

*本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用しないで下さい。
*下記 web 上に掲載しているプロトコールの最新版を確認の上、操作して下さい。
<http://metallogenics.co.jp/>

測定の意義

最も一般的な生化学マーカーの一つである Creatine Kinase (CK) は ATP または ADP を補酵素とし、クレアチンとクレアチンリン酸 (CP) 間の反応を媒介する。主に興奮性を持つ細胞において高エネルギーリン酸結合 (CP) の貯蔵または ATP の再生産に関係する重要な酵素である。CK は M 型 (筋型) と B 型 (脳型) の 2 種類のサブユニットからなる二量体で、分子量は約 82kDa であり、細胞質上清分画に存在する CK には、CK-BB (CK₁)、CK-MB (CK₂)、CK-MM (CK₃) の 3 種のアイソザイムが存在する。中でも、CK-MB は特異性の面から急性心筋梗塞の重症度の指標や経過観察に用いられ、ピーク値は心筋壊死量と良好な相関を示す。また、筋ジストロフィーや一部の悪性腫瘍などにおいて CK-MB の上昇がみられることが報告されている。

測定原理

本キットは抗 CK-MB モノクローナル抗体とビオチンアビジン反応を用いたサンドイッチ ELISA 法キットです。

- ① 抗体固相化プレート上の抗 CK-MB 捕捉抗体と試料中の抗原 (CK-MB) を反応させる。
- ② 反応後、試料を洗浄操作により除去する。
- ③ 捕捉抗体に結合した抗原とビオチン標識抗 CK-MB 抗体を反応させる。
- ④ 反応後、余剰のビオチン標識抗 CK-MB 抗体を洗浄操作により除去する。
- ⑤ 捕捉抗体-抗原-ビオチン標識抗 CK-MB 抗体複合体と HRP(Horseradish peroxidase)標識ストレプトアビジンを反応させる。
- ⑥ 余剰の HRP 標識ストレプトアビジンを洗浄操作により除去する。発色基質を加え、吸光度を測定し、検量線より濃度を求める。

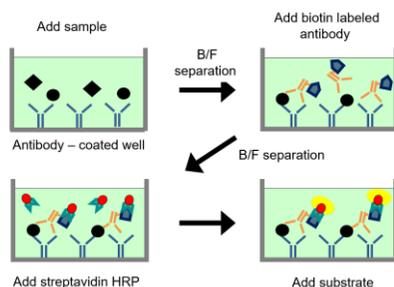


図 1 : 測定概略

キット内容

合計 96 測定分 (商品コード: C-CM01Q)			
1.	抗体固相化プレート	×1	
2.	ビオチン標識抗 CK-MB 抗体 (100×)	0.12 mL×1	
3.	R-1: 抗体希釈液	12 mL×1	●
4.	HRP 標識ストレプトアビジン (100×)	0.12 mL×1	
5.	R-2: ストレプトアビジン希釈液	12 mL×1	●
6.	洗浄液 (10×)	30 mL×1	●
7.	Diluent: 試料希釈液	30 mL×1	●
8.	標準試料	×1	遮光バイアル
9.	R-3: 発色基質 (TMB)	12 mL×1	遮光ボトル
10.	R-4: 反応停止液 (1 mol/L 硫酸)	12 mL×1	●
11.	マイクロプレートシール	×3	

キット以外に必要な器具・試薬

- マイクロプレートリーダー
- マイクロピペットおよびチップ
- マルチチャンネルピペット
- メスシリンダー
- サンプルチューブ
- マイクロプレートシェーカー
- ペーパータオル
- マルチチャンネルピペット用リザーバー
- 精製水

測定試料の注意点

- 試料は新鮮なもの又は-20°C 以下で保存したものを使用して下さい。保存料は使用しないでください。

操作方法

1. 試薬の調製
 - (1) WR1 (Working Reagent 1: ビオチン標識抗 CK-MB 抗体試薬) の調製
 - ① ビオチン標識抗 CK-MB 抗体 (100×) 全量を R-1 のボトルへ添加する。
 - ② R-1 のボトルラベルのチェックボックスへ印 (R-1) を付け、これを WR1 (WR: Working Reagent) とする。
 - (2) WR2 (Working Reagent 2: HRP 標識ストレプトアビジン試薬) の調製
 - ① HRP 標識ストレプトアビジン (100×) 試薬全量を R-2 のボトルへ添加する。
 - ② R-2 のボトルラベルのチェックボックスへ印 (R-2) を付け、これを WR2 とする。
 - (3) WB (Wash Buffer: 洗浄液) の調製
 - ① 洗浄液(10×)全量を精製水で 10 倍希釈し、WB: Wash Buffer とする。

(4) 検量線標準試料の調製 (検量線標準試料: 以下 STD とする)

- ① 標準試料のボトルに、ラベルに記載された量の **Diluent** を添加し、15 分間静置して完全に溶解させ、濃度(200ng/mL)の STD を調整する。(溶解させた後は冷蔵保存し、当日中に使用すること)
- ② STD(200ng/mL)を **Diluent** にて希釈し、各濃度の STD を調製する。

表 1. 各 STD 希釈例

各STD 開始濃度 (ng/mL)	各STD (μL)	+	Diluent (μL)	=	各STD (μL)	各STD 終濃度 (ng/mL)
200	75				150	100
100	75	75	50			
50	75	225	12.5			
12.5	75	75	6.25			
6.25	75	75	3.125			
3.125	75	75	1.56			

※ 洗浄操作

- A) **WB** 300 μL をウェルに分注する。
- B) ウェル中の **WB** を廃棄する。
- C) A)および B)を 2 回繰り返す (合計 3 回)。
- D) ペーパータオルに叩きつけるようにし、しっかりと液を切る。

- (5) 各ウェルに、**WR1** を 100 μL 添加する。
- (6) 抗体固相化プレートにマイクロプレートシールを貼り付け、室温で 1 時間反応させる。
- (7) (6)の反応時間終了後、反応液を廃棄し、(4)と同様に **WB** にて洗浄する。
- (8) 各ウェルに、**WR2** を 100 μL 添加する。
- (9) 抗体固相化プレートにマイクロプレートシールを貼り付け、室温で 30 分間反応させる。
- (10) (9)の反応時間終了後、反応液を廃棄し、(4)と同様に **WB** にて洗浄する。
- (11) 各ウェルに、**R-3** を 100 μL 添加する。
- (12) 抗体固相化プレートを、マイクロプレートシェーカーなどで振とうし、遮光して室温で 30 分間反応させる。
- (13) 各ウェルに、**R-4** を 100 μL 添加する。
- (14) 450 nm の吸光度を測定する。

4. 測定値の算出

- (1) 試料毎に吸光度の平均値を求める。
- (2) 検量線試料の CK-MB 濃度に対する吸光度をプロットし、検量線を作成する。
- (3) 検量線より試料中の CK-MB 濃度を読み取る。

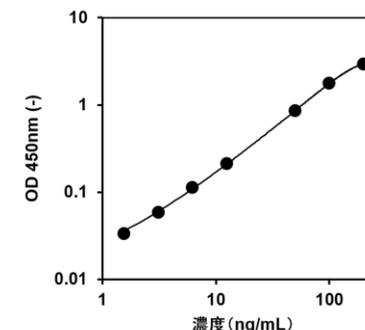


図 3. 検量線の例

2. 測定試料

血清、もしくは血漿を測定試料とする。

3. 測定

- (1) **Diluent**、各 STD、測定試料を抗体固相化プレートのウェルに 25 μL 添加する (各試料 2 ウェルずつ)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	▲	▲	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	⑦	⑦	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	⑥	⑥	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	⑤	⑤	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	④	④	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	③	③	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	②	②	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	①	①	○	○	○	○	○	○

- ▲ : **Diluent**
- : 各 STD (CK-MB 濃度)
- ⑦ : 1.56 ng/mL
- ⑥ : 3.125 ng/mL
- ⑤ : 6.25 ng/mL
- ④ : 12.5 ng/mL
- ③ : 50 ng/mL
- ② : 100 ng/mL
- ① : 200 ng/mL
- : サンプル

図 2. プレート上のサンプル・各 STD 配置例

- (2) (1)のウェルに **Diluent** を 100 μL ずつ添加し、軽く抗体固相化プレートを手で振とうしてウェル内溶液を混合する。
- (3) 抗体固相化プレートにマイクロプレートシールを貼り付け、室温で 1 時間反応させる。
- (4) (3)の反応時間終了後、反応液を廃棄し、**WB** にて洗浄する。

注意点

1.測定

- ・別ロットの試薬は使用しないでください。
- ・検量線は測定毎に作成してください。
- ・発色基質はできるだけ光を当てないでください。
- ・洗浄後の抗体固相化プレートは、測定終了まで乾燥させないでください。
- ・抗体固相化プレートは、底面に抗体が固相化されていますので、ピペットとの接触によって抗体がはがれると、ばらつきの原因になります。ピペットがプレートの底面や壁面に触れないようにしてください。
- ・プレートの温度のムラは測定値のばらつきの原因となります。
 - A) 試薬及びプレートは、必ず室温(20~25°C)に戻してから使用して下さい。
 - B) 反応は必ず室温で行ってください。また、室内でも温度差や風当たりなどで、温度ムラの生じる箇所があります。エアコンの吹き出し口近辺などの温風や冷風の当たる場所、熱源近辺、窓際などの日光の当たる場所などでは使用しないでください。
 - C) 指などで長時間プレートに触れると、プレートが体温により加温されプレート内で温度差が生じます。プレートにはなるべく触れないようにしてください。
- ・試薬は順番通り、正確な時間で滴下してください。また、反応時間は正確にとってください。
- ・反応停止液は強酸です。取り扱いには十分注意してください。

2.本キットを分割使用する際の注意

- ・本キットに添付の試薬類は、当日中に使用しない場合、キャップをしっかりと閉め、冷蔵保存してください。
- ・希釈した検量線試料は廃棄し、再調製して下さい。
- ・抗体固相化プレートの未使用ウェルストリップは、チャック袋に乾燥剤を同梱の上、冷蔵保管して下さい。
- ・開封後の試薬・抗体固相化プレートの未使用ウェルストリップは、冷蔵で一週間保管が可能です。

製品仕様

測定範囲：1.56 - 200 ng/mL
測定数：96 測定
測定方法：ELISA 法
測定波長：450 nm
測定試料：血清、血漿
交差性：Human
特異性：CK-MB を除く人血清成分との反応はありません。

参考文献

- 1.) 金井正光, 臨床検査法提要, 改訂 33 版, 金原出版 (2010): 605
- 2.) Ruzich, Russell S. "Cardiac enzymes: how to use serial determinations to confirm acute myocardial infarction." Postgraduate medicine 92.7 (1992): 85-92.

製造販売業者

セルスペクト株式会社
岩手県盛岡市北飯岡 1-10-82
※クオンテスタは、セルスペクト株式会社の試薬キットの名称です。

問い合わせ先

メタロジェニクス株式会社
〒260-0015
千葉市中央区富士見 1-14-13 千葉大栄ビル
TEL : 043-227-6767
FAX : 043-227-6768
e-mail : sales@ak-j.com
URL : <http://metallogenics.co.jp/>

- ※ 取扱説明書、測定プロトコル等、製品に関する最新の情報は下記弊社 web サイトのサポートコーナーでご確認下さい。
<http://metallogenics.co.jp/>
- ※ 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではありません。あらかじめご了承下さい。
- ※ 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダーを用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承下さい。
- ※ 品質に関してのお問い合わせの際は試薬キット包装袋に貼付の Lot No. をご確認の上、お問い合わせ下さい。
- ※ 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコルは予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切にご使用下さい。
- ※ 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については付属の安全データシート (SDS) に従って下さい。
- ※ 「Metallogenics (MG)」はメタロジェニクス(株)とセルスペクト(株)が展開する研究用試薬ブランドの名称です。