

*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

C 反応性蛋白 (CRP) は肺炎双球菌の細胞壁から抽出された C 多糖体と結合する血清蛋白で、急性炎症では発病後 10 時間以内に上昇することが知られている。急性炎症による組織の傷害・壊死や病原体成分は、マクロファージや肥満細胞を活性化させ、これらから Tumor Necrosis Factor (TNF) と Interleukin-1 (IL-1) が産生される。この TNF や IL-1 はマクロファージや周囲の間質の細胞に働きかけ、肝細胞へ作用する IL-6 を産生し、CRP の合成・分泌を増加させる。そのため、CRP の産生量は炎症反応の強さと相関して鋭敏に上昇し、病態の改善後速やかに低下するため炎症反応の指標とされる場合が多い。特に、同様の非特異的炎症反応である赤沈と比較して、貧血、高グロブリン血症、DIC、妊娠などの影響を受けないので、このような病態における炎症反応の判定に有用である。また、癌の進展に伴って上昇するので、広義の腫瘍マーカーとしても有用である。

近年、動脈硬化は慢性に経過する血管組織の炎症で、動脈硬化巣に浸潤した炎症性細胞から分泌される炎症性サイトカインにより CRP が産生され微増することが知られており、さらにその濃度は血管内皮の機能障害の程度と相関し、その微増が狭心症や心筋梗塞を起こす危険因子として注目されている。

測定原理

本キットは抗 CRP モノクローナル抗体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 CRP 捕捉抗体と試料中の抗原 (CRP) 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 HRP (Horseradish peroxidase) 標識抗 CRP 抗体を反応させる。
- ④ 余剰の HRP 標識抗 CRP 抗体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 CRP 濃度を求める。

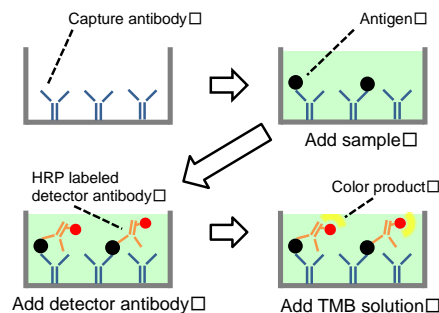


図 1 : 測定概略

キット内容

合計 96 測定分 (商品コード: C-CP01Q)		
1. 抗体固相化プレート	×1	
2. HRP 標識抗 CRP 抗体 (100×)	0.12 mL×1	
3. <u>R-1 : 抗体希釈液</u>	12 mL×1	●
4. <u>洗浄液 (10×)</u>	20 mL×1	●
5. <u>Diluent : 試料希釈液</u>	60 mL×1	●
6. <u>標準試料</u> : CRP 1,000 ng/mL	×1	遮光チューブ
7. R-2 : 発色基質 (TMB)	12 mL×1	遮光ボトル
8. <u>R-3 : 反応停止液 (1 mol/L 硫酸)</u>	12 mL×1	●
9. マイクロプレートシール	×2	

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。
- 5,000 - 25,000 倍程度に希釈し、測定試料としてください。

操作方法

1. 試薬の調製

- (1) **WR** (Working Reagent : HRP 標識抗 CRP 抗体試薬) の調製
 ① HRP 標識抗 CRP 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 **WR** : Working Reagent とする。

- (2) **WB** (Wash Buffer : 洗浄液) の調製
 洗浄液 (10×) 全量を精製水で 10 倍希釈し、**WB** : Wash Buffer とする。

- (3) 検量線標準試料の調製
 標準試料 (CRP 1,000 ng/mL) を **Diluent** にて希釈する。

表 1. 標準試料の希釈例

No.	開始濃度 (ng/mL)	終濃度 (ng/mL)	試料 (μL)	Diluent (μL)	総量 (μL)
1	1,000	10	10	990	1,000
2	10	5	300	300	600
3	5	1	120	480	600
4	1	0.5	300	300	600
5	0.5	0.25	300	300	600
6	0.25	0.125	300	300	600
7	0.125	0.0625	300	300	600

2. 測定試料の調製

測定試料は 5,000 – 25,000 倍程度に **Diluent** にて希釈し、測定試料とする。

表 2. 測定試料希釈例

試験管 No.	希釈試料	試料量 (μL)	Diluent (μL)	開始希釈倍率	希釈倍率
1	血清、血漿	10	240	血清、血漿	25
2	試験管 No.1	10	190	25	500
3	試験管 No.2	10	190	500	10,000

3. 測定

- (1) 抗体固相化プレートをアルミパウチより取り出し、**WB** にて洗浄する。
 ※洗浄操作
 A) **WB** 300 μL をウェルに添加する。
 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。
- (2) **Diluent**、各検量線試料、測定試料を抗体固相化プレートのウェルに 100 μL ずつ分注する。
 (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**
 ● : 検量線試料 (CRP 濃度)
 ① : 10 ng/mL
 ② : 5 ng/mL
 ③ : 1 ng/mL
 ④ : 0.5 ng/mL
 ⑤ : 0.25 ng/mL
 ⑥ : 0.125 ng/mL
 ⑦ : 0.0625 ng/mL
 ○ : 試料

図 2. プレート上の試料・検量線試料配置例

- (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、(1)と同様に **WB** にて洗浄する。
- (5) 各ウェルに、**WR** 100 μL を添加する。
- (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、(1)と同様に **WB** にて洗浄する。
- (8) **R-2** 100 μL を各ウェルに添加する。
- (9) 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。
- (10) **R-3** 100 μL を各ウェルに添加する。
- (11) 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CRP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CRP濃度を読み取る。

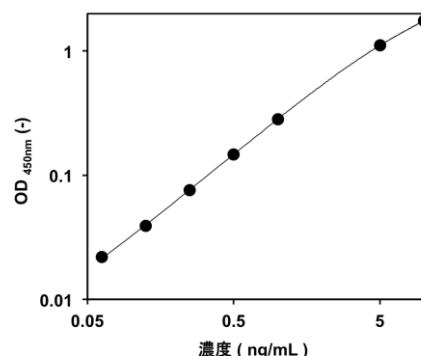


図3. 検量線の例

製品仕様

測定範囲：0.0625 - 10 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：CRP を除く人血清成分との反応はありません。

参考文献

- 1.) 大谷英樹, "C 反応性蛋白 (CRP)." 日本臨床 53 (1995): 233-236.
- 2.) 金井正光, 臨床検査法提要, 改訂 33 版, 金原出版 (2010): 419-422.
- 3.) Ridker, Paul M. "High-sensitivity C-reactive protein." Circulation 103.13 (2001): 1813-1818.

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
※クオンテストは、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、測定プロトコール等、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。あらかじめご了承ください。
- ※ 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。あらかじめご了承ください。
- ※ 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・測定プロトコー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。

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。