

ジチロシン(DT)測定キット使用説明書

本キットは、ジチロシン (Dityrosine : DT) に特異的なモノクローナル抗体を使用する ELISA キットで、DT の簡便な測定を可能にするものです。本キットは研究用試薬です。研究以外の用途 (臨床検査/診断/医療行為等) には使用できません。

1. キットの構成

① DT Microtiter Plate	: DT 固相化プレート(8×12 ウェル、分割式)	1 枚
② Primary Antibody	: 一次抗体試薬	1 本 (約 7mL)
③ Secondary Antibody	: 二次抗体 (凍結乾燥品)	1 本
④ Secondary Antibody Solution	: 二次抗体溶解液	1 本 (約 12mL)
⑤ TMB Substrate	: 発色試薬	1 本 (約 12mL)
⑥ Stop Solution	: 反応停止液	1 本 (約 12mL)
⑦ Washing Solution (x5)	: プレート洗浄原液 (5 倍濃縮)	3 本 (約 25mL/本)
⑧ DT Standard	: DT スタンダード (A: 0.05, B: 0.2, C: 0.5, D: 2, E: 5, F: 12 μ mol/L)	各 1 本 (約 0.5mL)
⑨ プレートシール		2 枚

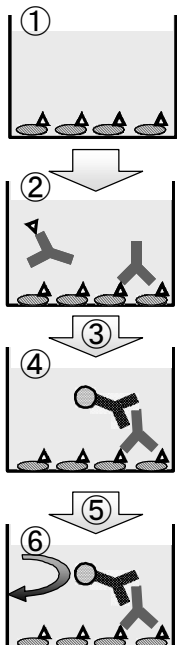
- ・貯蔵……………冷蔵 (2~8℃。凍結させないこと)
- ・有効期間……………外箱側面に記載
- ・測定範囲……………0.05~12 μ mol/L

2. 必要な主要機器および器具

①蒸留水	: プレート洗浄液の調製
②生理食塩水 (0.9% NaCl)	: サンプル希釈用
③10~50 μ l 用マイクロピペット及びチップ	: 試薬の分注
④8 チャンネルマイクロピペット及びチップ (50~250 μ l)	: 試薬の分注
⑤8 チャンネルマイクロピペット用トレイ	: 試薬の分注
⑥低温インキュベーター (4~10℃) または冷蔵庫	: 1 次抗体反応用
⑦マイクロプレートリーダー (測定波長 450nm)	

3. 測定原理

(図 1)



- ① DT を固相化したマイクロプレートを用意します。
- ② 測定対象となるサンプルまたは DT スタンダードと一次抗体試薬を分注します。一次抗体には、DT に特異的に結合するマウス由来モノクローナル抗体が使用されており、固相化 DT とサンプル中の DT とが競争的に結合します。その結果、サンプル中の DT 濃度が高いと一次抗体がより多くサンプル中の DT に結合し、その分固相化 DT に結合する一次抗体量が減少します。
- ③ 洗浄によりサンプル中の DT と結合した一次抗体が除去され、固相化 DT に結合した一次抗体のみがマイクロプレート内壁に残ります。
- ④ 続いて 2 次抗体を加えます。この 2 次抗体は HRP 標識された、抗マウス IgG 抗体であり、マイクロプレート内壁に結合した一次抗体に結合します。
- ⑤ 洗浄により、余剰な二次抗体を除去します。
- ⑥ 発色試薬を加えると、2 次抗体の HRP 標識酵素の作用により青色の発色が起こります。
- ⑦ 反応停止試薬を加えることで発色反応を停止させ、450nm の波長で吸光度を測定します (反応液は黄色になります)。サンプル中の DT 濃度が高いほど、吸光度は低く (黄色が薄く) になります。この黄色の濃さからサンプル中の DT 濃度を算出します。

4. サンプルの前処理

尿サンプルの測定：

生理食塩水にて4倍希釈をお勧めします。不溶物がある場合は、予め遠心により除去してください。

※希釈にはプレート洗浄液は使用できません。必ず生理食塩水 (0.9% NaCl/蒸留水) を用いてください。

5. 実験操作

以下の実験操作は、キットを常温に戻してから行ってください。分割使用する場合には、今回使用するウェル以外は、予めフレームから取り外しておき、開封後は1週間以内にご使用ください。

フレームから取り外す際には、必ずフィルムシールを付けたままにしてください。

検体数が多い場合には、各ウェルの反応時間が均一になるように準備の上、測定してください。

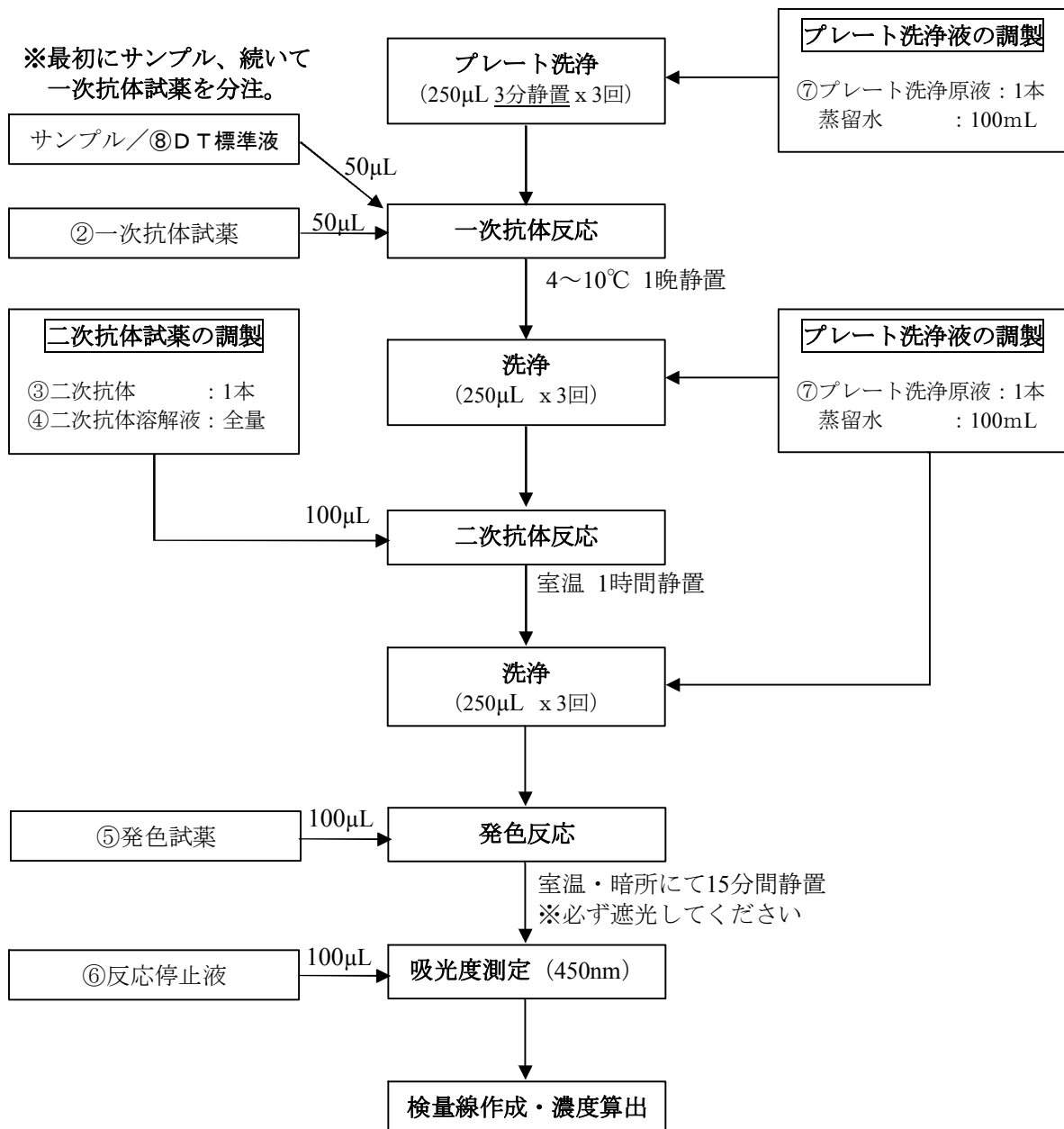
- A) ⑦プレート洗浄原液 (5倍濃縮) 1本に対し蒸留水 100mL を混合して、プレート洗浄液を調製します。
- B) ①DT 固相化プレートを袋から取出し、フィルムシールを取り外します。
- C) ①DT 固相化プレート内部には、保護剤としてグリセロールが塗布してあります。
調整済みプレート洗浄液を 250 μ L/ウェル分注し、室温にて3分間静置したのち、液を捨てます。
プレートのウェル面を下にしてキムタオル等にたたき、ウェルに残った水分を除去してください。
この洗浄操作を3回繰り返します。
- D) ⑧DTスタンダード A~F をウェルに 50 μ L 正確に分注します。同様にサンプル 50 μ L を分注します。ブランク用ウェルには蒸留水を 100 μ L 分注しておきます。ウェルの配置は右図2を参考にしてください。
- E) 続いてブランク用ウェル以外の全てのウェルに②一次抗体試薬を 50 μ L ずつ分注し、液がウェル内で均一となるようプレート全体を軽く揺らしてください。プレートをシールして密閉したのち4~10 $^{\circ}$ Cで1晩反応させます。残った試薬は全て冷蔵保存します。
- F) 実験操作を開始する前に、プレート以外の全ての試薬および蒸留水を室温に戻しておきます。
- G) プレート洗浄液を調製します。⑦プレート洗浄原液 1本に対し 100mL の蒸留水を加えて混合します。
希釈済みプレート洗浄液は冷蔵にて1週間保存可能です。
- H) 二次抗体試薬を調製します。③二次抗体 1本に対し④二次抗体溶解液を全量混合し、5分静置します。
調製済み二次抗体試薬は冷蔵にて1週間保存可能です。
- I) 一晩反応させたマイクロプレートを取り出し、シールを剥がします。
ウェル内の反応液を捨て洗浄液 250 μ L を分注します。プレート全体を軽く揺らしたのち、洗浄液を捨てます。
プレートのウェル面を下にしてキムタオル等にたたき、ウェルに残った水分を除去してください。
この洗浄操作を3回繰り返します。
- J) 二次抗体試薬を全ウェルに 100 μ L 分注し、プレート全体を軽く揺らしてよく混合します。
プレートをシールし、室温 (20~24 $^{\circ}$ C) で1時間静置します。
- K) ウェル内の反応液を捨て、洗浄液 250 μ L を分注し、ステップ I と同様に洗浄を3回行います。
最後にプレートのウェル面を下にしてキムタオル等にたたき、ウェルに残った水分を除去してください。
- L) ⑤発色試薬を全ウェルに 100 μ L 分注し、よく混合したのち、暗所室温にて15分間反応させます。
※発色試薬は光に弱いため、アルミ箔で全面を覆うなど、反応中も必ず遮光してください。
- M) ⑥反応停止液 100 μ L を全ウェルに加え、よく混合し反応を停止させます。
- N) マイクロプレートリーダーを使用して 450nm における吸光度を測定します。

【図2・ウェル配置例】

下図はプレート使用の一例です。1サンプルにつき3ウェルずつを使用し（n=3）、A行とH行のウェルはエッジ効果を避けるため分析に使用していません（図中×印）。この方法では、96穴のプレート1枚で18サンプルの分析ができます。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
B	⑧DT標準液-A(n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)
C	⑧DT標準液-B(〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)
D	⑧DT標準液-C(〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)
E	⑧DT標準液-D(〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)
F	⑧DT標準液-E(〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)
G	⑧DT標準液-F(〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)
H	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

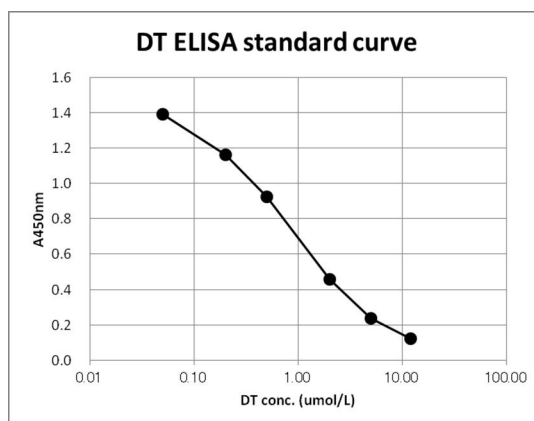
6. 測定法フローチャート



7. 標準曲線の作成とジチロシン濃度の算出

片対数グラフにスタンダードの濃度（横軸・対数軸）と、測定した吸光度（縦軸）との関係をプロットし、ジチロシンの標準曲線を作成します。検量線の近似関数には6点の曲線または折れ線を推奨。作成した標準曲線を用い、サンプルの吸光度からジチロシン濃度を計算します。尚、検量線は毎回必ず作成し、濃度計算にはサンプルと同一のプレートで測定した検量線データを使用してください。

【図3・典型的な検量線】



8. 関連文献

Kato Y, Wu X, Naito M, Nomura H, Kitamoto N, Osawa T.: Immunochemical detection of protein dityrosine in atherosclerotic lesion of apo-E-deficient mice using a novel monoclonal antibody. *Biochem Biophys Res Commun.* 275(1), p11-15 (2000).

9. トラブルシューティング

使用時に十分や試薬性能が得られなかった場合には、下記を参考に解決を試みてください。

① 測定値のばらつき：

【考えられる原因と対処法】

- ・反応時の温度ムラ ⇒恒温槽や温度の安定性の高いインキュベーターをお試し下さい。
- ・洗浄時における洗浄液の不十分な除去 ⇒ペーパータオルに叩きつけるなどして確実に残液を除去してください（ウェル内壁には触れないでください）。
- ・分注精度が十分でない ⇒特に一次抗体液とサンプルの分注精度は測定結果に大きな影響を与えます。正確に $50\mu\text{L}$ を分注してください。

② 吸光度が全体に高い／低い：


【考えられる原因と対処法】

- ・2次反応および発色反応時のインキュベーション温度と時間は吸光度に影響を与えます。室温が高い（ 25°C 以上）などの場合は、発色反応の時間を短縮／延長してみてください。
- ・発色基質は光に弱く、遮光しないと着色を起こす場合があります。保存中も含め、遮光を徹底してください。

③ 測定値がマイナスを示す場合：

【考えられる原因と対処法】

- ・高分子の蛋白質、高濃度の塩、極端な pH 等は本測定系に影響を与えます。サンプルの性質に応じて希釈等を実施してください。
- ・プレート洗浄液や、生理的リン酸緩衝液は、サンプル希釈に使用できませんので、ご注意ください。

【開発・発売元】  日研ザイル(株) 日本老化制御研究所

Japan Institute for the Control of Aging (JaICA), Nikken SEIL Co. Ltd.

〒437-0122 静岡県袋井市春岡710-1

TEL: 0538-49-0125

FAX: 0538-49-1267

URL: <http://www.jaica.com>

E-mail: biotech@jaica.com