

HMGB1 ELISA Kit II

この添付文書をよく読んでから使用して下さい

1. はじめに

High Mobility Group Box 1 (HMGB1) は、元来、非ヒストン核蛋白の主要成分であり、転写調節因子として知られている約 30kDa のタンパク質です¹⁾。受容体の一つに終末糖化産物受容体(Receptor for Advanced Glycation End products: RAGE) があります²⁾。

近年、この HMGB1 は敗血症性ショック時の晩期に発現する炎症性メディエーターとして注目されています³⁾。個々の疾患では、関節リュウマチ、急性肺障害、癌、播種性血管内凝固症候群(DIC) など、また外科的侵襲でも血中 HMGB1 濃度が上昇することが報告されています^{4) 8)}。

本製品は、類似蛋白質である HMGB2 を測り込むことなく、HMGB1 のみを測定します⁹⁾。

2. 使用目的

ヒト、ウシ、ブタ、ウサギ、ラット、マウスの血清・血漿や細胞培養上清、脳脊髄液、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の HMGB1 濃度の測定。

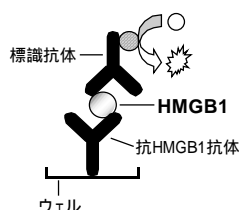
本製品は研究用試薬です。診断目的には使用できません。

3. キットの構成

規 格	96 回用 X 1
統一商品コード	326054329
抗体結合プレート 抗 HMGB1 ポリクローナル抗体	8 ウェル X 12 本
標識抗体(凍結乾燥品) ペルオキダーゼ標識抗 HMGB1,2 モノクローナル抗体	12 mL 用 X 1 本
標準品(凍結乾燥品) ブタ HMGB1	X 1 本
陽性コントロール(凍結乾燥品) ブタ HMGB1	X 1 本
検体希釈液 緩衝液	20 mL X 1 本
標識抗体溶解液 緩衝液	12 mL X 1 本
発色液 A 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン	6 mL X 1 本
発色液 B 0.005 mol/L 過酸化水素含有緩衝液	6 mL X 1 本
反応停止液 0.35 mol/L 硫酸	12 mL X 1 本
5 倍濃縮洗浄液 0.05% Tween 20 含有リ酸緩衝生理食塩水(5 倍濃度)	100 mL X 2 本
プレートシール	X 2 枚

4. 測定原理

本製品は、サンドウィッチ酵素免疫測定法 (ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay) による HMGB1 定量測定試薬です。抗 HMGB1 ポリクローナル抗体を結合させた固相ウェルに検体を加え、検体中の HMGB1 を抗体と特異的に結合させます。次に標識した抗 HMGB1,2 モノクローナル抗体を加え、抗原抗体複合体を形成させます。この複合体に発色剤を加えて発色させます。発色停止後、450 nm の吸光度を測定します。



5. 操作法

5-1. 必要な器具・装置

1. マイクロピペット(10、100、1000 μ L 等)
2. マイクロテストチューブなどのプラスチック製容器(標準液や検体希釈用)
3. メスシリンダー
4. マイクロチューブミキサー(ボルテックスミキサー等)

5. プレートミキサー
6. 37 $^{\circ}$ C インキュベーター(細胞培養用 CO₂ インキュベーター使用可)
7. 25 $^{\circ}$ C インキュベーター(25 $^{\circ}$ C 付近の室温でも可)
8. マイクロプレート洗浄装置
9. マイクロプレートリーダー(フィルター: 450 nm)

5-2. 試薬の調製

抗体結合プレート そのまま使用します。未使用のウェルは、付属の乾燥剤と共にアルミバックに戻して密閉し、2~8 $^{\circ}$ C で保存して下さい。

検体希釈液 そのまま使用します。

標準液 標準品のラベル表示に従って検体希釈液を添加し、穏やかに攪拌後、10分以上静置して完全に溶解して下さい。320 ng/mL の濃度になります。次に、検体希釈液を用いて希釈系列を作製します(例: 表1)。希釈にはプラスチック製容器を使用して下さい。保存の際は、原液の標準液をプラスチック製容器に小分け分注して、-30 $^{\circ}$ C 以下で保存して下さい。1ヶ月は安定ですが、凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

陽性コントロール液 陽性コントロールのラベル表示に従って検体希釈液を添加し、穏やかに攪拌後、10分以上静置して完全に溶解して下さい。溶解後、そのまま使用します。濃度範囲はラベルに表示されています。保存の際は、プラスチック製容器に小分け分注して、-30 $^{\circ}$ C 以下で保存して下さい。1ヶ月は安定ですが、凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

標識抗体液 標識抗体に標識抗体溶解液全量を添加し、穏やかに攪拌後、10分以上静置して完全に溶解して下さい。保存の際は、小分け分注してアルミホイル等で遮光し、-30 $^{\circ}$ C 以下で保存して下さい。1ヶ月は安定ですが、凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

発色試薬 使用直前に、室温に戻した発色液 A と発色液 B の必要量を、きれいな容器に等量混合して使用します。

反応停止液 そのまま使用します。

洗浄液 5 倍濃縮洗浄液を、蒸留水で 5 倍希釈して使用します。

表1 標準液の希釈例

希釈方法	濃度 (ng/mL)
S1: 検体希釈液 300 μ L に 320 ng/mL の標準液を 100 μ L 添加して混合	80
S2: 検体希釈液 100 μ L に S1 を 100 μ L 添加して混合	40
S3: 検体希釈液 100 μ L に S2 を 100 μ L 添加して混合	20
S4: 検体希釈液 100 μ L に S3 を 100 μ L 添加して混合	10
S5: 検体希釈液 100 μ L に S4 を 100 μ L 添加して混合	5
S6: 検体希釈液 100 μ L に S5 を 100 μ L 添加して混合	2.5

5-3. 検体の調製

血清・血漿は 15 分、1,000 x g 以上で十分に遠心後、速やかに採血管から分離して下さい。遠心が不十分であったり、血餅や血球と触れた状態で長期間保存すると、細胞崩壊などにより HMGB1 濃度が上昇する場合がありますのでご注意ください。保存の際は、プラスチック製容器に小分け分注して -80 $^{\circ}$ C で保存し、凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

他に細胞培養上清、脳脊髄液、肺胞洗浄液で測定が可能です。ウシ胎児血清(FBS)を含む細胞培養上清の場合は、FBS に含まれるウシの HMGB1 を検出しますので、陰性コントロールを同時に測定することをお勧めします。

検量線の上限以上の高濃度検体であることが既知の場合は、プラスチック製の容器を用いて、検体希釈液であらかじめ検量線の範囲内に希釈して測定を行って下さい。

5-4. 測定前の注意事項

1. 各試薬は使用する 30 分以上前に冷蔵庫から取り出し、室温に戻してから使用して下さい。
2. ウェル内に結晶が認められることがありますが、そのまま使用しても性能には影響ありません。
3. 検量線は測定毎に作成して下さい。
4. 希釈標準液作製や検体希釈には、プラスチック製容器を使用して下さい。
5. 高感度測定を希望される場合は、6. 「性能」の章をご参照下さい。

5-5. 測定操作法

1. 測定を行うすべてのウェルに検体希釈液を 100 μL ずつ分注します。
2. ブランクテスト用として、検体希釈液 10 μL をウェルに分注します。
3. 検体と希釈標準液を 10 μL ずつウェルに分注します。陽性コントロールを測定する場合には、同様に 10 μL をウェルに分注します。
4. プレートミキサー等を用いてプレートを攪拌後、ウェルをプレートシールでしっかりと覆い、37 で 20~24 時間インキュベーションします。プレートの攪拌時は、ウェルから液が飛び出ないように注意して下さい。
5. 洗浄液で 5 回洗浄します (400 μL / ウェル)。洗浄後、プレート上面を下にし、ペーパータオル上で 4, 5 回プレートを軽くたたき、ウェルに残っている水滴を落とします。
6. 標識抗体液を 100 μL ずつ各ウェルに分注します。
7. ウェルをプレートシールでしっかりと覆い、25 で 2 時間インキュベーションします。
8. 洗浄液で 5 回洗浄します (400 μL / ウェル)。洗浄後、プレート上面を下にし、ペーパータオル上で 4, 5 回プレートを軽くたたき、ウェルに残っている水滴を落とします。
9. ウェル裏の測光部分の汚れを、ウェルに傷を付けないようにして丁寧に拭き取して下さい。
10. 一定の時間間隔で発色試薬を 100 μL ずつ各ウェルに分注します。室温で 30 分間インキュベーションします。反応中にゴミや塵がウェルに入らないように、プレートカバーやラップなどで覆いをして下さい。
11. 前項で発色試薬を加えた時と同じ順序と時間間隔で、反応停止液を 100 μL ずつ各ウェルに分注します。
12. マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定します。測定は発色反応停止後 60 分以内に行なって下さい。
13. 各ウェルの吸光度からブランクテストウェルの吸光度を差し引き、希釈標準液の吸光度から検量線を作成して (図 1 参照)、検体の HMGB1 濃度を算出します。検体を希釈して測定している場合には、算出した濃度に希釈倍率を掛けて下さい。

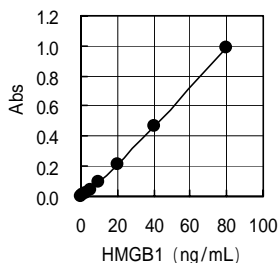


図 1 検量線例

5-6. 測定のプロフローチャート

標準液の希釈系列作製 (表 1 参照)

検体希釈液の分注 (100 μL / ウェル)

希釈標準液、検体等の分注 (10 μL / ウェル)

攪拌後、37 で 20~24 時間インキュベート
洗浄 (5 回)

標識抗体液の分注 (100 μL / ウェル)

25 で 2 時間インキュベート
洗浄 (5 回)

発色試薬の分注 (100 μL / ウェル)

室温で 30 分インキュベート
反応停止液の分注 (100 μL / ウェル)

吸光度の測定 (450 nm)

6. 性能

検量線範囲 2.5 ~ 80 ng/mL

検出限界 1 ng/mL

特異性 HMGB2 との交差反応性 < 2%

同時・日差再現性 CV < 10% (n=8)

添加回収率 80 ~ 120%

ウェルに 50 μL の検体希釈液を加え、そこにブランクテスト用検体希釈液、希釈標準液、検体を 50 μL 添加して、5-5. 「測定操作法」 4 から同様の測定を行うと、検出限界は 0.2 ng/mL になります。その際には、標準液を 10 ng/mL 以下に希釈調製して下さい。同時再現性・添加回収率は同等の性能です。

7. 貯蔵方法・有効期間

2~8 保存 (禁・凍結) 1 年間 (使用期限は外箱に記載)

8. 使用上又は取扱い上の注意

1. 本製品は研究用試薬です。診断目的には使用できません。
2. ご使用前に最新の MSDS をご確認ください。
3. 組み合わせ以外のロットの試薬を混合して使用しないで下さい。また、使用期限を過ぎたキットは使用しないで下さい。
4. 各試薬は使用する 30 分以上前に冷蔵庫から取り出し、室温に戻してから使用して下さい。
5. 試薬の調製方法は厳守して下さい。
6. 血清・血漿は 15 分、1,000 xg 以上で十分に遠心後、速やかに採血管から分離して下さい。遠心が不十分であったり、血球と触れた状態で長期間保存すると、細胞崩壊などにより HMGB1 濃度が上昇する場合がありますのでご注意ください。
7. 残った標準液 (原液)、陽性コントロール液、標識抗体液は 5-2. 「試薬の調製」の項に従って凍結保存して下さい。-30 以下で 1 ヶ月は安定ですが、凍結融解の繰り返しは避けて下さい。未使用のウェルは、付属の乾燥剤と共にアルミパックに戻して密閉し、その他の試薬と共に 2~8 に保存して下さい。
8. 検量線は測定毎に作成して下さい。
9. 検体は感染予防上、取扱いには十分注意して下さい。
10. 検体希釈液は防腐剤として微量のアジ化ナトリウムを含有しています。アジ化ナトリウムは鉛や銅と接触するとアジ化金属を形成することがあります。本製品を廃棄する際には、安全のため大量の水で希釈して流して下さい。
11. 反応停止液は酸性溶液 (pH2 以下) です。ご使用の際は、液が直接皮膚についたり、眼に入らないように注意して下さい。
12. 試薬及び測定に用いる試料中には、毒・刺激性及び感染性のある成分が含まれている場合がありますので、取扱いや廃棄には十分注意して下さい。万一、試薬及び測定に用いる試料が皮膚や粘膜に接触した場合は、大量の水で洗い流して下さい。その後、違和感等のある場合には医師等にご相談下さい。

9. 参考文献

1. Melvin VS and Edwards DP. Coregulatory proteins in steroid hormone receptor action: the role of chromatin high mobility group proteins HMG-1 and -2. *Steroids* 1999; **64**: 576-586.
2. Hori O *et al.* The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 1995; **270**: 25752-25761.
3. Wang H *et al.* HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; **285**: 248-251.
4. Taniguchi N *et al.* High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 2003; **48**: 971-981.
5. Ueno H *et al.* Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; **170**: 1310-1316.
6. Yamada S and Maruyama I. HMGB1, a novel inflammatory cytokine. *Clin Chim Acta* 2007; **375**: 36-42.
7. Hatada T *et al.* Plasma concentrations and importance of High Mobility Group Box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2005; **94**: 975-979.
8. Suda K *et al.* Serum concentrations of high-mobility group box chromosomal protein 1 before and after exposure to the surgical stress of thoracic esophagectomy: a predictor of clinical course after surgery?. *Dis Esophagus* 2006; **19**: 5-9.
9. Yamada S *et al.* New high mobility group box 1 assay system. *Clin Chim Acta* 2006; **372**: 173-178.

製造発売元 **株式会社 シノテスト**

神奈川県相模原市大野台 2-29-14

<http://www.shino-test.co.jp/>

(お問い合わせ先) 研究開発部

E-mail: HMGB_info@shino-test.co.jp

TEL: 042-753-0354 / FAX: 042-786-8553