

CODE No. 7620

MBL

Printed: February 10, 1999
Revised: July 19, 1999
Revised: May 1, 2001
Revised: April 2, 2004
Revised: March 20, 2006
Revised: August 01, 2011

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Quantitative test kit for Human IL-18

Human IL-18 ELISA Kit

CODE No. 7620 96 wells

MBL MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.
URL <https://ruo.mbl.co.jp>
e-mail support@mbi.co.jp, TEL 052-238-1904

CONTENTS

1. Intended Use -----	1
2. Summary and Explanation-----	1
3. Principle -----	2
4. Materials provided -----	2
5. Storage and Stability -----	2
6. Species and cross reactivity-----	3
7. Materials and equipment required -----	3
8. Precautions -----	3
9. Procedure -----	4
10. Performance Characteristics -----	8
11. Related products-----	10
12. References -----	11

CODE No. 7620

Before use, thoroughly read these Instructions.

Intended Use

The **Human IL-18 ELISA Kit** is based on sandwich ELISA and is capable of measuring human IL-18.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Summary and Explanation

Interleukin 18 (IL-18) is an 18 kDa cytokine which is identified as a costimulatory factor for production of interferon- γ (IFN- γ) in response to toxic shock. It shares functional similarities with IL-12. IL-18 is synthesized as a precursor 24 kDa molecule without a signal peptide and must be cleaved to produce an active molecule. IL-1 β converting enzyme (ICE, caspase-1) cleaves pro-IL-18 at aspartic acid in the P1 position, producing the mature, bioactive peptide that is readily released from the cells. It has been reported that IL-18 is produced from dendritic cells, activated macrophages, Kupffer cells, keratinocytes, intestinal epithelial cells, osteoblasts, adrenal cortex cells and murine diencephalons.

IFN- γ is produced by activated T and NK cells and plays critical roles in the defense against microbial pathogens. IFN- γ activates macrophages, enhances NK activity and B cell maturation, proliferation and Ig secretion, induces MHC class I and II antigens expression, and inhibits osteoclast activation.

IL-18 acts on T helper 1-type (Th1) cells, and in combination with IL-12 strongly induces production of IFN- γ by these cells. Pleiotropic effects of IL-18 have also been reported, including enhancement production of IFN- γ and GM-CSF in peripheral blood mononuclear cells, production of Th1 cytokines, IL-2, GM-CSF and IFN- γ in T cells, enhancement of Fas ligand expression by Th1 cells.

The "Human IL-18 ELISA Kit" is a useful reagent for specifically measuring human IL-18 with high sensitivity by ELISA.

This Kit does not detect 1 ng/mL of various cytokines, such as human IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF and murine IL-18. The results were all below the detection limit of 12.5 pg/mL.

Principle

The **Human IL-18 ELISA Kit** measures human IL-18 by sandwich ELISA. This assay uses two monoclonal antibodies against two different epitopes of human IL-18. Samples to be measured or standards are incubated in the microwells coated with anti-human IL-18 monoclonal antibody. After washing, the peroxidase conjugated anti-human IL-18 monoclonal antibody is added into the microwells and incubated. After another washing, the substrate reagent is mixed with the chromogen and allowed to incubate for an additional period of time. An acid solution is added to each microwell to terminate the enzyme reaction and to stabilize the color development. The optical density (O.D.) of each microwell is measured at 450 nm using a microplate reader.

The concentration of human IL-18 is calibrated from a dose response curve based on the reference standards.

Materials provided

Each kit contains:

Name	Materials	Quantity (for 1 kit)
Microwells	microwell strips coated with anti-human IL-18 antibody	8-well strip × 12 strips
Human IL-18 calibrator	human IL-18 (lyophilized powder)	2 vials
Conjugate reagent	Peroxidase conjugated anti-human IL-18 antibody (× 101)	0.2 mL × 1 vial
Conjugate diluent	Buffer for diluting Conjugate reagent (ready-for-use)	24 mL × 1 bottle
Assay diluent	Buffer for diluting samples* (ready-for-use)	30 mL × 1 bottle
Wash concentrate	Buffer for washing microwells (× 10)	100 mL × 1 bottle
Substrate reagent	TMB/H ₂ O ₂ solution (ready-for-use)	20 mL × 1 bottle
Stop solution	0.5 M H ₂ SO ₄ (ready-for-use)	20 mL × 1 bottle

* Use the **Assay diluent** as 0 pg/mL of IL-18 standard.

Storage and Stability

All kit components must be stored at 2-8°C. All reagents are stable for 12 months after manufacturing when stored at the indicated conditions.

Species cross reactivity

Species	Human	Mouse	Rat	Monkey
Samples	serum, plasma, cell culture supernatant, urine*	recombinant	Not Tested	Not Tested**
Reactivity	+	-		

* This kit was used in reference 5).

** This kit was used in reference 9).

Materials and equipment required

- Microplate reader (450 nm)
- Automatic plate washer or wash bottle
- Adjustable micropipette
- Multichannel micropipette
- 96-well polyvinyl plate
- Microplate holder
- Uncoated microwell strips (for using an automatic plate washer)
- Disposable reagent vessels
- Paper towels
- Distilled water

Precautions

1. Allow all the components to come to room temperature (20-25°C) before use.
2. **Microwells** that are not immediately required should be returned to the ziplock pouch, which must be carefully resealed to avoid moisture absorption.
3. Fresh samples should be used. Aliquot each sample and store below -20°C if necessary. Avoid repeated freezing and thawing. Never store the samples at 4°C, as samples might be affected by storage of this temperature.
4. When **Wash concentrate** is stored at 2-8°C, some precipitation or turbidity may appear. However it does not affect the reagent efficiency. Allow the **Wash concentrate** to come to room temperature and mix to re-dissolve the precipitate.
5. **Assay diluent** contains sodium azide (0.09%) as preservative. Azide may react with copper or lead in plumbing system to form explosive metal azide. Therefore, always flush with plenty of water into a drain when disposing materials containing azide.
6. **Stop Solution** is 0.5 M sulfuric acid. As it is a corrosive material, protect eyes and skin and handle with care.
7. This kit is intended for research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Procedure

◆ Preparation of Reagents

1. Wash solution

Prepare “**Wash solution**” by diluting **Wash concentrate, 1:10** with distilled water prior to use. (e.g., add 100 mL of Wash Concentrate to 900 mL of distilled water.) This “**Wash solution**” is stable for 2 weeks at 4°C.

2. Conjugate solution

Prepare “**Conjugate solution**” by diluting the **Conjugate reagent, 1:101** with the **Conjugate diluent** prior to use. (e.g., add 10 µL of Conjugate reagent to 1,000 µL of Conjugate diluent.)

* Prepare only a sufficient amount of the “**Conjugate solution**” for the assay because the diluted Conjugate reagent is not stable.

* Use disposable new pipette and vessel to avoid contamination of microbe.

3. Standards

Reconstitute “**Standards**” by dissolving lyophilized **Human IL-18 calibrator** with the **Assay diluent**. The volume of **Assay diluent**, and precise procedures are indicated in the attached lot specific document “*Preparation of Standards*”.

* If storage is needed after reconstitution, prepare appropriate aliquots and freeze them below -20°C. Avoid repeated freezing and thawing.

4. Other reagents are ready for use.

◆ Preparation of samples

1. Sampling

Each laboratory is recommended to establish its own sampling procedure. The following sampling procedures have been reported.

1) Serum

Blood for measurement of IL-18 was collected in Venoject®-II Tube AUTOSEP tube (TERUMO, Japan; cat# VP-AS109K). The blood was allowed to clot at room temperature for exactly 60 ± 10 minutes. Thereafter, the serum was separated by centrifugation twice for 10 minutes at 3,000 rpm at 4°C, and then transferred to a new plastic test tube.

CODE No. 7620

2) EDTA Plasma

Blood for measurement of IL-18 was collected in Venoject[®]-II Tube (TERUMO, Japan; cat# VP-DK050K). Within 30 minutes of blood collection, the plasma was separated by centrifugation twice for 10 minutes at 3,000 rpm at 4°C, and then transferred to a new plastic test tube.

2. Dilution

1) Dilute samples

Dilute each sample **1:5** with **Assay diluent**.

Example: human serum or EDTA plasma

Adding 50 µL of sample to 200 µL of **Assay diluent**.

2) Add 150 µL of prepared samples and **Standards** to 96-well polyvinyl plate as the same order of assay run.

3. Storage

Fresh samples should be used. Aliquot each sample into new plastic tube, and store below -20°C if necessary. Avoid repeated freezing and thawing.

◆ Assay procedure

Duplicate assay is recommended. A standard curve must be run with each assay.

STEP 1. (Sample incubation)

1) Add 150 µL of prepared samples and **Standard** to a transient 96-well polyvinyl plate as the same order of actual assay run. Then, transfer 100 µL of each sample to **Microwells** simultaneously using multichannel pipette.

Because the reaction starts on the transfer to the well, this transfer should be completed as quickly as possible.

2) Cover the plate and incubate for 60 minutes at room temperature (20-25°C).

STEP 2. (Washing)

Manual wash: Aspirate or discard the well contents, then fill each well with **Wash solution** using wash bottle. Aspirate or discard the **Wash solution** in the wells. Repeat this step another 3 times. Tap the plate on a paper towel to remove any remaining **Wash solution**.

Autowasher: Wash 4 times with **Wash solution**. Tap the plate on a paper towel to remove any remaining **Wash solution**.

* Each laboratory is recommended to confirm its own appropriate washing condition.

* **Wash solution** should be used at room temperature.

STEP 3. (Conjugate incubation)

- 1) Pour **Conjugate solution** into the vessel. After removing wash solution completely, pipette 100 μL of **Conjugate solution** to each well with a multichannel pipette.
- 2) Cover the plate and incubate for 60 minutes at room temperature.

STEP 4. (Washing)

Wash the wells again following the **STEP 2.** procedure.

STEP 5. (Substrate incubation)

- 1) After the washing, pour **Substrate reagent** (ready-for-use) into vessel. Add 100 μL of **Substrate reagent** to each well.

Because the enzyme reaction starts on the transfer to the well, this transfer should be completed as quickly as possible. For testing many samples, prepare the **Substrate** in a reagent vessel, then pour it into each well using multichannel pipette. This vessel should be different from the one that was used for pouring **Conjugate**.

* **Substrate reagent** should be used at room temperature.

* Use disposable new pipette and vessel, as **Substrate reagent** is easily oxidized by metal ions and can be contaminated by microbes.

* Once **Substrate reagent** is poured into the vessel, do not return to the bottle.

- 2) Cover the plate and incubate for 30 minutes at room temperature.

STEP 6. (Stopping reaction)

Pour **Stop solution** (ready-for-use) into the vessel. Add 100 μL of **Stop solution** to each well with a multichannel pipette.

◆ **Reading**

Read the absorbance of each well at 450 nm using a plate reader. If a dual wavelength plate reader is available, set the test wavelength at 450 nm and the reference at 620 nm.

* Reading should be done within 30 minutes after stopping the reaction.

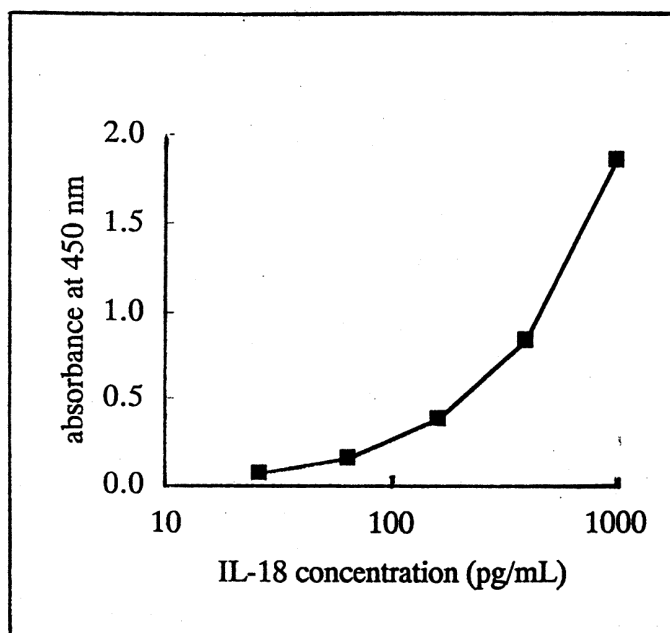
* Ensure that the back of the plate is clean and dry, and that no air bubbles are present on the surface of the liquid in the wells before reading.

◆ **Calculation of results**

- 1) Calculate the mean absorbance value of each **IL-18 standard**.
- 2) Plot on the semi-log graph paper and construct a calibration curve.
[Absorbance on the vertical axis, concentration (pg/mL) on the horizontal axis]
- 3) Read the pg/mL corresponding to the absorbance of sample from the standard curve.
Report the IL-18 concentration of samples by multiplying dilution factor. (e.g. human serum: ×5)

* If absorbance of sample exceeds the one of the 1,000 pg/mL standard, dilute the sample and measure again.

◆ **Example of standard curve**



◆ **Concentration of Human IL-18 in normal human sample**

Serum samples from 46 healthy donors were measured with the Human IL-18 ELISA Kit. The results were as follows. (Calculated as described in “◆ Calculation of results”.)

Maximum	=	257.8 pg/mL
Minimum	=	36.1 pg/mL
Mean	=	126.0 pg/mL
SD	=	44.5 pg/mL
Mean + 3 SD	=	259.4 pg/mL

Performance Characteristics

◆ Sensitivity

The sensitivity of the assay is 12.5 pg/mL.

The minimum detection limit estimated by serial dilution was 12.5 pg/mL since the mean + 2SD of the 6.25 pg/mL was lower than the mean - 2SD of the 12.5 pg/mL.

◆ Reproducibility

1. Intra-assay

Intra-assay reproducibility was determined by assaying the sera 8 times.

IL-18 concentrations of the serum samples were calculated as described in

“**◆ Calculation of results**”.

Sample	serum 1	serum 2	serum 3	serum 4	serum 5
Number of determinations	8	8	8	8	8
Mean (pg/mL)	2765.5	600.7	345.5	136.1	69.7
C.V. (%)	5.03	4.93	10.80	5.61	9.92

2. Inter-assay

Inter-assay reproducibility was determined by 5 independent assays.

IL-18 concentrations of the serum samples were calculated as described in

“**◆ Calculation of results**”.

Sample	serum 1	serum 2	serum 3	serum 4	serum 5
Number of determinations	5	5	5	5	5
Mean (pg/mL)	2621.1	773.2	615.1	236.4	160.1
C.V. (%)	10.07	8.54	5.21	7.60	6.25

* From six replicates of each serum sample in five separate assays.

◆ **Recovery test**

Recombinant human IL-18 was added to samples at different concentrations.

IL-18 concentrations of the serum samples were calculated as described in

“◆ **Calculation of results**”.

serum 1

(A) additional rhIL-18 (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	940.8	-	-
684.9	1583.0	642.2	94
1346.9	2179.0	1238.2	92
2354.1	3528.7	2587.9	110

serum 2

(A) additional rhIL-18 (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	868.9	-	-
684.9	1418.6	549.8	80
1346.9	2035.9	1167.0	87
2354.1	3431.3	2564.2	109

serum 3

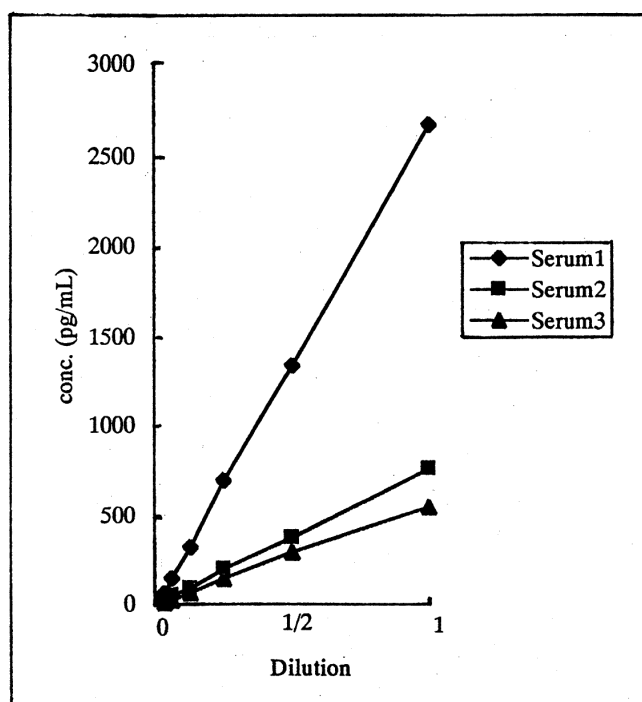
(A) additional rhIL-18 (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	629.3	-	-
684.9	1334.7	705.4	103
1346.9	1913.4	1284.1	95
2354.1	3282.3	2653.1	113

* rhIL-18 is abbreviation of recombinant human IL-18.

◆ Dilution test

Serum samples were diluted with **Assay diluent**.

Each serum was serially diluted from 1/1 to 1/32 with **Assay diluent**, then IL-18 concentrations of the serum samples were calculated as described in “◆ Calculation of results”.



Related products

- 7625 Mouse IL-18 ELISA Kit
- D043-3 anti-Human IL-18 (25-2G)
- D044-3 anti-Human IL-18 (125-2H)
- D045-3 anti-Human IL-18 (159-12B)
- D045-6 Biotin labeled anti-Human IL-18 (159-12B)
- PM014 anti-Human IL-18 (poly)
- D046-3 anti-Mouse IL-18 (39-3F)
- D047-3 anti-Mouse IL-18 (74)
- D048-3 anti-Mouse IL-18 (93-10C)
- D048-6 Biotin labeled anti-Mouse IL-18 (93-10C)
- M156-3 anti-Human pro-IL-18 (43A11)
- M157-3 anti-Rat IL-18 (21A12)

CODE No. 7620

- M158-3 anti-Rat IL-18 (91D8)
- M159-3 anti-Human IL-18 Receptor 1 (44G6)
- M163-3 anti-Mouse IL-18 Receptor 1 (33A11)
- M166-3 anti-Mouse IL-18 Receptor 1 (64G4)
- B001-5 Recombinant Human IL-18
- B003-5 Recombinant Human IL-18 (without BSA)
- B002-5 Recombinant Mouse IL-18
- B004-5 Recombinant Mouse IL-18 (without BSA)

References

- 1) Alsaleh, G., *et al.*, *J. Immunol.* **182**, 5088-5097 (2009)
- 2) Thompson, S. R., *et al.*, *Clin. Chemist.* **53**, 2078-2085 (2007)
- 3) Omoto, Y., *et al.*, *J. Immunol.* **177**, 8315-8319 (2006)
- 4) Vujisic, S., *et al.*, *Hum. Reprod.* **21**, 2650-2655 (2006)
- 5) Parikh, C. R., *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 3046-3052 (2005)
- 6) Tada, H., *et al.*, *Infect. Immunol.* **73**, 7967-7976 (2005)
- 7) Baratin, M. L., *et al.*, *PNAS.* **102**, 14747-14752 (2005)
- 8) Oku, H., *et al.*, *Hum. Reprod.* **19**, 709-714 (2004)
- 9) Kaizu, M., *et al.*, *Virology* **313**, 8-12 (2003)
- 10) Ahmad, R., *et al.*, *J. Virol.* **76**, 12448-12456 (2002)
- 11) Rouabhia, M., *et al.*, *Infect. Immunol.* **75**, 3739-3746 (2002)
- 12) Shida, K., *et al.*, *J. Immunol.* **166**, 6671-6679 (2001)
- 13) Narita, M., *et al.*, *Clin. Diagn. Lab.* **7**, 909-914 (2000)
- 14) Tao, D., *et al.*, *Cell Immunol.* **173**, 230-235 (1998)
- 15) Taniguchi, M., *et al.*, *J. Immunol. Methods* **206**, 107-113 (1997)
- 16) Micalef, M., *et al.*, *Eur. J. Immunol.* **26**, 1647-1651 (1996)
- 17) Ushio, S., *et al.*, *J. Immunol.* **156**, 4274-4279 (1996)
- 18) Okamura, H., *et al.*, *Nature* **378**, 88-91 (1995)

Manufacturer

MBL MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

URL <https://ruo.mbl.co.jp>

e-mail support@mbi.co.jp, TEL 052-238-1904

はじめに

インターロイキン 18 (IL-18) は、エンドトキシンショックにおいてインターフェロン- γ (IFN- γ) 産生を刺激する因子として発見された、分子量 18 kDa のタンパク質であり、IL-12 と機能的な共通性を持っています。IL-18 はシグナルペプチドを持たない 24 kDa の前駆体として合成され、活性化型になるには切断される必要があります。IL-1 β 変換酵素 (ICE; IL-1 β converting enzyme、caspase-1) が P1 ポジションのアスパラギン酸で pro-IL-18 を切断して活性のある成熟型 IL-18 を作り、それが細胞から放出されます。IL-18 を産生する細胞として、樹状細胞、活性化マクロファージ、クッパー細胞、ケラチノサイト、血管内皮細胞、骨芽細胞、副腎皮質細胞、そしてマウス間脳が報告されています。IFN- γ は活性化 T 細胞、活性化 NK 細胞によって産生され、微生物が原因で引き起こされる疾患の防御に重大な役割を果たします。IFN- γ はマクロファージを活性化し、NK 活性や B 細胞の成熟と増殖および Ig 分泌を促進し、クラス I およびクラス II MHC 抗原を誘導し、破骨細胞の分化を抑制します。

IL-18 は IL-12 と相乗的に 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) にはたらき、IFN- γ 産生を誘導します。IL-18 には多面的な報告がされています。たとえば、抹消血単核球に対する IFN- γ および GM-CSF 産生増強効果、T 細胞に対する IL-2、GM-CSF、IFN- γ といった Th1 サイトカイン産生誘導作用、Th1 細胞に対する Fas リガンドの発現誘導作用などです。

Human IL-18 ELISA Kit は異なるエピトープを認識する 2 種のモノクローナル抗体を用いてヒト IL-18 を測定する試薬です。また、本試薬では、1 ng/mL の濃度の他のサイトカイン (ヒト IFN- α 、IFN- γ 、IFN- β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、GM-CSF およびマウス IL-18) は、検出されません。

測定原理

Human IL-18 ELISA Kit は、異なるエピトープを認識する 2 種のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法によって、ヒト IL-18 を測定するキットです。本キットの検出感度は 12.5 pg/mL です。

抗 ヒト IL-18 モノクローナル抗体を感作したマイクロカップに、サンプルを添加し、抗原-抗体反応をさせます。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IL-18 モノクローナル抗体を添加して反応させ、抗体-抗原-標識抗体の複合物を形成させます。洗浄後、テトラメチルベンチジンと過酸化水素の溶解液を基質溶液として添加し、酵素 (ペルオキシダーゼ) により発色させ、反応停止後、吸光度 (A450) を測定して ヒト IL-18 を検出します。

キット構成

Name	Materials	Quantity (for 1 kit)
Microwells	microwell strips coated with anti-human IL-18 antibody	8-well strip × 12 strips
Human IL-18 calibrator	human IL-18 (lyophilized powder)	2 vials
Conjugate reagent	Peroxidase conjugated anti-human IL-18 antibody (× 101)	0.2 mL × 1 vial
Conjugate diluent	Buffer for diluting Conjugate reagent (ready-for-use)	24 mL × 1 bottle
Assay diluent	Buffer for diluting samples* (ready-for-use)	30 mL × 1 bottle
Wash concentrate	Buffer for washing microwells (× 10)	100 mL × 1 bottle
Substrate reagent	TMB/H ₂ O ₂ solution (ready-for-use)	20 mL × 1 bottle
Stop solution	0.5 M H ₂ SO ₄ (ready-for-use)	20 mL × 1 bottle

* Assay diluent を 0 pg/mL の IL-18 standard としてお使いください。

保存と有効

2-8°C にて保存してください。有効期間は製造後 12 ヶ月です。

準備するもの

- ・ マイクロプレートリーダー
- ・ プレートウォッシャーまたは洗浄ビン
- ・ マイクロピペット
- ・ マルチチャンネルマイクロピペット
- ・ 1 次反応準備用マイクロプレート (ポリビニル製 96 ウェルプレートなど)
- ・ マイクロカップ専用ホルダー
- ・ ダミーのマイクロカップ (自動洗浄機使用時)
- ・ リザーバー
- ・ ペーパータオル
- ・ 精製水

交差性

種	ヒト	マウス	ラット	サル
検体	血清, 血漿, 培養上清, 尿*	リコンビナント	未検討	未検討**
交差性	+	-		

* 参考文献 5) で本キットが使用されています。

** 参考文献 9) で本キットが使用されています。

操作上の留意点

1. キットの構成品は、室温 (20-25°C) に戻してから使用して下さい。
2. 抗体感作マイクロカップは湿気をさらいますので、十分室温に戻してから開封して下さい。また、開封後はアルミ袋のチャックを確実に締めて保存して下さい。
3. 検体は新鮮なものを用いて下さい。検体を保存する場合は、小分けして-20°C 以下で凍結保存して下さい。また、凍結融解の繰り返しは避けて下さい。
4. **Wash concentrate** は、2-8°C に保存したとき、白濁が認められる場合がありますが、試薬性能に影響はありません。**Wash concentrate** 調製時、十分に溶解、懸濁してから使用して下さい。
5. 本試薬の構成品のうち、**Assay diluent** には 0.09%アジ化ナトリウム (NaN₃)を添加してあります。濃度は 0.09%ですので毒物には該当しませんが、誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば、医師の手当てを受けて下さい。また、アジ化ナトリウムは、配管中で爆発性のアジ化銅やアジ化鉛を形成することが報告されています。これらの物質の形成を防ぐため、アジ化ナトリウムを含んだ廃液は十分量の水で洗い流して下さい。
6. 本試薬の構成品のうち、**Stop solution** には、0.5 M 硫酸 (H₂SO₄) を用いています。使用の際には十分注意して取り扱って下さい。
7. 本試薬は研究用試薬です。ヒトの体内に用いたり、診断の目的に使用しないで下さい。

操作法

◆ 試薬の調製

1. Wash solution [洗浄液]

Wash Concentrate 100 mL に精製水 900 mL を加えて希釈し、“Wash solution” とします。
“Wash solution”は 4°C で保存すると、およそ 2 週間安定です。

2. Conjugate solution [標識抗体溶液]

Conjugate diluent 1,000 µL に Conjugate reagent 10 µL を加えて希釈し、“Conjugate solution” とします。

“Conjugate solution”は不安定ですので、必要量のみ要事調製するようにして下さい。

* 微生物のコンタミネーションを防ぐため、“Conjugate solution”の調整にはディスポーザブルの新しい器具を使用して下さい。

3. Standards (調整指示書参照)

Human IL-18 calibrator を Assay diluent で溶解して“Standards”を作製します。
“Standards”の調整方法はキット添付の文書「Standards の調製方法」に従ってください。

* 正確な測定を実施するため、“Standards”は操作直前に溶解して使用して下さい。溶解後の Human IL-18 calibrator を保存する際は、小分けして -20 °C 以下で凍結保存して下さい。また、凍結融解の繰り返しは避けてください。

4. その他試薬

その他の試薬は全てそのままご使用ください。

◆ 検体の準備

1. 検体の種類

施設ごとにサンプリングの方法を確立されることをお勧めします。参考として、これまでに報告されているサンプリングの方法を以下に紹介します。

1) 血清

テルモ社の Venoject®-II Tube AUTOSEP (TERUMO, Japan; cat# VP-AS109K) 採血管を用いて静脈血を採取します。血液を室温で 60 分 ± 10 分間静置し、凝固させます。凝固時間は厳守して下さい。その後 4°C、3,000 rpm で 10 分間の遠心を 2 回おこない血清を分離します。血清は新しいプラスチック容器に移して保存して下さい。

2) EDTA 血漿

テルモ社の Venoject®-II Tube (TERUMO, Japan; cat# VP-DK050K) 採血管を用いて静脈血を採取します。採血後、30 分以内に 4°C、3,000 rpm で 10 分間の遠心を 2 回おこない血漿を分離します。血漿は新しいプラスチック容器に移して保存して下さい。

2. サンプルの希釈

1) 検体の希釈

サンプルは、**Assay Diluent** を用いて希釈して下さい。

例: ヒト血清/血漿

200 μL の **Assay diluent** に 50 μL の検体を加え、5 倍希釈します。

2) 希釈調製した **Standards** と検体を 150 μL ずつ、1 次反応準備用マイクロプレートに実際のアッセイと同じ配列で添加します。

3. 検体の保存

検体は新鮮なものを用いて下さい。検体を保存する場合は、小分けして -20°C 以下で凍結保存して下さい。また、凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

◆ 測定の手順

Duplicate での測定 (2 重測定) を推奨します。検量線は測定のたびにおいでください。

STEP 1. (1 次反応)

- 1 次反応準備用マイクロプレートに準備した **Standards** と希釈調製した検体を、マルチチャンネルピペットを用いて 100 μL ずつ **Microwells** に移します。
 - * マイクロカップに検体を添加した時点から反応が始まりますので、操作は短時間のうちに行ってください。
- プレートにカバーをかけ、室温 ($20-25^{\circ}\text{C}$) で 1 時間静置反応させます。

STEP 2. (洗浄)

手法: 反応液を捨てたのち、洗ビンを用いて、**Wash solution** を各ウェルに満たし、同じように捨てます。これを 4 回行います。その後、プレートをペーパータオルなどにパンパンとたたきつけて完全に洗浄液を除去してください。

自動洗浄機 (マイクロプレート専用機): **Wash solution** で 4 回 洗浄下さい。その後、プレートをペーパータオルなどにパンパンとたたきつけて完全に洗浄液を除去してください。

* 自動洗浄機を用いた場合、使用する自動洗浄機によって最適洗浄回数が異なる場合があります。

あらかじめ各施設で用いる自動洗浄機の最適洗浄回数を確認することをお勧めします。

* **Wash Solution** は必ず室温に戻して使用して下さい。

STEP 3. (2次反応)

- 1) マイクロカップに残った **Wash solution** を完全に除去した後、リザーバーに移した **Conjugate solution** をマルチチャンネルピペットで 100 μ L ずつ各ウェルに添加します。
- 2) プレートにカバーをかけ、室温で 1 時間静置反応させます。

STEP 4. (洗浄)

STEP 2.と同様にマイクロカップを洗浄します。

STEP 5. (酵素反応)

- 1) マイクロカップに残った **Wash solution** を完全に除去した後、**Substrate reagent** をリザーバーに移し、マルチチャンネルピペットで 100 μ L ずつ各ウェルに添加します。
- 2) プレートにカバーをかけ、室温で 30 分間静置反応させます。
 - * **Substrate reagent** は必ず室温に戻した後、使用して下さい。
 - * **Conjugate** を入れたリザーバーと **Substrate reagent** を入れるリザーバーは、必ず別のものを使用して下さい。
 - * **Substrate reagent** は金属イオンにより酸化されやすいので取り扱いにはディスポーザブルの新しい器具を使用して下さい。
 - * 金属イオンや微生物などによるコンタミネーションを防ぐため、試薬ボトルからリザーバーへ **Substrate reagent** を移す際にもディスポーザブルのピペットを使用して下さい。また、一度リザーバーに移した **Substrate reagent** は試薬ボトルへ戻さないで下さい。

STEP 6. (反応停止)

リザーバーに移した **Stop solution** をマルチチャンネルピペットで 100 μ L ずつ各ウェルに添加し、反応を停止します。

◆ 吸光度の測定

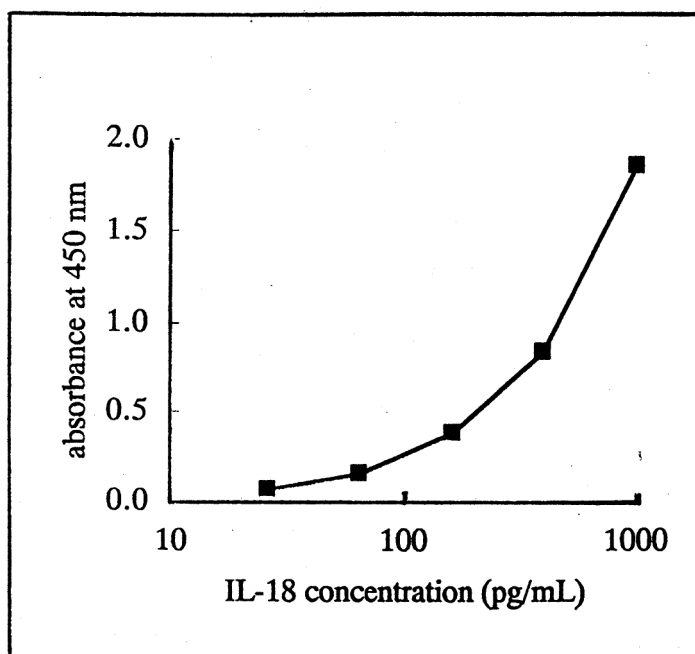
自動分光光度計 (マイクロプレート専用機: 垂直透過型) にマイクロカップをセットして、波長 450 nm の吸光度 (副波長 620 nm) を測定します。

- * 吸光度の測定は反応停止後 30 分以内に行ってください。
- * プレートの裏側は汚れのない乾いた状態を保つようにしてください。また、吸光度を測定する前にウェル内に気泡がないことを確認してください。

◆ 濃度算出

- 1) **Standards** を多重測定している場合にはそれぞれ吸光度の平均値を算出します。
- 2) 片対数のグラフ用紙に標準曲線を作成します。
[横軸に IL-18 タンパク質の濃度 (pg/mL)、縦軸に吸光度をとります。]
- 3) この標準曲線を用いて、検体の吸光度の平均値から濃度を読み取り、検体の希釈倍率を乗じた値 (血清の場合 5 倍) を測定結果とします。
* 検体の吸光度が、最高濃度の 1,000 pg/mL Standard の吸光度を超えた場合、あるいは、分光光度計の信頼範囲を超えた場合には、検体をさらに希釈して再測定してください。

◆ 標準曲線の例



◆ 正常人血清の濃度

正常人の血清 46 例を測定した場合、下記の結果になりました。(濃度の算出法に関しては、

◆ 濃度算出の項を参照してください。)

Maximum	=	257.8 pg/mL
Minimum	=	36.1 pg/mL
Mean	=	126.0 pg/mL
SD	=	44.5 pg/mL
Mean + 3 SD	=	259.4 pg/mL

性能**◆ 感度**

最小検出濃度は、12.5 pg/mL です。

リコンビナント human IL-18 を希釈して測定したとき、6.25 pg/mL 測定値の平均 + 2SDが、12.5 pg/mL 測定値の平均 - 2SDより小さくなりました。

◆ 再現性**1. 同時再現性試験**

血清 5 例を用いて、同時に 8 回測定したところ、下表の結果が得られました。(濃度の算出法に関しては、◆ **濃度算出**の項を参照してください。)

Sample	serum 1	serum 2	serum 3	serum 4	serum 5
Number of determinations	8	8	8	8	8
Mean (pg/mL)	2765.5	600.7	345.5	136.1	69.7
C.V. (%)	5.03	4.93	10.80	5.61	9.92

2. 日差再現性試験

血清 5 例を 6 重測定した平均値を求め、これを測定日を変えて 5 回測定したところ、下表の結果が得られました。(濃度の算出法に関しては、◆ **濃度算出**の項を参照してください。)

Sample	serum 1	serum 2	serum 3	serum 4	serum 5
Number of determinations	5	5	5	5	5
Mean (pg/mL)	2621.1	773.2	615.1	236.4	160.1
C.V. (%)	10.07	8.54	5.21	7.60	6.25

* 各血清サンプルは 6 重測定しました。

◆ 添加回収試験

血清3例を用いて、添加回収試験を行ったところ、下表の結果が得られました。(濃度の算出法に関しては、◆ **濃度算出**の項を参照してください。)

serum 1

(A) additional rhIL-18 (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	940.8	-	-
684.9	1583.0	642.2	94
1346.9	2179.0	1238.2	92
2354.1	3528.7	2587.9	110

serum 2

(A) additional rhIL-18 (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	868.9	-	-
684.9	1418.6	549.8	80
1346.9	2035.9	1167.0	87
2354.1	3431.3	2564.2	109

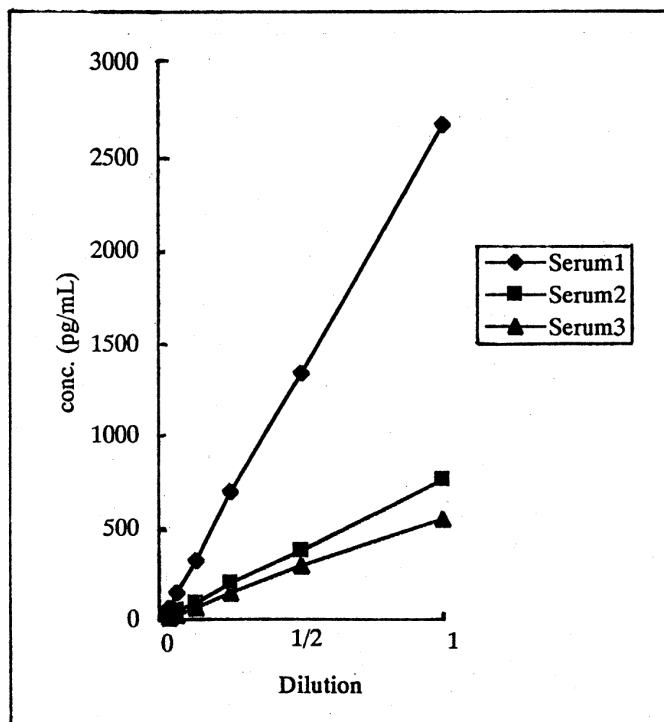
serum 3

(A) additional rhIL-18 (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	629.3	-	-
684.9	1334.7	705.4	103
1346.9	1913.4	1284.1	95
2354.1	3282.3	2653.1	113

* rhIL-18とは、recombinant human IL-18の略記です。

◆ 希釈試験

血清を Assay diluent で 1/1～1/32 に希釈し測定したところ、下表の結果が得られました。
 (測定結果は、検体希釈倍数を乗じた後の値です。)



関連製品

- 7625 Mouse IL-18 ELISA Kit
- D043-3 anti-Human IL-18 (25-2G)
- D044-3 anti-Human IL-18 (125-2H)
- D045-3 anti-Human IL-18 (159-12B)
- D045-6 Biotin labeled anti-Human IL-18 (159-12B)
- PM014 anti-Human IL-18 (poly)
- D046-3 anti-Mouse IL-18 (39-3F)
- D047-3 anti-Mouse IL-18 (74)
- D048-3 anti-Mouse IL-18 (93-10C)
- D048-6 Biotin labeled anti-Mouse IL-18 (93-10C)
- M156-3 anti-Human pro-IL-18 (43A11)
- M157-3 anti-Rat IL-18 (21A12)
- M158-3 anti-Rat IL-18 (91D8)
- M159-3 anti-Human IL-18 Receptor 1 (44G6)

CODE No. 7620

- M163-3 anti-Mouse IL-18 Receptor 1 (33A11)
- M166-3 anti-Mouse IL-18 Receptor 1 (64G4)
- B001-5 Recombinant Human IL-18
- B003-5 Recombinant Human IL-18 (without BSA)
- B002-5 Recombinant Mouse IL-18
- B004-5 Recombinant Mouse IL-18 (without BSA)

参考文献

- 1) Alsaleh, G., *et al.*, *J. Immunol.* **182**, 5088-5097 (2009)
- 2) Thompson, S. R., *et al.*, *Clin. Chemist.* **53**, 2078-2085 (2007)
- 3) Omoto, Y., *et al.*, *J. Immunol.* **177**, 8315-8319 (2006)
- 4) Vujisic, S., *et al.*, *Hum. Reprod.* **21**, 2650-2655 (2006)
- 5) Parikh, C. R., *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 3046-3052 (2005)
- 6) Tada, H., *et al.*, *Infect. Immunol.* **73**, 7967-7976 (2005)
- 7) Baratin, M. L., *et al.*, *PNAS.* **102**, 14747-14752 (2005)
- 8) Oku, H., *et al.*, *Hum. Reprod.* **19**, 709-714 (2004)
- 9) Kaizu, M., *et al.*, *Virology* **313**, 8-12 (2003)
- 10) Ahmad, R., *et al.*, *J. Virol.* **76**, 12448-12456 (2002)
- 11) Rouabhia, M., *et al.*, *Infect. Immunol.* **75**, 3739-3746 (2002)
- 12) Shida, K., *et al.*, *J. Immunol.* **166**, 6671-6679 (2001)
- 13) Narita, M., *et al.*, *Clin. Diagn. Lab.* **7**, 909-914 (2000)
- 14) Tao, D., *et al.*, *Cell Immunol.* **173**, 230-235 (1998)
- 15) Taniguchi, M., *et al.*, *J. Immunol. Methods* **206**, 107-113 (1997)
- 16) Micallef, M., *et al.*, *Eur. J. Immunol.* **26**, 1647-1651 (1996)
- 17) Ushio, S., *et al.*, *J. Immunol.* **156**, 4274-4279 (1996)
- 18) Okamura, H., *et al.*, *Nature* **378**, 88-91 (1995)

製造元

MBL 株式会社 医学生物学研究所

URL <https://ruo.mbl.co.jp>

e-mail support@mbi.co.jp, TEL 052-238-1904