

*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

H-FABP(Heart-type fatty acid binding protein: 心臓型脂肪酸結合蛋白、FABP3 遺伝子にコードされるため FABP3 と呼ばれることもある) は分子量 14.9kDa の心筋細胞内に多く存在する低分子細胞質可溶性蛋白である。心筋細胞内で遊離脂肪酸の細胞内輸送に関与し、心筋細胞へのエネルギー供給に重要な働きを担っている。心筋が虚血状態に陥った際に鋭敏な遊出動態を示すことから、急性心筋梗塞をはじめとする心筋傷害の血液生化学的のマーカーとして活用されている。

H-FABP は骨格筋より心筋に多く存在するため、ミオグロビンと比べ心筋特異度が高く、胸痛発症後 2 時間以内の超急性期から鋭敏に反応する心筋傷害マーカーである。しかし、特異度はトロポニンに及ばず、偽陽性には注意が必要である。H-FABP は主に腎から排出されるため、腎機能低下症例においては陽性になる。

測定原理

本キットは抗 H-FABP 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 H-FABP 捕捉抗体と試料中の抗原 (H-FABP) 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 H-FABP 抗体を反応させる。
- ④ 反応後、余剰のビオチン標識抗 H-FABP 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 H-FABP 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。

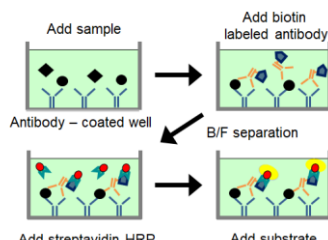


図 1 : 測定概略

キット内容

合計 96 測定分 (商品コード: C-FP01Q)			
1.	抗体固相化プレート	×1	
2.	ビオチン標識抗 H-FABP 抗体 (100×)	0.12 mL×1	
3.	<u>R-1: 抗体希釈液</u>	12 mL×1	●
4.	HRP 標識ストレプトアビジン (100×)	0.12 mL×1	
5.	<u>R-2: ストレプトアビジン希釈液</u>	12 mL×1	●
6.	<u>洗浄液 (10×)</u>	20 mL×1	●
7.	<u>Diluent: 試料希釈液</u>	30 mL×1	●
8.	標準試料: H-FABP 80 ng/mL	×1	遮光バイアル
9.	R-3: 発色基質 (TMB)	12 mL×1	遮光ボトル
10.	<u>R-4: 反応停止液 (1 mol/L 硫酸)</u>	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 H-FABP 抗体試薬) の調製
 - ① ビオチン標識抗 H-FABP 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: Working Reagent 1 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: Working Reagent 2 とする。
- (3) 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。
- (4) 検量線標準試料の調製
 - 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る。(溶解させた後は冷蔵保存し、当日中に使用しない場合は冷凍して保管すること)
 - ② 溶解させた 標準試料 (HFABP 80 ng/mL) を Diluent で希釈する。

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	80	40	75	75	150
2	40	20	75	75	150
3	20	10	75	75	150
4	10	5	75	75	150
5	5	2.5	75	75	150
6	2.5	1.25	75	75	150

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 μ L 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	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○

- ▲ : **Diluent**
● : 検量線試料 (H-FABP 濃度)
① : 80 ng/mL
② : 40 ng/mL
③ : 20 ng/mL
④ : 10 ng/mL
⑤ : 5 ng/mL
⑥ : 2.5 ng/mL
⑦ : 1.25 ng/mL
○ : 試料

図 2. プレート上の試料・検量線試料配置例

- (11) 各ウェルに、**R-3** を 100 μ L 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 μ L 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 H-FABP 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 H-FABP 濃度を読み取る。

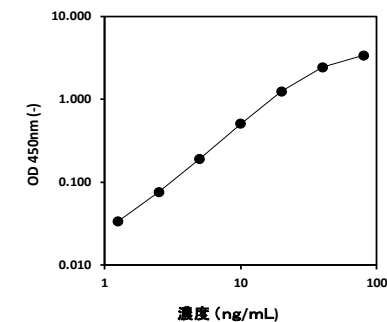


図 3. 検量線の例

- (2) (1)のウェルに **Diluent** を 100 μ L 分注し、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。

※ 洗浄操作

- A) **WB** 300 μ L 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。

- (5) 各ウェルに、**WR1** を 100 μ L 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) 各ウェルに、**WR2** を 100 μ L 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、(1)と同様に **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、ばらつきの原因となります。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：1.25 - 80 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：H-FABP 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): 1594
- 2.) Schaap FG, van der Vusse GJ, Glatz JF. Fatty acid-binding proteins in the heart. *Molecular and Cellular Biochemistry* 180 (1998): 43-51
- 3.) Górski, Jan, et al. "Increased fatty acid-binding protein concentration in plasma of patients with chronic renal failure." *Clinical chemistry* 43.1 (1997): 193-195.
- 4.) Schaap, Frank G., Ger J. van der Vusse, and Jan FC Glatz. "Fatty acid-binding proteins in the heart." *Cardiac Metabolism in Health and Disease*. Springer, Boston, MA, 1998. 43-51.

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)が開発する研究用試薬ブランドの名称です。