います。
7. 50 μ L の HRP 標識アビジン溶液をウェルに添加し、37°Cで 1 時間インキュベートします。
8. ウェルの洗浄操作を、2.と同様に行います。
9. 100 μ L の TMB 基質液をウェルに添加後、遮光し、常温(25°C)で 10 分間インキュベートします。
10. 100 μ L の反応停止液をウェルに添加します。
11. プレートリーダーを用いて波長 450nm (副波長 650nm)で測光します。

 : Flowchart

	Test Sample	Standard	Test Sample Blank	Reagent Blank
Reagents	Test sample 50 μ L	Diluted Standard (Tube-1~-7) 50 μ L	Sample buffer (Tube-8) 50 μ L	Sample buffer 50 μ L
Incubation for 1 hour at 37°C with plate lid				
Washing 3 times				
Biotinylated Antibody	50 μ L	50 μ L	50 μ L	—
Incubation for 1 hour at 37°C with plate lid				
Washing 3 times				
HRP-labeled Avidin	50 μ L	50 μ L	50 μ L	—
Incubation for 1 hour at 37°C with plate lid				
Washing 3 times				
Chromogen	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubation for 10 minutes at room temperature (shielded)				
Stop solution	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Read the plate at \sphericalangle 450nm -650nm within 30 minutes after application of Stop solution				

濃度の計算

hAIM 濃度は、ほとんどのマイクロプレートリーダーに内蔵されている計算プログラムを用いて算出することができます。あるいは、測定された吸光度を検量線に代入することにより、試料中の hAIM 濃度を求めることができます。



キットの性能

同時再現性 (n = 10); CV < 10%

日間再現性 (n = 10); CV < 10%

貯法

構成は 2-8°C 保存品です。

キットの有効期限は外箱に表示してあります。

使用上の注意

- 2-8°C で保存してください。
- 本品は研究用試薬です。臨床上の診断などの目的にはご使用になれません。
- 試薬の取り扱いには十分気をつけてください。特に、硫酸および基質液は、皮膚や着衣についたり、目や口に入らないようにしてください。
- 生体試料の取り扱いには、感染等に十分注意してください。
- キットは定められた条件下で適切に保管し、有効期限内にご使用ください。
- 使用後の容器および廃液は、各自治体の規定に従って処理して下さい。

参考文献

- 1) Miyazaki, T. et al (1999) J. Exp. Med 189: 413-422.
- 2) Arai, S. et al. (2005) Cell Metab. 1: 201-213.
- 3) Kurokawa, J. et al. (2010) Cell Metab. 11: 479-492.
- 4) Kurokawa, J. et al. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108: 12072-12077.
- 5) Miyazaki, T. et al. (2011) Cir. J. 75: 2522-2531.
- 6) Arai, S., et al. (2013) Cell Rep., 3: 1187-98.
- 7) Oba, M. et al. (2012) Seikagaku 84: 588-591.

製造元

 株式会社トランスジェニック

〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 7-1-14

TEL: 078-306-0295 FAX:078-306-0296

URL: <http://www.transgenic.co.jp> techstaff@transgenic.co.jp