LIFE IS NOW AND FUTURE

(研究目的のみに使用してください。臨床診断には使用しないでください。)

商品番号：EP27648

豚プロ MMP-13（プロマトリックスメタロプロテアーゼ 13）ELISA キット
マニュアル

実験中にご質問がある場合やさらにサポートが必要な場合は、お気軽に以下の方法でお問い合わせください。

メール（購入） order@enkilife.com

メール（テクニカルサポート） techsupport@enkilife.com

電話: 0086-27-87002838

Web サイト: japan.enkilife.com

賞味期限： 外箱のラベルをご参照ください。

テクニカルサポート： より良いサービスを提供するために、外箱のラベルに記載されているロット番号をお知らせください。

製品説明

本ELISAキットは、血清、血漿およびその他の生物学的体液中の 豚 Pro-MMP-13 濃度を体外で定量測定するために適用される。

主な特徴

●感度：46.88pg/mL.
●検出範囲：78.13-5000pg/mL.
●特異性：他の類似体との明らかな交差反応なしに、サンプル中の 豚 Pro-MMP-13 を検出できます。
●再現性：プレート内およびプレート間の変動係数は 10%未満である。

テスト原理

本試験キットは、サンドイッチ ELISA 法を採用しています。酵素標識プレートに抗豚 Pro-MMP-13 抗体を固相化し、検体（または標準品）中の豚 Pro-MMP-13 が固相化抗体と結合します。その後、ビオチン標識抗豚 Pro-MMP-13 抗体と HRP 標識アビジンを順次添加すると、ビオチン標識抗体は固相化抗体に捕捉された豚 Pro-MMP-13 に結合し、ビオチンとアビジンが特異的に結合して免疫複合体を形成します。遊離成分は洗浄により除去され、発色基質（TMB）を添加すると HRP の触媒作用により青色に呈色し、反応停止液を添加することで黄色に変化します。マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度（OD 値）を測定し、豚 Pro-MMP-13 濃度と OD450 値の間に正の相関が認められるため、標準曲線より検体中の豚 Pro-MMP-13 濃度を算出します。

コンポーネントとストレージ

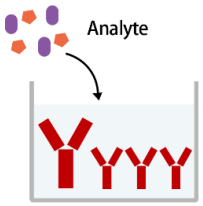
未開封の場合は2～8℃で保管してください。お受け取り後は速やかに開梱し、説明書に記載されている推奨保管方法に従って保管してください。

<table>
<tr><th>コンポーネント</th><th>仕様</th><th colspan="2">保管と注意事項</th></tr>
<tr><td rowspan="2">マイクロプレート
(Micro Plate)</td><td>96T: 8 wells×12 strips</td><td rowspan="2">未開封：20℃、12ヶ月</td><td rowspan="2">未使用の場合：
アルミホイル袋に戻し、密封して-20℃で保管してください。</td></tr>
<tr><td>48T: 8 wells×6 strips</td></tr>
<tr><td>参照標準
(Reference Standard)</td><td>96T: 2 vials</td><td>未溶解：-20℃、12 ヶ月</td><td>各実験ごとに新しく溶解した標準液を使用してくださ</td></tr>
</table>

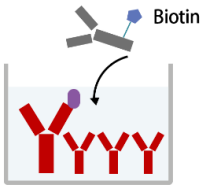
	48T: 1 vial		い。溶解後に残った標準液は廃棄してください。
ビオチン化検出抗体濃縮液（100×） [Biotinylated Detection Ab Concentrate (100×)]	96T: 120μL×1 vial	-20℃、12 ヶ月	**未使用:** 濃縮液は密封して-20℃で保管し、作業液は廃棄してください。
	48T: 60μL×1 vial		
HRP コンジュゲート濃縮物（100×） [HRP Conjugate Concentrate (100×)]	96T: 120μL×1 vial	-20℃（光から保護）、12 ヶ月	**未使用:** 濃縮液は密封して-20℃で保管し、作業液は廃棄してください。
	48T: 60μL×1 vial		
参照標準とサンプル希釈液 (Reference Standard & Sample Diluent)	20mL×1	2～8℃、12 ヶ月	
ビオチン化検出抗体希釈液 (Biotinylated Detection Ab Diluent)	14mL×1		
HRP コンジュゲート希釈液 (HRP Conjugate Diluent)	14mL×1		
洗浄バッファー濃縮液（25×） [Wash Buffer Concentrate (25×)]	30mL×1		
基質試薬（TMB） [Substrate Reagent(TMB)]	10mL×1	2～8℃（光から保護）、12 ヶ月	
停止ソリューション (Stop Solution)	7mL×1	2～8℃/室温	
プレートシーラー Plate Sealer	5 pieces		
製品マニュアル Product manual	1 copy		
分析証明書 Certificate of Analysis	1 copy		

注意:
試薬の蒸発と微生物汚染を防ぐため、すべての試薬ボトルのキャップがしっかりと閉まっていることを確認してください。
実際の容量はラベルに記載されている容量よりもわずかに多くなります。直接注ぐのではなく、正確な計量器具を使用してください。

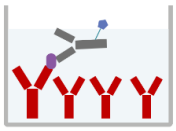
アッセイ手順



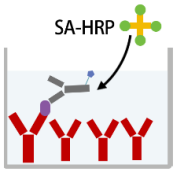
1.ウェルに標準液または試料を100μLずつ加え、
37℃で90分間インキュベートする。



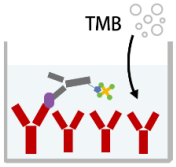
2.廃液を除去し、各ウェルに生物素化抗体工作液
を100μLずつ加え、37℃で60分間
インキュベートする。



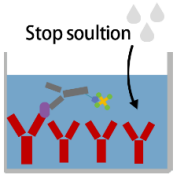
3.プレートのウェル内の液体を除去し、洗浄を3回行う。



4.HRP結合物工作液を100μLずつ加え、
37℃で30分間インキュベートする。洗浄を5回行う。



5.基質（TMB）を90μLずつ加え、
37℃で15分間インキュベートする。



6.各ウェルに50μLのStop Solution
を加えて反応を停止する。



7.直ちに450nmの波長でOD値を測定し、
結果を解析する。

操作方法

ⓘ 注意事項

1. 実験中は保護具を着用してください。血液サンプルやその他の生物学的サンプルに触れる際は、生物学的実験室安全保護規則に従って生物学的安全保護に注意してください。
2. 異なるバッチのキット構成品は混合できません（停止液を除く）。
3. 実験で使用する EP チューブとピペットチップは使い捨てです。混ぜないでください。
4. 開封したばかりの ELISA プレートのウェルに少量の水のような物質が残っている場合がありま

す。これは正常な現象であり、実験結果には影響しません。一時的に使用しないストリップは、予備のアルミホイル袋に入れ、必要な保管条件に従って保管してください。
5. 希釈した標準液、ビオチン化抗体ワーキング溶液、酵素コンジュゲートワーキング溶液は再利用しないでください。
6. 未使用のビオチン化検出抗体濃縮液（100×）、HRP コンジュゲート濃縮液（100×）、およびその他の原液は、必要な保管条件に従って保管してください。
7. ELISA リーダーには、450±10nm の波長を検出できるフィルターが装備されている必要があり、検出範囲は 0～3.5 です。

必要な材料が提供されていない

1. マイクロプレートリーダー（450nm波長フィルター）、37℃に維持できるインキュベーター。
2. 1.5mL EPチューブ、吸水紙。
3. ピペットと使い捨てチップ：0.5-10μL、2-20μL、20-200μL、200-1000μL。
4. 再蒸留水または脱イオン水。

サンプル処理

サンプル採取

異なるサンプルによっては、異なる処理方法が必要となる場合があります。サンプル調製を行う前に、サンプルの特性を把握し、後続の実験に影響を与える可能性のある試薬を避けることが重要です。また、サンプルが不適切な温度や時間にさらされないよう注意してください。以下の方法は参考用です。詳細については、公式のELISAサンプル調製ガイドをご覧ください。

サンプル処理の提案:
1.血清: 血清分離チューブ（SST）を使用し、室温で30分間サンプルを凝固させた後、1000 x gで15分間遠心分離してください。血清を採取し、直ちに測定するか、小分けして-20℃以下で保存してください。凍結融解の繰り返しは避けてください。 溶血または高脂血症のサンプルの使用は避けてください。
2.プラズマ: 抗凝固剤としてEDTA-Na_2を用いて血漿を採取する（採血には抗凝固剤入りのチューブの使用を推奨する） 。採取後30分以内に1000×gで15分間遠心分離する。上清を採取し、測定を行う。 短期保存の場合は、サンプルを2～8℃で保管してください。溶血または高脂血症のサンプルは使用しないでください。
3.組織の均質化:
3.1 一般的な情報として、溶血した血液は結果に影響を及ぼす可能性があるため、組織を細かく

切り刻み、氷冷した PBS (0.01 M、pH = 7.4) で洗い流して余分な血液を完全に除去する必要があります。 次に、使用量に応じて計量します。
3.2 組織片は 重量を量り、PBSで均質化しました（組織重量（g）：PBS（mL）量＝1：9）。ホモジナイズ中に放出されるプロテアーゼの活性を阻害し、標的タンパク質のタンパク質分解を防ぐために、PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤をPBSに追加することをお勧めします。）を氷上でガラスホモジナイザーで分析します。
3.3 細胞をさらに分解するには、超音波処理をします。 超音波細胞破砕機で懸濁液を破砕します（サンプルを氷浴で冷却し、タンパク質の変性や過剰なフリーラジカルの生成を防ぐために超音波の出力と時間を厳密に制御します） 。 次にホモゲネートを 5000 × g で 5 ~ 10 分間遠心分離し、上清を収集してアッセイを実行します。
注:
A. 一部の組織サンプル（例：肝臓、腎臓、膵臓）には、内因性ペルオキシダーゼが高濃度に含まれており、TMB基質と反応して偽陽性を引き起こす可能性があります。このような場合は、組織を細かく刻み、3% H_2O_2に10 ~ 15分間浸漬してください。残留H_2O_2を予め冷却したPBSで洗い流した後、ホモジェナイズして通常通り検査してください。
B. 組織溶解と細胞内タンパク質の遊離を促進するために、穏やかな溶解バッファーを使用することもできます。ただし、Triton X-100、NP-40、またはSDSを含む溶解バッファーは、プロテアーゼ阻害剤がない場合でもリソソームを溶解し、プロテアーゼの遊離を増加させる可能性があるため、使用を避けてください。これらのバッファーは、標的タンパク質を分解し、検査精度を低下させる可能性があります。また、これらの含有量が多いと、検査キットの反応に深刻な影響を与える可能性があります。物理的な溶解が効果がない場合、EnkiLifeの新世代溶解液、RC0005 Cell/Tissue Lysis Bufferをお試しください。
4.細胞溶解物:
4.1 細胞収集:
接着細胞: 適量の予冷した洗浄液で細胞を優しく洗浄する PBSで細胞を分離し、トリプシンで解離する（EnkiLife RC0001トリプシン消化培地の使用を推奨）。細胞懸濁液を遠心分離機に回収する。 チューブに移し、1000×gで5分間遠心分離します。
懸濁細胞: 1500×gで5分間遠心分離します。
半接着細胞: 浮遊細胞用の方法を用いて上清を回収します。次に、接着細胞用の方法を用いて接着細胞を回収します。回収した両方の細胞画分をPBSに再懸濁し、よく混合した後、1000×gで5分間遠心分離して細胞回収を完了します。
4.2 細胞溶解:
細胞を3回洗浄する 予冷したPBSで希釈した。1×10^6 細胞を凍結保存する場合は、あらかじめ冷却したPBSを150～250μL加えてください（細胞量が非常に少ない場合は、PBSの量を減らすことができます）。 細胞を懸濁します。超音波細胞破砕機を用いて細胞が完全に溶解するまで破砕します。 （参考設定：氷浴、3～5mmのプローブ、150～300Wの出力を使用します。1回につき1

～2秒間、30秒間隔で3～5サイクル行います。） 1500×gで10分間遠心分離し、細胞片を除去し、上清を回収してアッセイを実施する。
5. 細胞培養上清またはその他の生体液：サンプルを1000×gで20分間遠心分離し、不純物と細胞残渣を除去する。上清を回収し、アッセイを実施する。

ⓘサンプルに関する注記

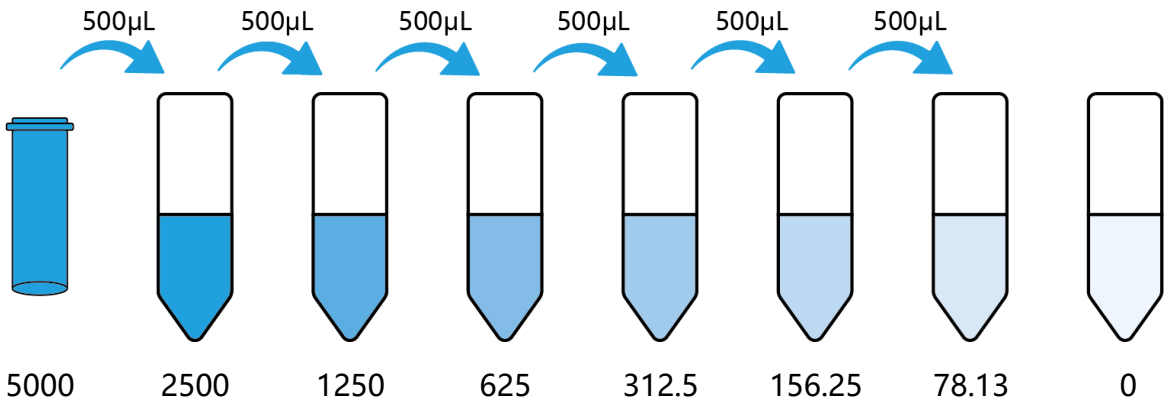
1.採取後のサンプルの保管：
1週間以内に分析してください。2～8℃で保存してください。
1ヶ月以内に使用してください。1回分ずつ小分けし、-20℃で保管してください。
3ヶ月以内に使用してください。1回分ずつ小分けし、-80℃で保管してください。
すべてのサンプルは繰り返しの凍結と解凍を避ける必要があります。
2.測定前に濃度を予測してください。サンプル濃度が標準曲線の範囲外にある場合は、**結果の正確性を確保するために、適切な希釈率を決定するための予備実験を実施することをお勧めします。 （希釈倍数を決定するために、文献を参照した上で予備実験を実施することをお勧めします。）**
3.サンプルの種類がマニュアルに記載されていない場合は、妥当性を検証するための予備実験が推奨されます。
4.組織ホモゲネートや細胞溶解物を調製する際に溶解緩衝液を使用すると、混入した化学物質の影響で偏差が生じる可能性があります。
5.一部の組み換えタンパク質は コーティングされた抗体または検出抗体との不一致により検出される可能性があります。

◊準備

1.室温に戻します。ELISAキットを 20 分前に冷蔵庫から取り出し、室温に戻します。
2.マイクロプレートリーダーを予熱します。実験中にマイクロプレートリーダーの光源を安定させるために、少なくとも 15 分前にマイクロプレートリーダーをオンにしてください。
3.洗浄液： Wash Buffer Concentrate (25×)を再蒸留水で1:24に希釈します。ヒント：冷蔵庫から取り出したWash Buffer Concentrate (25×)には結晶が残っている場合がありますが、これは正常な現象です。洗浄液を調製する前に、40℃のウォーターバスで軽く加熱して結晶を完全に溶解してください。洗浄液は当日中にご使用ください。
4. 標準的な作業溶液:
4.1 標準液を10000×gで1分間遠心分離する。
4.2 凍結乾燥標準にReference Standard & Sample Diluent 1.0 mLを加え、チューブのキャップをしっかり締めて10分間静置し、その後静かに数回転倒する。

4.3 標準液が完全に溶解したら、ピペットで軽く混ぜて5000pg/mL の標準作業液を調製する。
4.4 標準液は実験要求に応じて倍数希釈を行う。推奨濃度勾配は： 5000、2500、1250、625、312.5、156.25、78.13、0 pg/mLとする。
4.5 倍数希釈法:
7本のEPチューブを用意し、それぞれに500μLのReference Standard & Sample Diluentを加える。5000pg/mL標準作業液から500μLをピペットで取り、最初のEPチューブに加える。ピペットで混合し、2500 pg/mL 標準作業液を調製する。次に、2500 pg/mL EPチューブから500μLを取り、2番目のEPチューブに加える。ピペットで混合し、1250 pg/mL 標準作業液を調製する。同様にして、複数の希釈濃度を持つ標準作業液を得る。
注：最後のチューブはブランクとし、**Reference Standard & Sample Diluent**のみを添加する。

以下の図は参考としてください:



5. Biotinylated Detection Ab 作業液:
実験前に必要量（100 μL/ウェル）を計算し、不足に備えて追加で100–200μLを用意する。
Biotinylated Detection Ab Concentrate (100×)を800×gで1分間遠心し、**Biotinylated Detection Ab Concentrate (100×)**を**Biotinylated Detection Ab Diluent**で1×作業液に希釈する（Biotinylated Detection Ab Concentrate (100×)：Biotinylated Detection Ab Diluent＝1：99）。作業液は使用前に調製し、当日中に使用すること。
6. HRP Conjugate 作業液:
実験前に必要量（100 μL/ウェル）を計算し、不足に備えて追加で100–200 μLを用意する。
HRP Conjugate Concentrate (100×)を800×gで1分間遠心し、**HRP Conjugate Concentrate (100×)**をHRP Conjugate Diluentで1×作業液に希釈する（HRP Conjugate Concentrate (100×)：HRP Conjugate Diluent＝1：99）。
作業液は使用前に調製し、当日中に使用すること。

◊操作手順

1. 標準液およびサンプルの添加:

標準液の異なる濃度を、ELISAプレートの上から下へ向かって最初の2列のウェルに、各濃度につき2ウェルずつ加える。各ウェルに100μLずつ加える。
残りのウェルには、各ウェルに100μLの試料を加える。濃度が高い試料は、あらかじめ希釈する必要がある。
操作中は、溶液をマイクロELISAプレートウェルの底に加え、内壁に触れないようにし、軽く振って混合し、気泡を避けながら、試料添加操作を10分以内に完了させる。

2. プレートを覆ってインキュベートする:

キットに同梱されているプレートシーラーでプレートを覆い、37℃で90分間インキュベートする。

3. Biotinylated Detection Ab 作業液:

シーラーをはがし、プレートウェル内の液体を取り除いて乾燥させる。洗浄の必要はない。
各ウェルに**Biotinylated Detection Ab working solution**を100μLずつ加える。軽く振って混合し、新しいプレートシーラーでプレートを覆う。37℃で60分間インキュベートする。

4. プレートを洗浄する1:

手動洗浄:
ウェル内の液体を吸引または注ぎ捨て、各ウェルに350μLの洗浄液を加え、1～2分間浸した後、液体を吸引または注ぎ捨て、清潔な吸収紙に当てて軽くたたき、水分を除去する。これを1回の洗浄とし、この操作を3回繰り返す。各工程で液体を完全に除去することは、良好な性能に不可欠である。
マイクロプレートウォッシャー:
350μL/ウェルで、プレートを3～5秒間振る。

5. Add HRP Conjugate 作業液:

各ウェルに**HRP Conjugate working solution**を100μLずつ加える。軽く振って混合し、新しいプレートシーラーでプレートを覆う。37℃で30分間インキュベートする。

6. プレートを洗浄する2:

プレートを5回洗浄する。手順はステップ4と同じです (**プレートを洗浄する1**).

7. Substrate Reagent (TMB)を加える:

各ウェルに**Substrate Reagent (TMB)**を90μLずつ加える。新しいプレートシーラーでプレートを覆い、37℃で約15分間遮光してインキュベートする。
ヒント: インキュベーション時間は色の変化に応じて調整するが、30分を超えないようにするこ

と。標準ウェルに明確な濃淡グラデーションが現れた時点で、インキュベーションを終了してよい。

8. 反応を停止する:

各ウェルに**Stop Solution**を50μLずつ加えて反応を停止する。

ヒント：Stop Solutionを添加する順序は、Substrate Reagent (TMB)を添加した順序とできるだけ一致させること。

9. OD値を測定する:

ELISAプレートの各ウェルのOD値（光密度）を、450nmに設定されたマイクロプレートリーダーを使用して直ちに測定する。

結果の計算

1. 標準曲線を作成する:

各標準液、コントロールおよび試料の重複測定値を平均し、その平均からゼロ標準液のOD平均値を引く。

マイクロプレートリーダー付属の曲線フィッティングソフトを用いて、各標準液の平均OD値を縦軸、濃度を横軸に取り、4-パラメータ・ロジスティック（4-PL）曲線を作成する。

2. 試料濃度の計算:

試料のOD値を標準曲線に代入して濃度を求める。

試料を希釈している場合は、標準曲線から読み取った濃度に希釈倍率を乗じること。

3. 高OD値試料の処理

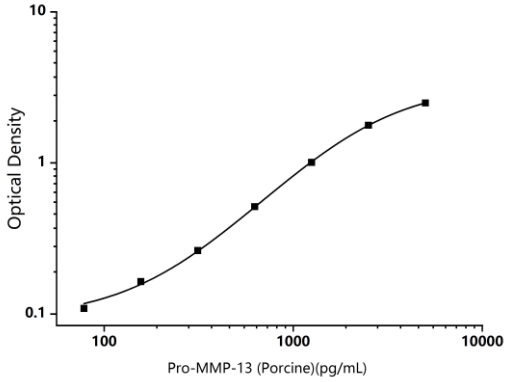
試料のOD値が標準曲線の上限を超える場合は、適切に希釈して再測定すること。

テクニカルデータ

代表的データ:

以下のデータは参考用です。毎回測定時に必ず標準曲線を作成してください。

濃度：pg/mL	5000	2500	1250	625	312.5	156.25	78.13	0
OD	2.393	1.695	1.045	0.521	0.266	0.174	0.12	0.065
修正された OD	2.328	1.63	0.98	0.456	0.201	0.109	0.055	-



精度:

intra-assay precision（アッセイ内精度）：既知濃度の3検体を1枚のプレートで20回測定し、アッセイ内精度を評価した。

inter-assay precision（アッセイ間精度）：既知濃度の3検体を20回別々のアッセイで測定し、アッセイ間精度を評価した。アッセイは少なくとも3名の技術者が2ロットの試薬を用いて実施した。

	アッセイ内精度			アッセイ間精度		
試料	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	20	20	20
平均(pg/mL)	268.87	579.05	2326.69	268.05	533.88	2422.49
標準偏差	15.97	28.26	80.04	16.35	23.86	80.91
CV (%)	5.94	4.88	3.44	16.35	4.47	3.34

回収率:

各種マトリックス中でアッセイ濃度域全体にわたって3段階に添加した 豚 Pro-MMP-13 の回収率を評価した。

サンプルタイプ	範囲（%）	平均回収率（%）
血清(n=5)	89-105	96
EDTA血漿(n=5)	87-98	93
細胞培養基(n=5)	90-101	95

直線性:

アッセイの直線性を評価するため、各種マトリックス中で高濃度に含まれる、または高濃度でス

パイクした 豚 Pro-MMP-13 試料を、Reference Standard & Sample Diluentで希釈し、測定可能濃度域内となるようにして測定した。

		血清(n=5)	EDTA血漿(n=5)	細胞培養基(n=5)
1:2	範囲 (%)	91-104	93-109	93-111
	平均 (%)	98	101	101
1:4	範囲 (%)	90-104	90-103	95-113
	平均 (%)	98	101	103
1:8	範囲 (%)	92-106	95-110	92-108
	平均 (%)	100	101	103
1:16	範囲 (%)	87-103	95-112	95-109
	平均 (%)	94	103	102

ⓘトラブルシューティング

結果が十分でない場合は、写真を撮り、実験データを速やかに保存してください。使用済みプレートと残りの試薬も保管してください。そのうえで、当社の技術サポートに連絡して問題を解決してください。併せて、以下の資料もご参照ください:

問題	**原因**	**対策**
標準曲線が不十分	不正確なピペッティング	ピペットをチェックする
	不適切な標準希釈	標準液のバイアルを軽く回転させて、穏やかに混ぜて粉末を完全に溶解することを確認する。
	ウェルが完全に吸引されていない	ステップ間でウェルを完全に吸引する
信号が低い	不十分な潜伏時間	十分な培養時間を確保する
	アッセイ温度が正しくありません	推奨される培養温度を使用する
	試薬量が不十分	ピペットをチェックし、正しい準備を確実にする
	不適切な希釈	希釈手順を確認する
	HRPコンジュゲート不活性またはTMB失敗	HRPコンジュゲートとTMBを混合し、迅速に着色

低い価値	プレートリーダーの設定が最適ではありません	マイクロプレートリーダー（450nm）の波長とフィルター設定を確認します。
		マイクロプレートリーダーを事前に開いて少なくとも15分間予熱する
大型CV	不正確なピペッティング	ピペットを確認してください。
高い背景	標的タンパク質の濃度が高すぎる	推奨希釈率を使用する
	プレートの洗浄が不十分	適切な洗浄方法については、マニュアルをご確認ください。プレートウォッシャーを使用する場合は、すべてのポートが塞がれていないことを確認してください。 ELISAキットに付属の洗
	汚染された洗浄バッファー	新鮮な洗浄バッファーを準備する
低感度	ELISA キットの不適切な保管	すべての試薬は指示に従って保管してください
	停止液は添加されない	測定前に各ウェルに停止溶液を添加する必要があります。

ⓘ記載事項：

1.品質及び技術リスクについて

現状の条件・科学技術の制限により、当社はご提供いただいたすべての原材料を包括的に同定・解析することができません。そのため、本キットをご使用いただく際には、定性的および技術的なリスクが生じる可能性があります。

2.実験結果に影響する要因

試薬の有効性、実施者の技量、実験環境など、多くの要因が結果に影響を及ぼします。結果の正確性を確保するため、予備検体を十分にご用意ください。

3.試薬使用に関するご案内

最良の結果を得るため、本キットに付属する試薬のみを使用し、同封の説明書に従って厳密に操作してください。他社製品との混用はお避けください。

4.操作時の注意事項

試薬調製の誤りやマイクロプレートリーダーのパラメータ設定不備により、異常な結果が生じることがあります。実験前に説明書を必ずお読みになり、機器パラメータを正しく設定してください。

5.結果の再現性

同一実施者であっても、独立した2 回の実験で異なる結果が得られる場合があります。再現性を確保するため、各ステップを厳密に管理して操作を進めてください。

6.品質保証と差異に関する記載

各キットは厳格なQC 検査を通過しておりますが、輸送条件・使用機器の違いなどの要因により、お客様の結果と当社データが一致しない場合があります。ロット間でのintra-assay ばらつきも同様の理由で生じることがあります。

7.本キットは研究用です。臨床診断への使用はできません。

🅸 私たちは常に高品質な製品をご提供することを目指しており、ご理解とご支援いただき誠にありがとうございます。ご不明な点がございましたら、お気軽にテクニカルサポートまでご連絡ください。