

研究用試薬

YK151 S-100 β ELISA
取扱説明書

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770 TEL: 0544-22-2771

Website: www.yanaihara.co.jp E-mail: ask@yanaihara.co.jp

目 次

I.	はじめに	2
II.	特 徴	3
III.	キットの構成	4
IV.	操作法	5～6
V.	操作上の注意	7
VI.	基本性能	8～11
VII.	貯蔵法および有効期間	12
VIII.	文献	12～13

YK151 S-100 β ELISA キット

I. はじめに

S-100 たんぱく質は主として、アストログリア細胞において細胞質の主要な部分を占める酸性たんぱく質であり、カルシウム結合能を有する神経系特異たんぱく質の 1 つと考えられています。本たんぱく質は分子量 21KDa であり、 α 鎖と β 鎖の 2 種のサブユニットで構成されていますが、生体内の存在部位によって、それらサブユニットの組み合わせは異なるとされています。すなわち、S-100 β はグリア細胞とシュワン細胞に、S-100 α はグリア細胞、S-100 α は横紋筋、心臓、腎臓に見い出されています。

脳脊髄液の S-100 β 濃度は頭部外傷、大脳低酸素症、大脳出血、虚血性脳卒中後の脳損傷の程度を推定するための指標として有用であるとする報告があります。また、最近になり、血中 S-100 β の上昇が脳における虚血、梗塞、出血および重症頭部外傷時の脳損傷度と相関し、これら疾患の予知に有効な指標であることが報告されています。

YK151 S-100 β ELISA キット

- ▼ ラット、マウスおよびヒト S-100 β 測定用です。
 - ▼ 0.078~5 ng/mL の範囲で測定できます。
 - ▼ 測定は 3+1+1 時間+30 分で終了します。
 - ▼ 40 検体を duplicate でアッセイできます。
 - ▼ 血漿、CSF および培養液サンプルの測定が可能です。
 - ▼ 検体量は 20 μ L です。
 - ▼ プレートは 1 列 (8 ウェル) 毎に取り外しできますのでキットの分割使用が可能です。
 - ▼ 同時再現性 CV(%) 2.99-4.82
 - ▼ 日差再現性 CV(%) 4.82-9.20
- 1) 測定プレート
 - 2) 標準品
 - 3) 標識特異抗体溶液
 - 4) SA-HRP 溶液
 - 5) 基質溶解液
 - 6) OPD 錠
 - 7) 酵素反応停止液
 - 8) 緩衝液
 - 9) 濃縮洗浄液
 - 10) プレート密閉用シール

保存と安定性

2~8 $^{\circ}$ Cで保存してください。

製造日より 12 ヶ月間は安定です。

II. 特 徴

本キットはラット、マウスおよびヒト血漿、培養液、並びにラットおよびヒト脳脊髄液[Cerebrospinal fluid(CSF)]に含まれる S-100 β を定量的に測定するものです。本キットによる S-100 β の測定は簡便で、しかも特異性、定量性にすぐれ、共存する他の生理活性物質や体液成分の影響を受けにくいなど多くの利点があります。

<特異性>

本キットはウシ S-100 $\alpha\alpha$ と 0.2%の交差反応性が認められます。

<測定原理>

本キットによる S-100 β の測定はサンドイッチ法に基づいて行います。測定プレート(96 ウェル)の各ウェルにはウサギ抗ウシ S-100 β ポリクローナル抗体が固定化されています。この各ウェルに標準液または検体を入れ、抗原抗体複合体を形成させ、さらにビオチン化ウサギ抗ウシ S-100 β ポリクローナル抗体と反応させ、サンドイッチ複合体を形成させます。その複合体に HRP 結合ストレプトアビジンを反応させます。最後にこの複合体中の HRP 活性を測定することにより、検体中の S-100 β 濃度を求めることができます。

Ⅲ. キットの構成

試薬・器具	形状	規格	内容物
1) Antibody coated plate (測定プレート)		1 枚(96 ウェル)	ウサギ抗ウシ S-100β抗体 固定化プレート
2) S-100β Standard (標準品)	凍結乾燥品	1 本(5ng)	ウシ S-100β
3) Labeled antibody solution (標識特異抗体溶液)	液状	1 本(11mL)	ビオチン化ウサギ抗ウシ S-100β抗体および非特異的 反応除去剤を含むリン酸 緩衝液
4) SA-HRP solution (SA-HRP 溶液)	液状	1 本(11mL)	HRP 標識ストレプトアビジン
5) Substrate buffer (基質溶解液)	液状	1 本(26mL)	0.015% 過酸化水素を含む リン酸ナトリウム-クエン 酸緩衝液
6) OPD tablet (OPD 錠)	錠剤	2 錠	o-フェニレンジアミン
7) Stopping solution (酵素反応停止液)	液状	1 本(11mL)	1M H ₂ SO ₄
8) Buffer solution (緩衝液)	液状	1 本(25mL)	非特異的の反応除去剤を含む リン酸緩衝液
9) Washing solution (Concentrated) (濃縮洗浄液)	液状	1 本(50mL)	1% Tween 20 を含む 濃縮生理食塩液
10) Adhesive foil (プレート密閉用シール)			4 枚

IV. 操作法

測定を始める前に必ずお読みください。(注意：キットに含まれるすべての試薬は室温にもどしてから測定を始めてください。)

<使用器具および装置>

1. マイクロピペットおよびチップ(20~1,000 μ L) ; 8 連または 12 連のマルチチャンネルピペットの使用を薦めます
2. マイクロプレート用吸光度計 (測定波長 490nm で吸光度 2.5 まで測定できる装置)
3. マイクロプレート用振とう機またはシェーカー
4. 標準液の調製に使用するガラス製の試験管
5. マイクロプレート洗浄装置、用手法の場合は連続分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプの使用を薦めます
6. メスシリンダー(1,000mL)
7. 蒸留水または脱イオン水

<脳脊髄液(CSF)検体の前処理>

CSF 検体の測定に際しては、CSF 検体をあらかじめ緩衝液で 1.5 倍に希釈し、測定後得られた濃度に 1.5 を掛け、これを測定値とする。

血漿検体および培養液については前処理を行わず、そのまま原液で測定する。

<試薬の調製>

1. 標準液の調製法：標準品の容器に緩衝液を 1mL 加え内容物を溶解させ、5ng/mL の標準液を調製する。この標準液から 0.2mL をとり、これを緩衝液 0.2mL で希釈し、2.5ng/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078ng/mL の各標準液を調製する。0ng/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
2. 発色剤溶液の調製法：SA-HRP 反応終了直前に基質溶解液 12mL に OPD 錠 1 錠を加え溶解させ使用する。
3. 洗浄液の調製法：濃縮洗浄液 50mL(全量)を 950mL の蒸留水にて希釈し使用する。
4. その他の試薬はそのまま測定操作に従って使用する。

<測定操作>

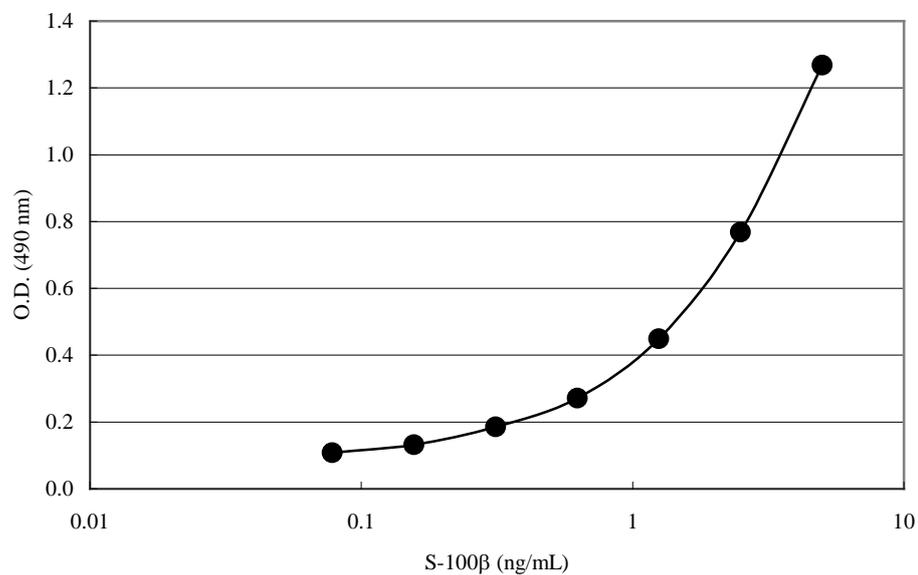
1. キット内容を室温（20～30℃）に戻す。
標準液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. 各ウエルに、洗浄液 300 μ L を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに2回繰り返し、合計3回の洗浄操作を行う。
3. 各ウエルに緩衝液 100 μ L を入れ、ついで標準液または検体 20 μ L を加える。標準液の分注を始めてから検体の分注を終えるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください(30分以内)。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で3時間振とうする（約100rpm）。
5. 各ウエル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計4回行う。
6. 各ウエルに標識特異抗体溶液 100 μ L を加える。
7. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で1時間振とうする（約100rpm）。
8. 各ウエル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計4回行う。
9. 各ウエルに SA-HRP 溶液 100 μ L を加える。
10. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で1時間振とうする（約100rpm）。
11. 10)の反応終了直前に OPD 錠 1錠を基質溶解液 12mL に加え溶解し、発色剤溶液を調製する。
12. 各ウエル中の液を除き、2)と同様の洗浄操作を5回行う。
13. 各ウエルに上記調製した発色剤溶液 100 μ L を入れ、室温で静置し30分間反応させる。
14. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μ L を入れる。
15. マイクロプレート用吸光度計で 490nm の吸光度を測定する。
16. 市販のソフトウェアを用いて、4 (or 5) -Parameter、もしくは Log-Logit の回帰式を使用し、S-100 β 標準液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、検体の S-100 β 濃度を求める。片対数方眼紙を用いる場合は、横軸 (Log 側) に標準液の濃度を、縦軸 (Linear 側) に標準液各濃度の吸光度をプロットし、標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、S-100 β の濃度を読み取る。

V. 操作上の注意

1. 血液検体は採取後、血漿を分離し、直ちに測定してください。脳脊髄液検体につきましても、採取後、血球および細胞成分を遠心分離により取り除いた後、直ちに測定してください。これら血漿および脳脊髄液検体を直ちに測定できない場合は適宜小分けして、 -30°C 以下で凍結保存してください。血液は EDTA-2Na (1mg/mL) 添加採血管で採取してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。
2. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品は調製後、直ちに使用してください。キットを分割使用する場合、溶解後の標準品の保存にはガラス製の容器(バイアル瓶等)をお使いください。分割使用の際は 5ng/mL の標準液から新たに希釈調製を行ってください。溶解後の標準品は 4°C で 2 週間、 -30°C 以下で 4 週間の保存が可能です。
3. 標準液の分注を始めてから検体の分注を終えるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください(30 分以内)。
4. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。
5. 各ウェルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行ってください。また検体をウェルに注入する場合は、検体ごとに新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。標準液を希釈するときは、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。
6. 5ng/mL を超える高値検体の場合は、検体を本キット添付の緩衝液にて希釈して測定してください。
7. 室温での反応には必ずマイクロプレート用振とう機を用い、測定プレートを振とうしてください(呈色反応の場合を除く)。なお振とうはプレート密閉用シールに反応液がはねないようにゆっくりと行ってください(約 100rpm)。
8. 測定はすべて 2 重測定で行ってください。
9. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
10. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度などでわずかですが影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごとに作成してください。
11. 各試薬の保存中もしくは使用中には、これらに強い光が当たらないように注意してください。
12. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせ使用しないでください。

VI. 基本性能

<標準曲線の一例>



<添加回収試験>

<ヒト血漿>

<ヒト血漿 A>

Added Bovine S-100β (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.21		
0.10	0.30	0.31	96.77
0.50	0.67	0.71	94.37
2.00	1.91	2.21	86.43

<ヒト血漿 B>

Added Bovine S-100β (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.18		
0.10	0.27	0.28	96.43
0.50	0.61	0.68	89.71
2.00	1.65	2.18	75.69

<ラット血漿>

<ラット血漿 A>

Added Bovine S-100 β (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.55		
0.10	0.62	0.65	95.39
0.50	0.89	1.05	84.76
2.00	1.99	2.55	78.04

<ラット血漿 B>

Added Bovine S-100 β (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	1.03		
0.10	1.11	1.13	98.23
0.50	1.38	1.53	90.20
2.00	2.27	3.03	74.92

<ラット血漿 C>

Added Bovine S-100 β (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.45		
0.10	0.53	0.55	96.36
0.50	0.79	0.95	83.16
2.00	1.78	2.45	72.65

<マウス血漿>

<マウス血漿 A>

Added Bovine S-100 β (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.08		
0.10	0.16	0.18	88.89
0.50	0.53	0.58	91.38
2.00	1.81	2.08	87.02

<マウス血漿 B>

Added Bovine S-100 β (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.11		
0.10	0.21	0.21	100.00
0.50	0.54	0.61	88.53
2.00	1.72	2.11	81.52

<ヒト CSF>

<ヒト CSF>

Added Bovine S-100 β (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.14		
0.10	0.24	0.24	100.00
0.50	0.55	0.64	85.94
2.00	1.87	2.14	87.38

<ラット CSF>

<ラット CSFA>

Added Bovine S-100 β (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.22		
0.10	0.30	0.32	93.75
0.50	0.59	0.72	81.94
2.00	1.94	2.22	87.39

<ラット CSFB>

Added Bovine S-100 β (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.16		
0.10	0.25	0.26	96.15
0.50	0.56	0.66	84.85
2.00	1.86	2.16	86.11

<希釈試験>

<ヒト血漿>

ヒト血漿	Dilution ratio	Observed (ng/mL)	Estimated (ng/mL)	Recovery (%)
ヒト血漿 A	x 1.0	0.171		
	x 1.5	0.122	0.114	107.02
	x 2.0	0.088	0.086	102.33
ヒト血漿 B	x 1.0	0.362		
	x 1.5	0.260	0.241	107.88
	x 2.0	0.187	0.181	103.31

<ラット血漿>

ラット血漿	Dilution ratio	Observed (ng/mL)	Estimated (ng/mL)	Recovery (%)
ラット血漿 A	x 1.0	0.642		
	x 2.0	0.271	0.321	84.42
	x 4.0	0.110	0.161	68.32

ラット血漿 B	x 1.0	1.211		
	x 2.0	0.524	0.606	86.47
	x 4.0	0.220	0.303	72.61
ラット血漿 C	x 1.0	0.529		
	x 2.0	0.236	0.265	89.06
	x 4.0	0.094	0.132	71.21

<マウス血漿>

マウス血漿	Dilution ratio	Observed (ng/mL)	Estimated (ng/mL)	Recovery (%)
マウス血漿 A	x 1.0	0.104		
	x 1.5	0.062	0.069	89.86
	x 2.0	0.042	0.054	77.78
マウス血漿 B	x 1.0	0.154		
	x 1.5	0.098	0.102	96.08
	x 2.0	0.068	0.077	88.31

<ヒト CSF>

ヒト CSF	Dilution ratio	Observed (ng/mL)	Estimated (ng/mL)	Recovery (%)
ヒト CSF	x 1.0	0.207		
	x 1.5	0.116	0.138	84.06
	x 2.0	0.088	0.104	84.62

<ラット CSF>

ラット CSF	Dilution ratio	Observed (ng/mL)	Estimated (ng/mL)	Recovery (%)
ラット CSF A	x 1.0	0.402		
	x 2.0	0.191	0.201	95.03
	x 4.0	0.105	0.101	103.96
ラット CSF B	x 1.0	4.379		
	x 1.5	3.096	2.919	106.06
	x 2.0	2.101	2.190	95.94

<再現性試験>

同時再現性：CV(%) 2.99～4.82

日差再現性：CV(%) 4.82～9.20

VII. 貯蔵法および有効期間

<貯法>

遮光し、2～8℃にて保存してください。

<有効期間>

製造日より 12 ヶ月

<包装>

1 キット 96 テスト分(標準曲線作成用を含む)

VIII. 文献

1. Ingebrigtsen T, Romner B, Kongstad P, and Langbakk B (1995). Increased serum concentration of protein S-100 after minor head injury: a biochemical serum marker with prognostic value? *Psychiatry*, 103-104.
2. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, and Kaps M (1997). S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic Stroke. *Stroke* **28**, 1956-1960.
3. Buttner T, Weyees S, Postert T, Sprengelmeyer R, and Kuhu W (1997). S-100 protein : Serum Marker of local brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke* **28**, 1961-1965.
4. Wiesmann M, Missler U, Hagenstrom H, and Gottmann D (1997). S-100 protein plasma level after aneurysmal subarachnoid Haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* **139**, 1155-1160.
5. Woertgen CH, Rotherl RD, Holzschuh M, Metz CH, and Brawanski A (1997). Comparison of serial S-100 and NSE serum measurements after severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)* **139**, 1161-1165.
6. Mckeating E G, Andrews P J D, and mascia L (1998). Relationship of neuro specific enolase and protein S-100 concentration in systemic and jugular venous serum to injury severity and outcome after traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Suppl)* **7**, 117-119.
7. Raave A, Grolms C, Keller M, Dohnert J, Sorge O, and Seifer V (1998). Correlation of computed tomography findings and serum brain damage markers following severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)* **140**, 787-792.

8. Kanai H, Marushima H, Kimura N, Iwaki T, Saito M, Maehashi H, Shimizu K, Muto M, Masaki T, Ohkawa K, Yokoyama K, Nakayama M, Harada T, Hano H, Hataba Y, Fukuda T, Nakamura M, Totsuka N, Ishikawa S, Unemura Y, Ishii Y, Yanaga K, and Matsuura T (2007). Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic encephalopathy. *Artif Organs*. **31**, 148-51.
9. Takeda M, Yaguchi A, Yuzawa J, Yamada S, and Nagai A (2008). Serum S-100 β Protein as a Biomarker for Brain Damage in Patients with Encephalopathy. *J Tokyo Wom Med Univ* **78**, 454-460
10. Kaneda K, Fujita M, Yamashita S, Kaneko T, Kawamura Y, Izumi T, Tsuruta R, Kasaoka S, and Maekawa T (2010). Prognostic value of biochemical markers of brain damage and oxidative stress in post-surgical aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients. *Brain Res Bull*. **81**, 173-7.
11. Honda M, Tsuruta R, Kaneko T, Kasaoka S, Yagi T, Todani M, Fujita M, Izumi T, and Maekawa T (2010). Serum glial fibrillary acidic protein is a highly specific biomarker for traumatic brain injury in humans compared with S-100B and neuron-specific *enolase*. *J Trauma*. **69**, 104-9.

<お問合せ先>

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX:0544-22-2770 TEL:0544-22-2771

www.yanaihara.co.jp ask@yanaihara.co.jp

2019年10月10日改訂