

CODE No. 7630



Revised: December, 2021 ver. 7

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Quantitative test kit for Human EDN

EDN ELISA Kit

CODE No. 7630 96 wells

CONTENTS

1. Intended Use -----	1
2. Summary and Explanation-----	1
3. Principle -----	1
4. Species cross reactivity-----	2
5. Materials provided -----	2
6. Storage and Stability -----	2
7. Materials and equipment required -----	3
8. Precautions -----	3
9. Procedure -----	4
10. Performance Characteristics -----	8
11. References -----	10

CODE No. 7630

Before use, thoroughly read all Instructions.

Intended Use

The **EDN ELISA Kit** is based on sandwich ELISA and is capable of measuring Human EDN.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Summary and Explanation

Upon activation, eosinophils secrete several cationic proteins including major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil peroxidase (EPO) and eosinophil-derived neurotoxin (EDN). EDN, also called eosinophil protein X (EPX), is a glycosylated single-chain protein with a molecular weight 18-21 kDa and is a member of the ribonuclease superfamily along with ECP¹¹⁻¹³). Although EDN has high sequence homology to ECP, EDN has 100-fold greater ribonuclease activity than ECP and neurotoxicity but not cytotoxicity^{9), 10)}. Eosinophil activation has been found to play an important role in inflammatory processes in allergic diseases. EDN can be a marker of eosinophil activation and degranulation.

The “EDN ELISA Kit” is a useful reagent for specifically measuring Human EDN with high sensitivity by ELISA.

Principle

The EDN ELISA Kit measures Human EDN by sandwich ELISA. This ELISA detects Human EDN with a minimum detection limit of 0.62 ng/mL and does not cross-react with ECP.

Samples to be measured or standards are incubated in the wells coated with anti-human EDN monoclonal antibody. After washing, the peroxidase conjugated anti-human EDN polyclonal antibody is added into the microwells and incubated. After another washing, the peroxidase substrate is mixed with the chromogen and allowed to incubate for an additional period of time. An acid solution is added to each microwell to terminate the enzyme reaction and to stabilize the color development. The optical density (O.D.) of each microwell is measured at 450 nm using a microplate reader. The concentration of Human EDN is calibrated from a dose response curve based on the reference standards.

Species cross reactivity

Species	Human	Mouse	Rat
Samples	serum, plasma, urine	serum	Not Tested
Reactivity	+	-	

Materials provided

Each kit contains;

Name	Materials	Quantity (1 kit)
Microwells	microwell strips coated with anti-human EDN antibody	8-well strip × 12 strips
EDN standard	The standards of 7 types of concentrations (ready-for-use)	1 mL × 7 vials
Assay diluent	Buffer for diluting samples* (ready-for-use)	50 mL × 1 bottle
Conjugate	Peroxidase conjugated anti-human EDN antibody (ready-for-use)	12 mL × 1 bottle
Wash concentrate	Buffer for washing microwells (×10)	100 mL × 1 bottle
Substrate	TMB/H ₂ O ₂ solution (ready-for-use)	20 mL × 1 bottle
Stop solution	0.5 M H ₂ SO ₄ (ready-for-use) (irritant)	20 mL × 1 bottle
Positive control		0.2 mL × 1 vial
Negative control		0.2 mL × 1 vial

* Use the **Assay diluent** as 0 ng/mL control for the EDN standard. During storage, some precipitation or turbidity may appear. It does not affect the assay results. Dissolve the Assay diluent completely using a vortex mixer.

Storage and Stability

All kit components must be stored at 2-8°C. All reagents are stable for 18 months after manufacturing when stored at the indicated conditions.

Materials and equipment required

- Microplate reader (450 nm)
- Automatic plate washer or wash bottle
- Adjustable micropipette
- Multichannel micropipette
- 96-well polyvinyl plate
- Microplate holder
- Uncoated microwell strips (for using with an automatic plate washer)
- Disposable reagent vessels
- Paper towels
- Distilled water

Precautions

1. Allow all the components to come to room temperature (20-25°C) before use.
2. **Microwells** that are not used immediately should be returned to the ziplock pouch, which must be carefully resealed to avoid moisture absorption.
3. Fresh samples should be used. Aliquot each sample and store below -20°C if necessary. Avoid repeated freezing and thawing. Never store the samples at 4°C, as samples are adversely affected by storage at this temperature.
4. When **Assay diluent** is stored at 2-8°C, some precipitation or turbidity may appear. However it does not affect the reagent efficiency. Dissolve the **Assay diluent** completely before use.
5. **Assay diluent** and **EDN Standard** contain sodium azide (0.09%) as a preservative. Azide may react with copper or lead in plumbing system to form explosive metal azides. Therefore, always flush drain with plenty of water when disposing materials containing azide.
6. **Stop Solution** is 0.5 M sulfuric acid. As it is corrosive product, protect eyes and skin and handle with care.
7. This kit is intended for research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Procedure

◆ Preparation of Reagents

1. Wash solution

Prepare “**Wash solution**” by diluting 100 mL of **Wash concentrate** with 900 mL of distilled water. This **Wash solution** is stable for 2 weeks at 4°C.

2. Other reagents

EDN standard, Conjugate, Assay diluent, Substrate and **Stop solution** are ready for use.

◆ Preparation of samples

1. Sampling

Serum levels of EDN can vary significantly due to *in vitro* effects after sampling. These effects may be due to EDN released during coagulation. Therefore, each laboratory is recommended to establish its own sampling procedure. The following sampling procedures have been reported.

1) Serum

Blood for measurement of EDN was collected using Venoject®-II Tube AUTOSEP tube (TERUMO, Japan; cat# VP-AS109K). The blood was allowed to clot at room temperature (20-25°C) for exactly 60 ± 10 minutes. Thereafter, the serum was separated by centrifugation twice for 10 minutes at $1,350 \times g$ at 4°C, and then transferred to a new plastic test tube.

2) Plasma

Blood for measurement of EDN was collected using Venoject®-II Tube (TERUMO, Japan; cat# VP-DK050K). Within 30 minutes of blood collection, the plasma was separated by centrifugation twice for 10 minutes at $1,350 \times g$ at 4°C, and then transferred to a new plastic test tube.

3) Urine

Within 30 minutes of urine collection, the urine was separated by centrifugation, twice for 10 minutes at $1,350 \times g$ at 4°C, and then transferred to a new plastic test tube.

- 24-hour total urine sample; Daily urinary excretion of EDN was presented as mg/day.
- When the 24-hour total urine was not available, urine was collected from each individual as a spot sample. Urinary creatinine was also quantitated and urinary EDN results were presented as $\mu\text{g}/\text{mmol}$ creatinine.

2. Dilution

1) Dilute samples

Dilute each sample with **Assay diluent**.

Example 1: human serum or plasma

Dilute 1:5 with **Assay diluent** by adding 50 μL of sample to 200 μL of **Assay diluent**.

Example 2: human urine

Dilute 1:51 with **Assay diluent** by adding 10 μL of sample to 500 μL of **Assay diluent**.

2) Dilute **Positive control** and **Negative control**

Dilute each control 1:5 with **Assay diluent** by Adding 50 μL of each control to 200 μL of **Assay diluent**.

3. Storage

Fresh samples should be used. Aliquot each sample into a new plastic tube, and store below -20°C if necessary. Avoid repeated freezing and thawing.

◆ Assay procedure

Perform all assays in duplicate.

STEP 1: Sample incubation

- 1) Add 150 μL of prepared samples, **EDN standard** (ready-for-use), and controls to a transient 96-well polyvinyl plate as the same order of actual assay run. Then, transfer 100 μL of each sample to **Microwells** simultaneously using a multichannel micropipette.

The reaction starts immediately upon pipetting to **Microwells**. This transfer should be completed as quickly as possible.

- 2) Incubate for 60 minutes at room temperature ($20-25^{\circ}\text{C}$).

STEP 2: Washing

Manual wash: Aspirate or discard the well contents, then fill each well with **Wash solution** using a wash bottle. Aspirate or discard the **Wash solution** in the wells. Repeat this step another 3 times. Tap the plate on a paper towel to remove any remaining **Wash solution**.

Autowasher: Wash 4 times with **Wash solution**. Tap the plate on a paper towel to remove any remaining **Wash solution**.

* Each laboratory is recommended to confirm its own appropriate washing times and set-up.

* **Wash solution** should be used at room temperature ($20-25^{\circ}\text{C}$).

STEP 3: Incubation with Conjugate

- 1) Pour **Conjugate** (ready-for-use) into the vessel. After completely removing any remaining wash solution, pipette 100 μL of **Conjugate** into each well with a multichannel micropipette.
- 2) Incubate for 60 minutes at room temperature (20-25°C).

STEP 4: Washing

Wash the wells again following the **STEP 2** procedure.

STEP 5: Substrate incubation

- 1) After the washing, pour **Substrate** (ready-for-use) into vessel. Add 100 μL of **Substrate** to each well.

The reaction starts immediately upon pipetting to the well. This transfer should be completed as quickly as possible by using multichannel micropipette.

- * **Substrate** should be used at room temperature (20-25°C).
- * Use disposable new pipettes and vessel, as **Substrate** is easily oxidized by metal ions and contaminated by microbes.
- * Once **Substrate** is poured into the vessel, do not return to the bottle.

- 2) Incubate for 10 minutes at room temperature (20-25°C).

STEP 6: Stopping reaction

Pour **Stop solution** (ready-for-use) into the vessel. Add 100 μL of **Stop solution** to each well with a multichannel micropipette.

◆ Reading

Read the absorbance of each well at 450 nm using a plate reader. If a dual wavelength plate reader is available, set the test wavelength at 450 nm and the reference at 620 nm.

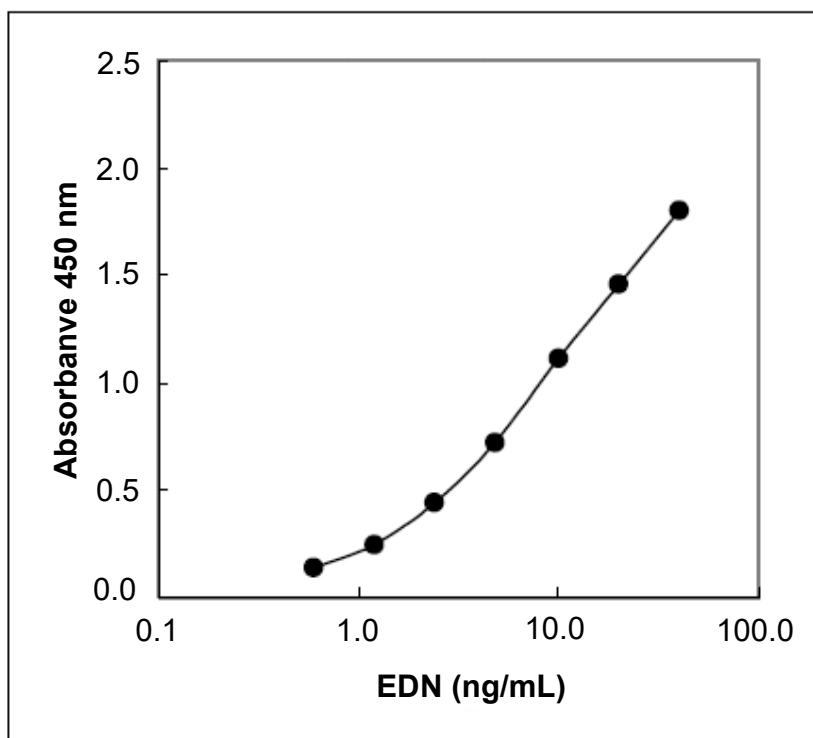
- * Reading should be done within 30 minutes after stopping the reaction.
- * Ensure that the back of the plate is clean and dry, and that no air bubbles are present on the surface of the liquid in the wells before reading.

◆ **Calculation of results**

- 1) Calculate the mean absorbance value of each **EDN standard**.
- 2) Plot on the semi-log graph paper and construct a calibration curve (absorbance on the vertical axis, concentration (ng/mL) on the horizontal axis).
- 3) Read the ng/mL corresponding to the absorbance of sample from the standard curve.
Report the EDN concentration of samples by multiplying dilution factor. (e.g. human serum: ×5)

* If absorbance of sample exceeds the absorbance reading for the highest **EDN standard**, dilute the sample and measure again.

◆ **Example of calibration curve**



◆ **Concentration of Human EDN in normal human sample**

Serum, plasma and urine samples from healthy donors were measured with the EDN ELISA Kit. The results were as follows. (Calculated as described in ◆ **Calculation of results**.)

	serum	plasma	urine
Sample (n)	52	52	50
Maximum	66.4 ng/mL	49.8 ng/mL	164.2 µg EDN/mmol creatinine
Minimum	8.3 ng/mL	6.2 ng/mL	26.7 µg EDN/mmol creatinine
Mean	26.4 ng/mL	18.1 ng/mL	81.8 µg EDN/mmol creatinine
SD	13.3	9.6	36.2
Mean +3 SD	66.3 ng/mL	46.9 ng/mL	190.4 µg EDN/mmol creatinine

Performance Characteristics

◆ Sensitivity

The sensitivity of the assay is 0.62 ng/mL.

◆ Reproducibility

1. Intra-assay

Intra-assay reproducibility was determined by assaying the sera 9 times.

EDN concentrations of the serum samples were calculated as described in

◆ Calculation of results.

Sample	serum 1	serum 2	serum 3
Number of determinations	9	9	9
Mean (ng/mL)	1.9	3.5	16.0
C.V. (%)	3.6	2.8	2.6

2. Inter-assay

Inter-assay reproducibility was determined by 4 independent “Intra-assay”.

EDN concentrations of the serum samples were calculated as described in

◆ Calculation of results.

Sample	serum 1	serum 2	serum 3
Number of determinations	4	4	4
Mean (ng/mL)	3.8	4.2	10.3
C.V. (%)	6.5	7.2	9.4

* From 4 replicates of each serum sample in 4 separate assays.

◆ **Recovery test**

Purified Human EDN was added to samples at different concentrations.

EDN concentrations of the serum samples were calculated as described in

◆ **Calculation of results.**

serum 1

(A) additional EDN (ng/mL)	EDN concentration observed (ng/mL)	(B) recovery (ng/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	4.5	-	-
2.1	6.6	2.1	100
4.1	8.6	4.1	100
8.2	12.6	8.1	99

serum 2

(A) additional EDN (ng/mL)	EDN concentration observed (ng/mL)	(B) recovery (ng/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	5.6	-	-
2.1	7.5	1.9	90
4.1	9.1	3.5	85
8.2	14.6	9.0	110

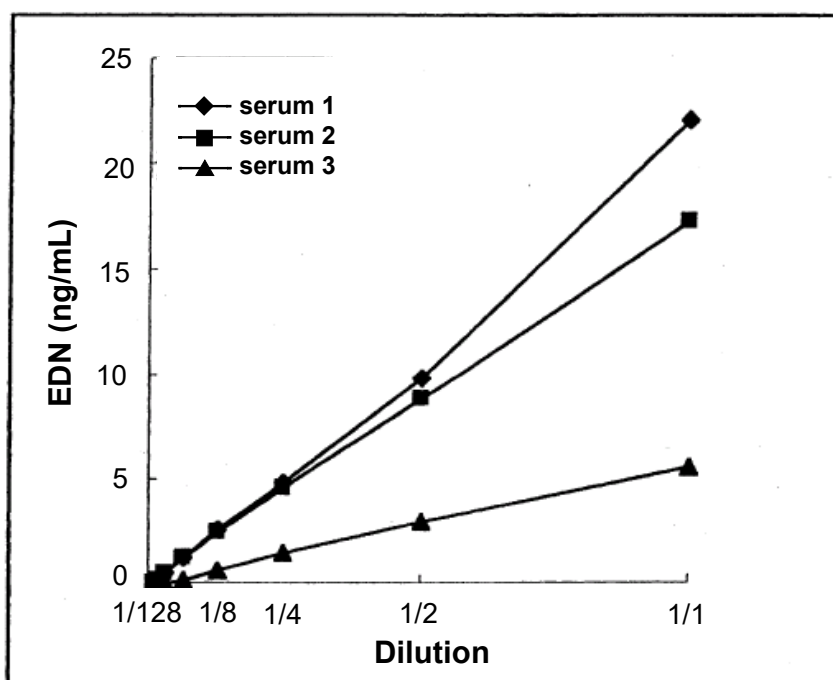
serum 3

(A) additional EDN (ng/mL)	EDN concentration observed (ng/mL)	(B) recovery (ng/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	14.3	-	-
2.1	16.2	1.9	90
4.1	18.1	3.8	93
8.2	21.7	7.4	90

◆ Dilution test

Serum samples were diluted with **Assay diluent**.

Each serum was serially diluted from 1/1 to 1/128 with **Assay diluent**, then EDN concentrations of the serum samples were calculated as described in ◆ **Calculation of results**.



References

- 1) Månsson, A., *et al.*, *J. Leu. Biol.* **85**, 719-727 (2009)
- 2) Gaudreault, É., *et al.*, *J. Immunol.* **180**, 6211-6221 (2008)
- 3) Mathur, S. K., *et al.*, *CHEST* **133**, 412-419 (2008)
- 4) Munitz, A., *et al.*, *J. Immunol.* **177**, 77-83 (2006)
- 5) Morokata, T., *et al.*, *J. Pharmacology and Experimental Therapeutics* **317**, 244-250 (2006)
- 6) Decot, V., *et al.*, *J. Immunol.* **174**, 628-635 (2005)
- 7) Thomas, L. L., *et al.*, *J. Immunol.* **169**, 993-999 (2002)
- 8) Nagase, H., *et al.*, *J. Immunol.* **164**, 5935-5943 (2000)
- 9) Slifman, N. R., *et al.*, *J. Immunol.* **143**, 2317-2322 (1989)
- 10) Gullberg, U., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 1239-1242 (1986)
- 11) Slifman, N. R., *et al.*, *J. Immunol.* **137**, 2913-2917 (1986)
- 12) Peterson, C. G. B., *et al.*, *Immunology* **50**, 19-26 (1983)
- 13) Durack, D.T., *et al.*, *PNAS.* **78**, 5165-5169 (1981)

CODE No. 7630

As this product has been used in many researches, these references are a part of such reports.
Please visit our website at <https://ruo.mbl.co.jp/>.

Manufacturer

MBL

A JSR Life Sciences Company

MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

URL <https://ruo.mbl.co.jp>

e-mail support@mbl.co.jp

はじめに

好酸球は活性化に伴って Major Basic Protein (MBP)、Eosinophil Cationic Protein (ECP)、Eosinophil Peroxidase (EPO) および Eosinophil Derived Neurotoxin (EDN) 等のさまざまな cationic タンパク質を放出します。EDN は Eosinophil Protein X (EPX) とも呼ばれ、分子量 18-21 kDa の単鎖糖タンパク質で、ECP と共に ribonuclease スーパーファミリーに属します¹¹⁾⁻¹³⁾。EDN は ECP と高い相同性を示しますが、ribonuclease 活性は ECP より 100 倍高く、生化学的に神経毒性を示しますが細胞毒性は示しません^{9), 10)}。

好酸球の遊走と活性化はアレルギー性疾患における組織傷害に重要な役割を果たしていることが示唆されています。EDN は好酸球の活性化および脱顆粒の指標になると考えられています。EDN ELISA Kit は ELISA 法によって特異的かつ高感度にヒト EDN を測定する試薬です。

測定原理

EDN ELISA Kit は、サンドイッチ ELISA 法によってヒト EDN を測定するキットです。本キットの検出感度は 0.62 ng/mL です。また、ECP との交差反応は示しません。

抗 ヒト EDN モノクローナル抗体を感作したマイクロカップに、サンプルを添加し、抗原-抗体反応をさせます。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト EDN ポリクローナル抗体を添加して反応させ、抗体-抗原-標識抗体の複合物を形成させます。洗浄後、テトラメチルベンチジンと過酸化水素の溶解液を基質溶液として添加し、酵素（ペルオキシダーゼ）により発色させ、反応停止後、吸光度（A450）を測定して ヒト EDN を検出します。

交差性

種	ヒト	マウス	ラット
検体	血清, 血漿, 尿	血清	未検討
交差性	+	-	

キット構成

Name	Materials	Quantity (1 kit)
Microwells	microwell strips coated with anti-human EDN antibody	8-well strip × 12 strips
EDN standard	The standards of 7 types of concentrations (ready-for-use)	1 mL × 7 vials
Assay diluent	Buffer for diluting samples* (ready-for-use)	50 mL × 1 bottle
Conjugate	Peroxidase conjugated anti-human EDN antibody (ready-for-use)	12 mL × 1 bottle
Wash concentrate	Buffer for washing microwells (×10)	100 mL × 1 bottle
Substrate	TMB/H ₂ O ₂ solution (ready-for-use)	20 mL × 1 bottle
Stop solution	0.5 M H ₂ SO ₄ (ready-for-use) (irritant)	20 mL × 1 bottle
Positive control		0.2 mL × 1 vial
Negative control		0.2 mL × 1 vial

* Assay diluent を 0 ng/mL の EDN standard としてお使いください。Assay diluent は保存中に白濁または沈殿が見られる場合がありますが、測定値に影響はありません。使用時にはボルテックスミキサーなどで十分攪拌してご使用ください。

保存

2-8°C にて保存してください。

有効期間

製造後 18 か月

準備するもの

- ・ 自動分光光度計 (マイクロプレート専用機、垂直透過型)
- ・ プレートウォッシャーまたは洗浄ビン
- ・ マイクロピペット
- ・ マルチチャンネルマイクロピペット
- ・ 1次反応準備用マイクロプレート (ポリビニル製 96 ウェルプレートなど)
- ・ マイクロカップ専用ホルダー
- ・ ダミーのマイクロカップ (自動洗浄機使用時)
- ・ リザーバー
- ・ ペーパータオル
- ・ 精製水

操作上の留意点

1. キットの構成成品は、室温（20-25°C）に戻してから使用して下さい。
2. 抗体感作マイクロカップは湿気をきらいますので、十分室温（20-25°C）に戻してから開封して下さい。また、開封後はアルミ袋のチャックを確実に締めて保存して下さい。
3. 検体は新鮮なものを用いて下さい。検体を保存する場合は、小分けして-20°C 以下で凍結保存して下さい。また、凍結融解の繰り返しは避けて下さい。
4. **Assay diluent** は、2-8°C に保存したとき、白濁が認められる場合がありますが、試薬性能に影響はありません。**Assay diluent** 調製時、十分に溶解してから使用して下さい。
5. 本試薬の構成成品のうち、**Assay diluent** と **EDN standard** には 0.09%アジ化ナトリウム（ NaN_3 ）を添加してあります。濃度は 0.09%ですので毒物には該当しませんが、誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば、医師の手当てを受けて下さい。また、アジ化ナトリウムは、配管中で爆発性のアジ化銅やアジ化鉛を形成することが報告されています。これらの物質の形成を防ぐため、アジ化ナトリウムを含んだ廃液は十分量の水で洗い流して下さい。
6. 本試薬の構成成品のうち、**Stop solution** には、0.5 M 硫酸（ H_2SO_4 ）を用いています。使用の際には十分注意して取り扱って下さい。
7. 本試薬は研究用試薬です。ヒトの体内に用いたり、診断の目的に使用しないで下さい。

操作法

◆ 試薬の調製

1. Wash solution [洗浄液]

Wash Concentrate 100 mL に精製水 900 mL を加えて 10 倍希釈し、**Wash solution** とします。**Wash solution** は 4°C で保存すると、およそ 2 週間安定です。

2. その他試薬

その他の試薬は全てそのままご使用ください。

◆ 検体の準備

1. 検体の種類

血清などの EDN 値はサンプリング後の *in vitro* における影響によって変化します。これは、サンプリング後の血液凝固過程で好酸球より遊離する EDN によるものだと考えられています。したがって、施設ごとにサンプリングの方法を確立することをお勧めします。参考として、これまでに報告されているサンプリングの方法を以下に示します。

1) 血清

テルモ社の Venoject®-II Tube AUTOSEP (TERUMO, Japan; cat# VP-AS109K)採血管を用いて静脈血を採取します。血液を室温 (20-25°C) で 60 分±10 分間静置し、凝固させます。凝固時間は厳守してください。その後 4°C、1,350 × g で 10 分間の遠心を 2 回おこない血清を分離します。血清は新しいプラスチック容器に移して保存してください。

2) 血漿

テルモ社の Venoject®-II Tube (TERUMO, Japan; cat# VP-DK050K)採血管を用いて静脈血を採取します。採血後、30 分以内に 4°C、1,350 × g で 10 分間の遠心を 2 回おこない血漿を分離します。血漿は新しいプラスチック容器に移して保存してください。

3) 尿

24 時間尿を用います。サンプリングできない場合は随時尿を用い、同時にクレアチニン値を測定して EDN の測定結果を補正してください。採尿後、30 分以内に 4°C、1,350 × g で 10 分間の遠心を 2 回おこないます。尿は新しいプラスチック容器に移して保存してください。

2. サンプルの希釈

1) 検体の希釈

サンプルは、**Assay diluent** を用いて希釈して下さい。

例 1: ヒト血清/血漿を測定する場合は、200 µL の **Assay diluent** に 50 µL の検体を加え、5 倍希釈します。

例 2: ヒト尿を測定する場合は、500 µL の **Assay diluent** に対して 10 µL の検体を加え、51 倍希釈します。

2) **Positive control**、**Negative control** の希釈

コントロールは、**Assay diluent** を用いて 5 倍希釈して下さい。

例:

200 µL の **Assay diluent** に 50 µL のコントロールを加え、5 倍希釈します。

3. 検体の保存

検体は新鮮なものを用いて下さい。検体を保存する場合は、小分けして-20°C 以下で凍結保存して下さい。また、凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

◆ 測定の手順

二重測定を推奨します。

STEP 1. <1 次反応>

1) **EDN standard** と希釈調製した検体および **Positive control**、**Negative control** を 150 μL ずつ、1 次反応準備用マイクロプレートに実際のアッセイと同じ配列で添加します。マルチチャンネルマイクロピペットを用い 1 次反応準備用マイクロプレートに準備した検体を 100 μL ずつ **Microwells** に移します。

* マイクロカップに検体を添加した時点から直ちに反応が始まりますので、操作は短時間のうちに行ってください。

2) 室温 (20-25°C) で 1 時間静置反応させます。

STEP 2. < 洗淨 >

用手法 : 反応液を捨てたのち、洗淨ピンを用いて、**Wash solution** を各ウェルに満たし、同じように捨てます。これを 4 回行います。その後、プレートをペーパータオルなどにパンパンとたたきつけて完全に洗淨液を除去してください。

自動洗淨機 (マイクロプレート専用機) : **Wash solution** で 4 回 洗淨下さい。その後、プレートをペーパータオルなどにパンパンとたたきつけて完全に洗淨液を除去してください。

* 自動洗淨機を用いた場合、使用する自動洗淨機によって最適洗淨回数が異なる場合があります。あらかじめ各施設で用いる自動洗淨機の最適洗淨回数を確認することをお勧めします。

* **Wash Solution** は必ず室温 (20-25°C) に戻して使用して下さい。

STEP 3. <2 次反応>

1) マイクロカップに残った **Wash solution** を完全に除去した後、リザーバーに移した **Conjugate** をマルチチャンネルマイクロピペットで 100 μL ずつ各ウェルに添加します。

2) 室温 (20-25°C) で 1 時間静置反応させます。

STEP 4. < 洗淨 >

STEP 2 と同様にマイクロカップを洗淨します。

STEP 5. <酵素反応>

1) マイクロカップに残った **Wash solution** を完全に除去した後、**Substrate** をリザーバーに移し、マルチチャンネルマイクロピペットで 100 μL ずつ各ウェルに添加します。

2) 室温 (20-25°C) で 10 分間静置反応させます。

* **Substrate** は必ず室温 (20-25°C) に戻した後、使用して下さい。

- * **Conjugate** を入れたリザーバーと **Substrate** を入れるリザーバーは、必ず別のものを使用して下さい。
- * **Substrate** は金属イオンにより酸化されやすいので取り扱いにはディスポーザブルの新しい器具を使用して下さい。
- * 金属イオンや微生物などによるコンタミネーションを防ぐため、試薬ボトルからリザーバーへ **Substrate** を移す際にもディスポーザブルのピペットを使用して下さい。また、一度リザーバーに移した **Substrate** は試薬ボトルへ戻さないで下さい。

STEP 6. <反応停止>

リザーバーに移した **Stop solution** をマルチチャンネルマイクロピペットで 100 μ L ずつ各ウェルに添加し、反応を停止します。

◆ 吸光度の測定

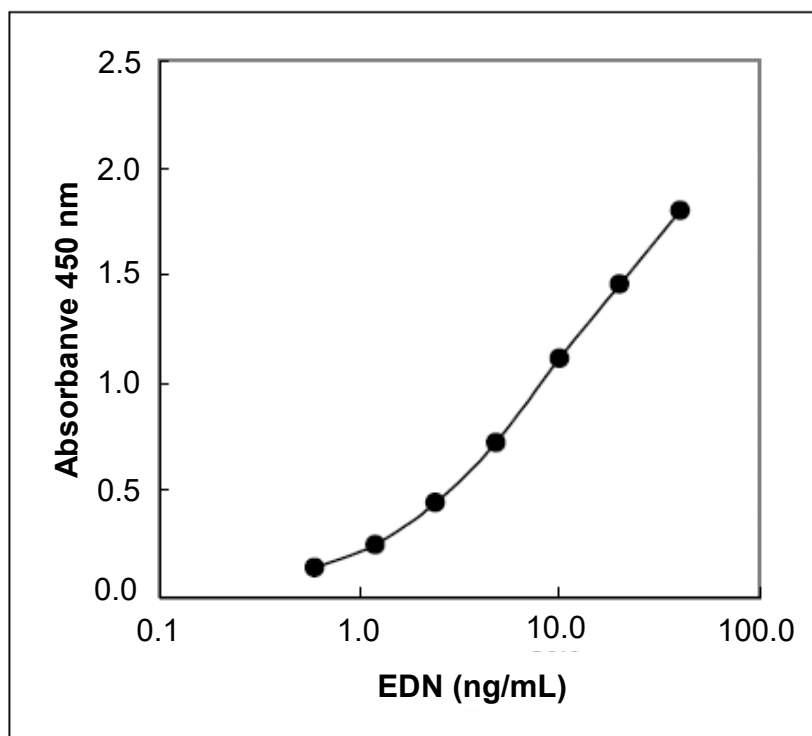
自動分光光度計（マイクロプレート専用機：垂直透過型）にマイクロカップをセットして、波長 450 nm の吸光度（副波長 620 nm）を測定します。

- * 吸光度の測定は反応停止後 30 分以内に行ってください。
- * プレートの裏側は汚れのない乾いた状態を保つようにしてください。また、吸光度を測定する前にウェル内に気泡がないことを確認してください。

◆ 濃度算出

- 1) **EDN standard** を多重測定している場合にはそれぞれ吸光度の平均値を算出します。
- 2) 片対数のグラフ用紙に標準曲線を作成します。
[横軸に EDN タンパク質の濃度 (ng/mL)、縦軸に吸光度をとります。]
- 3) 標準曲線を用いて、検体の吸光度の平均値から濃度を読み取り、検体の希釈倍率を乗じた値（血清の場合 5 倍）を測定結果とします。
 - * 検体の吸光度が、最高濃度の **EDN standard** の吸光度を超えた場合、あるいは、分光光度計の信頼範囲を超えた場合には、検体をさらに希釈して再測定してください。

◆ 標準曲線の例



◆ 正常人 EDN タンパク質の濃度

正常人の血清/血漿/尿を測定した場合、下記の結果になりました。(濃度の算出法に関しては、◆ 濃度算出の項を参照してください。)

	血清	血漿	尿
サンプル数	52	52	50
最大値	66.4 ng/mL	49.8 ng/mL	164.2 µg EDN/mmol creatinine
最小値	8.3 ng/mL	6.2 ng/mL	26.7 µg EDN/mmol creatinine
平均値	26.4 ng/mL	18.1 ng/mL	81.8 µg EDN/mmol creatinine
SD	13.3	9.6	36.2
平均値+3 SD	66.3 ng/mL	46.9 ng/mL	190.4 µg EDN/mmol creatinine

性能

◆ 感度

最小検出濃度は、0.62 ng/mL です。

◆ 再現性

1. 同時再現性試験

血清 3 例を用いて、同時に 9 回測定したところ、下表の結果が得られました。(濃度の算出法に関しては、◆ 濃度算出の項を参照してください。)

Sample	serum 1	serum 2	serum 3
Number of determinations	9	9	9
Mean (ng/mL)	1.9	3.5	16.0
C.V. (%)	3.6	2.8	2.6

2. 日差再現性試験

血清 3 例を用いて、測定日を変えて 4 回測定したところ、下表の結果が得られました。(濃度の算出法に関しては、◆ 濃度算出の項を参照してください。)

Sample	serum 1	serum 2	serum 3
Number of determinations	4	4	4
Mean (ng/mL)	3.8	4.2	10.3
C.V. (%)	6.5	7.2	9.4

* 各血清サンプルは 4 重測定しました。

◆ 添加回収試験

血清 3 例を用いて、添加回収試験を行ったところ、下表の結果が得られました。(濃度の算出法に関しては、◆ 濃度算出の項を参照してください。)

serum 1

(A) additional EDN (ng/mL)	EDN concentration observed (ng/mL)	(B) recovery (ng/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	4.5	-	-
2.1	6.6	2.1	100
4.1	8.6	4.1	100
8.2	12.6	8.1	99

serum 2

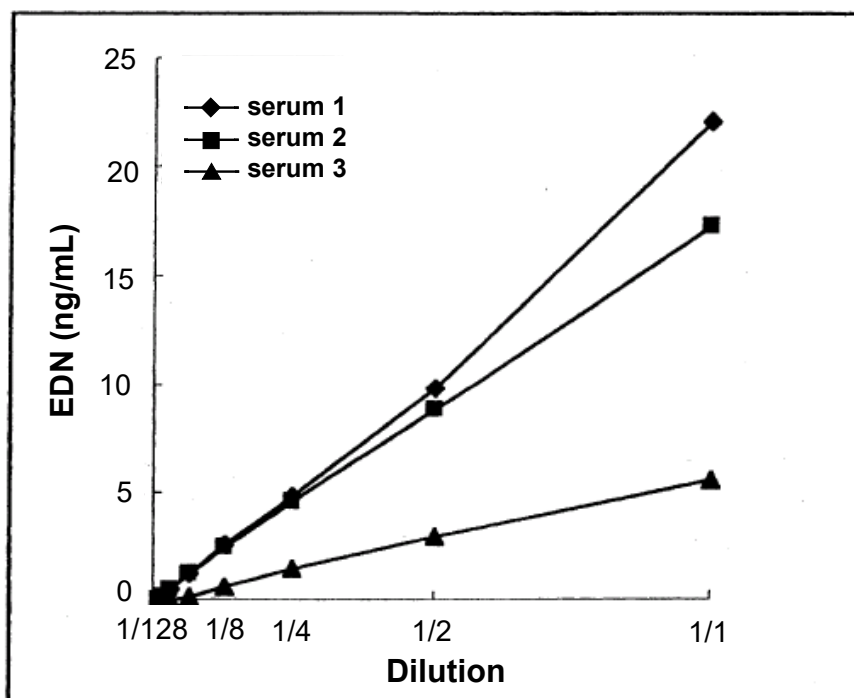
(A) additional EDN (ng/mL)	EDN concentration observed (ng/mL)	(B) recovery (ng/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	5.6	-	-
2.1	7.5	1.9	90
4.1	9.1	3.5	85
8.2	14.6	9.0	110

serum 3

(A) additional EDN (ng/mL)	EDN concentration observed (ng/mL)	(B) recovery (ng/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	14.3	-	-
2.1	16.2	1.9	90
4.1	18.1	3.8	93
8.2	21.7	7.4	90

◆ 希釈試験

血清を Assay diluent で 1/1～1/128 に希釈し測定したところ、下表の結果が得られました。
(測定結果は、検体希釈倍数を乗じた後の値です。)



参考文献

- 1) Månsson, A., *et al.*, *J. Leu. Biol.* **85**, 719-727 (2009)
- 2) Gaudreault, É., *et al.*, *J. Immunol.* **180**, 6211-6221 (2008)
- 3) Mathur, S. K., *et al.*, *CHEST* **133**, 412-419 (2008)
- 4) Munitz, A., *et al.*, *J. Immunol.* **177**, 77-83 (2006)
- 5) Morokata, T., *et al.*, *J. Pharmacology and Experimental Therapeutics* **317**, 244-250 (2006)
- 6) Decot, V., *et al.*, *J. Immunol.* **174**, 628-635 (2005)
- 7) Thomas, L. L., *et al.*, *J. Immunol.* **169**, 993-999 (2002)
- 8) Nagase, H., *et al.*, *J. Immunol.* **164**, 5935-5943 (2000)
- 9) Slifman, N. R., *et al.*, *J. Immunol.* **143**, 2317-2322 (1989)
- 10) Gullberg, U., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 1239-1242 (1986)
- 11) Slifman, N. R., *et al.*, *J. Immunol.* **137**, 2913-2917 (1986)
- 12) Peterson, C. G. B., *et al.*, *Immunology* **50**, 19-26 (1983)
- 13) Durack, D.T., *et al.*, *PNAS.* **78**, 5165-5169 (1981)

ここにご紹介する以外にも多数の文献がございます。

詳細は弊社 Web サイトをご覧ください。 <https://ruo.mbl.co.jp/>

製造元

MBL

A JSR Life Sciences Company

株式会社 医学生物学研究所

URL <https://ruo.mbl.co.jp>

e-mail support@mbi.co.jp