

本品は研究用試薬です。体外診断用として使用できません。

Code No. 296-88701 (96回用)

レビス™ ラット TSH ELISA キット

1. イントロダクション

TSH (Thyroid-Stimulating Hormone、別名 Thyrotropin、チロトロピン) は分子量約 28,000 の糖タンパク質で、LH、FSH と共通の構造をもつ α -サブユニットと、TSH に特異的構造の β -サブユニットからなるヘテロダイマーです。糖鎖構造の違いに由来する等電点の異なる数種の分子種があります。TSH は全脊椎動物で、脳下垂体前葉のチロトロフと呼ばれる好塩基細胞で産生・分泌されます。その作用は無機ヨウ素の摂取とチログロブリンのヨウ素化促進を通して甲状腺ホルモンの合成・分泌を増大させ、脂肪組織でのグルコース、脂肪分解を亢進させ、また眼球突出を起こします。その分泌は直接的には TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone)、またエストロゲン、インスリンによって間接的に促進されます。また寒冷ストレスで亢進します。ソマトスタチン、甲状腺ホルモン、成長ホルモン、グルココルチコイド、オピオイドペプチド、特に β -エンドルフィン、生理状態として交感神経刺激性のストレス、飢餓などで分泌が抑制され、血中濃度には日内変動があります。

本キットはラット TSH (Thyroid-Stimulating Hormone) を定量的に測定するためのサンドイッチ酵素免疫測定法です。本キットは研究にのみご使用下さい。

◆製品の特長

- ・高感度 (標準曲線範囲は 0.184ng/mL ~ 18.0ng/mL) で測定できます。
- ・全反応時間は 4 時間です。
- ・ラット血清または血漿 (抗凝固剤は EDTA-2Na; 最終濃度 1mg/mL をお勧めします) 中の TSH を測定します。
- ・1 キットは 96 ウェルです。
- ・標準品はラット由来のものです。
- ・全ての試薬は溶液タイプです。

2. 測定原理

本キットは標準品、希釈検体を抗 TSH 抗体固相化マイクロプレートウェル中で 2 時間インキュベートします。洗浄後、ビオチン結合抗 TSH 抗体を加え 1 時間インキュベートします。再度の洗浄後、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を加え、捕捉された TSH とともに 30 分間インキュベートします。洗浄後、ウェルに残ったペルオキシダーゼを TMB 溶液と反応させます。反応は酸性の溶液の添加で停止され、反応の結果生じた黄色の産物が 450nm (副波長 620nm) で比色測定されます。吸光度は TSH 濃度にほぼ比例します。標準品濃度に対して吸光度をプロットし標準曲線を作製し、この標準曲線から未知検体中の濃度が決定されます。

3. キットの性能

・測定範囲

0.184ng/mL ~ 18.0ng/mL の範囲で測定できます。

(5.0 倍希釈時の実効測定範囲は 0.920ng/mL ~ 90.0ng/mL)

・特異性

この ELISA 系で使用されている抗体はラット TSH に対して特異的なモノクローナル抗体です。

関連物質を本キットで測定した結果は下表のとおりです。

検体名	交差性	検体名	交差性
ラット TSH	100%	ラット FSH	交差性無し
ラット LH	交差性無し	ラット GH	交差性無し

TSH は α と β サブユニットのヘテロダイマーです。競合的結合原理に基づく RIA は抗原認識部位が 1 箇所であるため、 β -サブユニットを測り込んでしまう可能性があります。一方、当社の ELISA キットは α -サブユニット、及び β -サブユニットを認識する 2 種類の抗体を使用しているため、native な TSH に対する特異性が高くなっています。したがって、例えば甲状腺摘出後や抗甲状腺薬投与による血中 TSH の測定値などが、今まで報告されている RIA 測定値と一致しない事があります。

参考文献: Mori, M. and Oshima, K. *et al.*: *Acta Endocrinol.*, **105**, 49 (1984).

- ・精度試験 (アッセイ内変動) (8 重測定、5 検体) 平均 C.V. 値は 10% 未満
- ・再現性試験 (アッセイ間変動) (4 重測定、2 検体、4 日間) 平均 C.V. 値は 10% 未満
- ・添加回収試験
血清検体に異なる 5 濃度の TSH を添加し測定した結果、回収率は 98.3% から 101% でした。
- ・希釈直線性試験
3 血清検体を連続的に希釈用緩衝液で 3 段階希釈し測定した結果、直線回帰の R^2 は 0.999 でした。

4. 参考値

ラット TSH 測定値：3.26ng/mL～4.65ng/mL 亜種：CD (SD)、雄、5 匹、9 週齢群、絶食群
 ラット TSH 測定値：2.50ng/mL～4.04ng/mL 亜種：CD (SD)、雄、5 匹、7 ヶ月齢群、非絶食群
 ラット TSH 測定値：8.09ng/mL～11.9ng/mL 亜種：CD (SD)、雄、5 匹、9 週齢群、非絶食群、甲状腺除去
 ※飼育条件、採血条件、検体保管条件により測定値は変動しますので、この測定値は目安としてお使い下さい。

5. ご使用前にご確認頂きたい技術上のヒント及び注意事項

- ・採血時の麻酔（エーテル深麻酔等）やストレスは測定値に影響を与える場合があります。麻酔薬を使用する場合はバルビツール系をお勧めします。
- ・有機溶媒は測定値に影響を与える場合があります。
- ・抗凝固剤は検体の pH を安定させるため、またカルシウムイオンの影響を避けるため、EDTA-2Na、1mg/mL（最終濃度）を推奨しています。その他の抗凝固剤についてはお問い合わせ下さい。特にヘパリン濃度が高い場合は測定値が低くなるか、または測定できなくなります。
- ・ヒト用採血管（血清分離剤）を使用する際には、測定への影響を事前に確認する事が必要です。
- ・ELISA 法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温：20℃～25℃（実験台上またはインキュベータ内温度）を厳守して下さい。また、風速（エアコンの風も含む）：0.4m/sec. 以上、湿度 30% 未満の環境下での測定は避けて下さい。やむを得ず、測定操作を風速：0.4m/sec. 以上、湿度 30% 未満の環境下で実施する場合には、各ステップの静置反応時、プレートシールをすることに加え、下記のような方法をご検討下さい。
 例) インキュベータ内、発泡スチロール製箱内で静置反応させる等。測定室の環境条件により対策方法が異なる場合がありますので、詳細はお問い合わせ下さい。
- ・各ステップでの静置反応時には、ウェルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートシールを貼って下さい。
- ・検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけて下さい。1 ウェル / 1 チップのご使用をお勧めします。
- ・TMB 溶液は 96 ウェルプレートに使用するまでは薄い黄色澄明です。光を避けて保存して下さい。
- ・反応停止液は使用するまでは無色です。
- ・本キットは ELISA 法の研修を修了した方、または指導者の方のご使用下さい。用手法操作で測定する際にはピペッティング操作の再現性が安定した方がご使用下さい。
- ・準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけて下さい。
- ・試薬類を皮膚に付けないで下さい。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受けて下さい。
- ・本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないで下さい。
- ・試薬類は口でピペッティングしないで下さい。
- ・ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。
- ・検体は感染の危険性があるものとして充分注意して取り扱って下さい。本キットは動物由来の成分を含んでいます。
- ・使用済みの検体、使用した消耗品等は 1% ホルマリン、2% グルタルアルデヒドまたは 0.1% 以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。使用した消耗品や未使用の薬品類は所属施設の規定並びに各地域の法令に従って廃棄して下さい。

6. 構成品

構成品	状態	容量
(A) 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12) / 1 枚
(B) TSH 標準品 (18.0ng/mL) TSH 標準品 (7.20ng/mL) TSH 標準品 (2.88ng/mL) TSH 標準品 (1.15ng/mL) TSH 標準品 (0.460ng/mL) TSH 標準品 (0.184ng/mL)	そのまま使用	各 450 μL / 1 本
(C) 緩衝液	そのまま使用	60mL / 1 本
(D) ビオチン結合抗体溶液	希釈後使用	100 μL / 1 本
(E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液	希釈後使用	100 μL / 1 本
(F) TMB 溶液	そのまま使用	12mL / 1 本
(H) 反応停止液	そのまま使用	12mL / 1 本
(I) 洗浄液 (10×)	希釈後使用	100mL / 1 本
(J) プレートシール	-	4 枚

【試薬の安定性と保存方法】

(A) 抗体固相化プレート

未使用（冷蔵状態を保った状態でシールを剥がしていない）の抗体固相化ストリップは同梱のジップシールパックに戻し、そのまま 2℃～10℃で保存して下さい。

(B) TSH 標準品

キットを分割して使用する際は使用する直前に冷蔵庫より取り出して使用して下さい。残りの液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。

(C) 緩衝液、及び (F) TMB 溶液

一部の溶液を使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。

(D) ビオチン結合抗体溶液、及び (E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

キットを分割して使用する際は希釈時に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(H) 反応停止液

使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。

(I) 洗浄液 (10×)

洗浄液 (10×) を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

7. キット以外に必要な器具 チェックリスト

精製水 (蒸留水) 標準溶液希釈用試験管 洗浄液希釈用ガラス器具 (メスシリンダー・ビーカー・瓶) チップ交換型ピペット (使い捨てチップで10 μ L～100 μ Lを正確にピペッティングできるもの、及び50 μ L～500 μ Lを正確にピペッティングできるもの) 連続分注ピペット (例 Eppendorf の multipette plus)、50 μ Lを連続分注できるもの ペーパータオル等の吸水性のあるもの (洗浄後にプレートに残った液を取り除く) 攪拌器 (Vortex タイプ) マイクロプレート振とう器 (約 600～1200rpm) 96 ウェルプレート用洗浄機 (あれば好ましい) または噴射ピン 96 ウェルプレートリーダー (450nm \pm 10nm、620nm : 600nm～650nm) データ計算用ソフトウェア

8. 検体の調製

本キットはラット血清または血漿中の TSH を測定します。

・検体の希釈は、あらかじめ試験管等を用いて (C) 緩衝液で希釈し充分攪拌を行い、測定ウェルに分注して下さい。**標準操作法での検体希釈は 5.0 倍です。**

※緩衝液での希釈について

・緩衝液で希釈したあと緩衝液と検体を良くなじませて下さい。ローリングミキサーがある場合にはローリングミキサーで15分前後攪拌して下さい。無い場合は15分前後静置しボルテックスタイプの攪拌器で攪拌後ウェルに分注することをお勧めします。

・溶血した検体や高脂質検体は異常値の発生原因となりますので避けて下さい。

※最終希釈倍率が 5.0 倍の場合でも原検体中の脂質 (乳び)、溶血が高い場合は異常値発生の原因となりますので測定に使用しないで下さい。

・抗凝固剤は検体の pH を安定させるため、またカルシウムイオンの影響を避けるため EDTA-2Na、1mg/mL (最終濃度) を推奨しています。その他の抗凝固剤についてはお問い合わせ下さい。特にヘパリン濃度が高い場合は測定値が低くなるか、または測定できなくなります。

【検体の安定性と保存方法】

検体を長期に保管する場合は、-35℃以下での凍結保管を推奨します。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。また、検体の希釈は用時調製として下さい。

9. 試薬の調製

*キットの試薬は使用前に必ず室温 (20℃～25℃) に戻して下さい (2時間位が目安です)。

*6. で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で調製して下さい。

*測定に必要な分だけ試薬を調製して下さい (ご不明な際にはお問い合わせ下さい)。

【濃縮された試薬類】

(D) ビオチン結合抗体溶液

100 μ L を充分採取できる量をご提供しています。濃縮液を (C) 緩衝液で **100 倍** に希釈して下さい。

(E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

100 μ L を充分採取できる量をご提供しています。濃縮液を (C) 緩衝液で **100 倍** に希釈して下さい。

(I) 洗浄液 (10×)

洗浄液 (10×) を室温化された精製水 (蒸留水) で **10 倍** に希釈して下さい。

例: 100mL の洗浄液 (10×) + 900mL の精製水 (蒸留水) (96 ウェル全てを使用する場合)

10. 測定操作法

洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意して下さい。

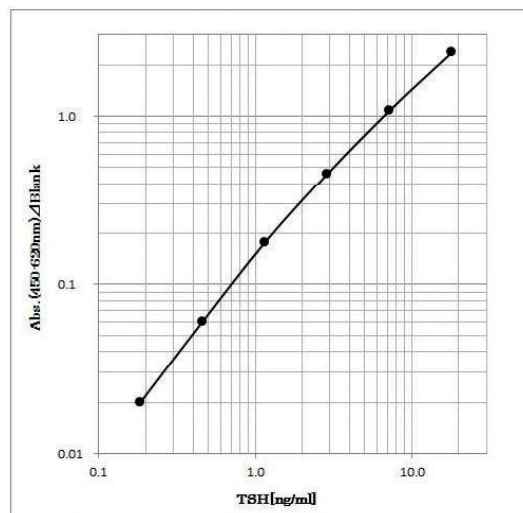
抗体固相化プレートのシールは、プレートが十分に室温に戻ってから剥がして下さい。

- (1) あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし、4回洗浄（*①）します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
 - (2) 検体測定ウェルに（C）緩衝液で希釈した希釈検体を $100\mu\text{L}$ ずつ分注します（標準操作法では 5.0 倍希釈です）。
 - (3) 標準品測定ウェルに各濃度の（B）TSH 標準溶液を $100\mu\text{L}$ ずつ分注します。
 - (4) マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌（*②）します。
 - (5) プレートシールを被せ、室温（ $20^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で 2 時間静置（*③）します。
 - (6) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし 4 回洗浄（*①）します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
 - (7) 各ウェルに（C）緩衝液で 100 倍に希釈したビオチン結合抗体溶液を $100\mu\text{L}$ ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌（*②）します。
 - (8) プレートシールを被せ、室温（ $20^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で 1 時間静置（*③）します。
 - (9) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし 4 回洗浄（*①）します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
 - (10) 各ウェルに（C）緩衝液で 100 倍に希釈したペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を $100\mu\text{L}$ ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌（*②）します。
 - (11) プレートシールを被せ、室温（ $20^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で 30 分間静置（*③）します。
 - (12) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし 4 回洗浄（*①）します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
 - (13) 各ウェルに、（F）TMB 溶液を $100\mu\text{L}$ ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌（*②）します。
 - (14) プレートシールを被せ、室温（ $20^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で 30 分間静置します。
 - (15) ウェルに（H）反応停止液を $100\mu\text{L}$ ずつ分注し、発色反応を停止します。
 - (16) 攪拌（*②）後、直ちにマイクロプレート用分光光度計で 450nm （副波長 620nm ）での吸光度を測定します。副波長は $600\text{nm}\sim 650\text{nm}$ の範囲で使用できます。
- （*①）、（*②）、（*③）は、13. 測定手順概要とチェックリストをご参照下さい。

11. 計算

- (1) 測定毎に標準曲線を作製します。両対数を使用し X 軸を標準溶液濃度（ ng/mL ）、Y 軸を吸光度の標準曲線グラフを作製して下さい。
- (2) 標準曲線より、検体の吸光度に対応する濃度（ ng/mL ）を読み取ります。読み取った濃度に検体希釈率（5.0 倍）を乗じ測定値とします。
* 検体の吸光度が標準曲線吸光度より外れた場合は（C）緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施して下さい。
* コンピュータソフトでの演算処理では、3 次多項式または 4 パラメーター、5 パラメーターの使用をお勧め致します。

グラフは標準曲線例です（吸光度は、測定環境により変動します）。



プレートリーダーは SUNRISE (TECAN) を使用

12.トラブルシューティングとQ&A

- すべてのウェルでの反応が弱い
原因として考えられること
1) 標準品や検体の入れ忘れ。
2) 発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
3) 発色に関連する試薬溶液の取り違いや希釈調製不良。
4) 酵素阻害剤の混入。
5) キット保管温度の影響（凍結した場合）。
6) プレーートの過剰な洗浄。
7) TMB 溶液の温度が低い。
- 最小標準溶液濃度（0.184ng/mL）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。
原因として考えられること
1) 洗浄が不適当、不完全であった。
(ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液と反応後の洗浄回数4回を同じ流速で5回～8回に増やして下さい。)
- 変動係数 (C.V.) が大きい
原因として考えられること
1) 洗浄が不適当、不完全であった。
2) 標準品や管理血清、または検体の攪拌が不充分であった（凍結検体の攪拌は充分に行ってください）。
3) ピペッティング操作が一定ではなかった。
- Q-1: キットは分割して使用することができますか？
A-1: できます。プレートに貼られた透明シールをストリップの間にそってカッターなどで切り離してご使用下さい。当日使用しないプレートはシールを貼った状態で直ちに冷蔵庫に保管して下さい。
- Q-2: プレートを取り出したらウェルの中に液体が入っていましたが何ですか？
A-2: 出荷時には保存安定液が充填してあります。

13. 測定手順概要とチェックリスト

必ず取扱説明書を一読して検体条件、測定条件、測定方法を確認後、測定操作を行ってください。

- 抗体固相化プレート、試薬類を十分に室温（20℃～25℃）に戻して下さい。室温化には2時間位必要です。
- 洗浄液の希釈：室温化された精製水で、**10倍**に希釈して下さい。

各操作注意事項

- 抗体固相化プレート**
- ↓洗浄4回（洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注） *①
- 希釈検体または TSH 標準品** 100 μL
- ↓攪拌、室温（20℃～25℃）、2時間反応、静置 *②*③
(D) ビオチン結合抗体溶液の希釈。室温化された緩衝液で、**100倍**に希釈して下さい。
希釈溶液の調製は第一反応中に行う。
- ↓洗浄4回（洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注） *①
- ビオチン結合抗体溶液** 100 μL
- ↓攪拌、室温（20℃～25℃）、1時間反応、静置 *②*③
(E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液の希釈。室温化された（C）緩衝液で、**100倍**に希釈して下さい。希釈溶液の調製は第二反応中に行う。
- ↓洗浄4回（洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注） *①
- ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液** 100 μL
- ↓攪拌、室温（20℃～25℃）、30分間反応、静置 *②*③
- ↓洗浄4回（洗浄液除去後、直ちに TMB 溶液分注）
- TMB 溶液** **TMB が室温化されていることを確認** 100 μL
分注後、濃度により青色に変色
- ↓攪拌、室温（20℃～25℃）、30分間反応、静置 *②*③
- 反応停止液** **強酸性につき取扱注意** 100 μL
分注後、濃度により黄褐色に変色
- ↓攪拌 直ちに攪拌 *②
- 直ちに吸光度測定（主波長 450nm、副波長 620nm：600nm～650nm）**
副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします

(*①) 洗浄液をウェルに分注後、手のひらの上で10秒ほど軽く振り廃棄します。4回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後の乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は300 μ L/ウェルです。万一、最小標準溶液濃度(0.184ng/mL)のOD値よりブランクOD値が高くなる場合は解決方法の1つとして、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液と反応後の洗浄回数4回を同じ流速で5回~8回に増やして下さい。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は5~25mL/分(ノズルの径により異なります)です。第一反応後の初回の洗浄のみウェル間のコンタミに注意して下さい。

(*②) 攪拌の目安は600rpm~1200rpm-10秒間、3回。

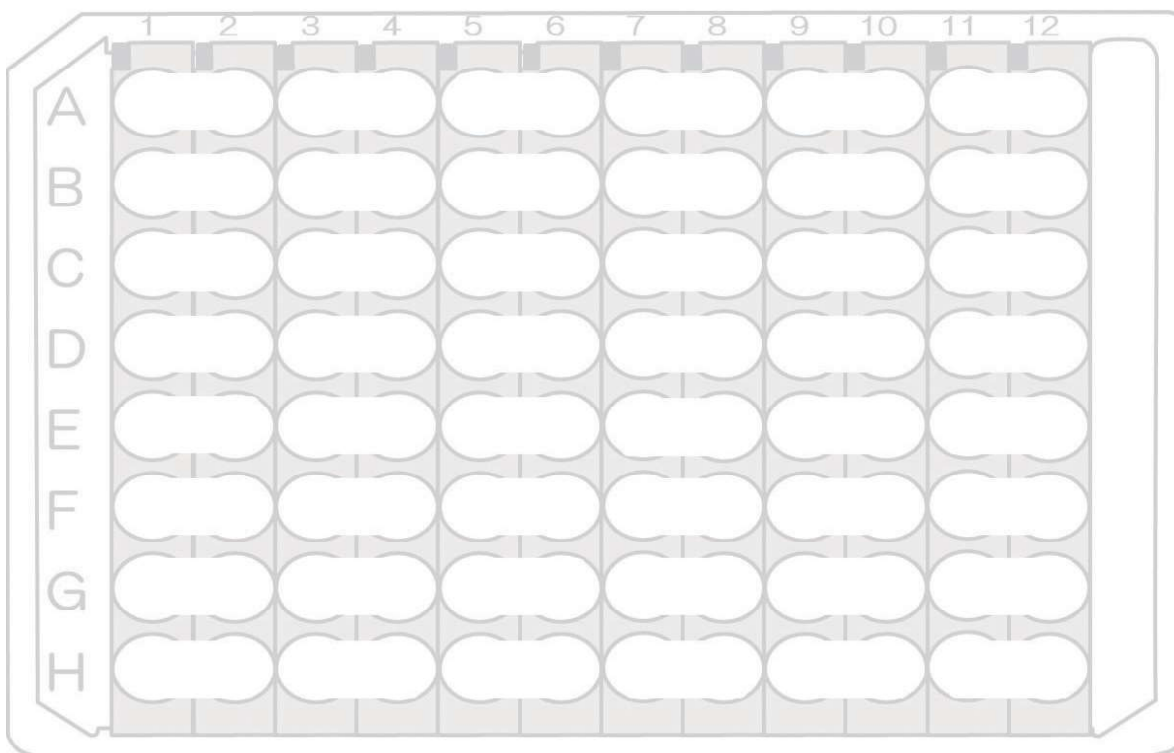
(*③) 攪拌終了後プレートシールを貼って静置して下さい。

プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

ワークシート (例)

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	18.0ng/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
B	7.20ng/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
C	2.88ng/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
D	1.15ng/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
E	0.460ng/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
F	0.184ng/mL	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
G	0 (Blank)	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40
H	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33	検体 41

ワークシート



14. キットの保存と使用期限

キットは2℃～10℃で保存して下さい（凍結厳禁）。使用期限の過ぎた試薬は使用しないで下さい。開封した各試薬につきましては、保管状態により影響を受ける可能性がありますので早めのご使用を推奨します。

【測定名】

【所属】

【測定者】

【測定日】

【ロット番号】

【使用期限】

【備考】

【製品名】 レビス™ ラット TSH ELISA キット
【和光コード】 296-88701
【英語表記】 LBIS™ Rat TSH ELISA Kit
【貯法】 2～10℃保存
【使用期限】 ラベルに記載
【包装】 96回用

製造発売元
富士フイルム 和光純薬株式会社
大阪府中央区道修町三丁目1番2号
Tel : 06-6203-3741