

Human Apoptosis Inhibitor of Macrophage (hAIM) ELISA kit

INTRODUCTION

AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage), a protein produced by macrophage and present in the blood, interacts with both adipose cells and macrophages¹⁾. By inducing neutral fat breakdown in adipose cells and inhibiting cellular death of macrophage, AIM shows a strong association with various lifestyle-related diseases such as obesity, arteriosclerosis, and diabetes²⁻⁵⁾. In recent years, it is indicated that AIM plays a role in the pathogenesis of autoimmune disease associated with obesity⁶⁾. As seen above, amount of AIM in the blood is related to pathological condition of many diseases problematic in modern society, and the measurement of AIM is suggested to be effective for diagnostic and therapeutic research of the lifestyle-related diseases. Precise measurement may be difficult depending on the antibody character since AIM binds to IgM in the blood, however the antibody used in this kit is unaffected by IgM, which enables accurate measurement of AIM amount⁷⁾.

MEASUREMENT PRINCIPLE

This assay kit employs sandwich ELISA method utilizing mouse monoclonal antibody specific for human AIM (hAIM) protein. hAIM-specific antibody is pre-coated on the microplate.

hAIM in standard or specimen (biological sample such as cell culture supernatant and serum) binds specifically to antibody attached on each well of microplate. Then, biotinylated hAIM-specific antibody and HRP-labeled Avidin are added. Finally, colorimetric substrate (TMB) is added and reacted, which produces a color in proportion to the amount of hAIM in the sample. After stopping the enzyme reaction by adding sulfuric acid, the microwell absorbances are measured for the dominant wavelength at 450 nm (reference wavelength: around 630 nm) utilizing microplate reader. Plot the calibration curve using hAIM Standard, and hAIM concentration in the specimen is determined by finding the absorbance value on the calibration curve.

KIT COMPONENT

○ Antibody Coated Wells	--- 1 (6 strips)
○ Biotinylated Antibody (30×)	--- 1 (200 μL)
○ HRP-labeled Avidin (30×)	--- 1 (200 μL)
○ Enzyme Diluent	--- 1 (12 mL)
○ Standard/Sample Diluent	--- 1 (30 mL)
○ Wash Concentrate (20×)	--- 1 (30 mL)
○ TMB Substrate Reagent	--- 1 (12 mL)
○ Stop Solution (sulfuric acid)	--- 1 (12 mL)
○ hAIM Standard (freeze dried)	--- 1 (add 250 μL distilled water just before use)

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader capable of measurement at 450 nm [reference wavelength at around 630 nm]
- Precision pipettes or multichannel pipettes to deliver 10 μ L -1000 μ L volumes, and disposable tips
- Tubes with low-protein adsorbent to prepare standard dilutions
- Measuring cylinder or beaker (500 mL) to prepare wash solution
- Distilled water

OPERATING PRECAUTIONS

- Do not mix reagents from different kit lots.
- Diluted reagents should not be stored for more than 24 hours.
- Do not discontinue the operation during the experimentation. Also, do not leave the microplate dehydrated during operation.
- Use microplate lid to prevent drying during operation if needed.
- All standards and samples are recommended to be run in duplicate.

SPECIMEN PREPARATION

Biological samples such as cell culture supernatant and serum should be diluted with Standard/Sample Diluent.

Recommended dilution ratio of serum is 1/500~1000.

REAGENT PREPARATION

- Biotinylated Antibody solution

Add 180 μ L of 30 $\times$ Biotinylated Antibody to 5220 μ L Standard/Sample Diluent to prepare 5.4 mL solution.

- HRP-labeled Avidin solution

Add 180 μ L of 30 $\times$ HRP-labeled Avidin to 5220 μ L Standard/Sample Diluent to prepare 5.4 mL solution.

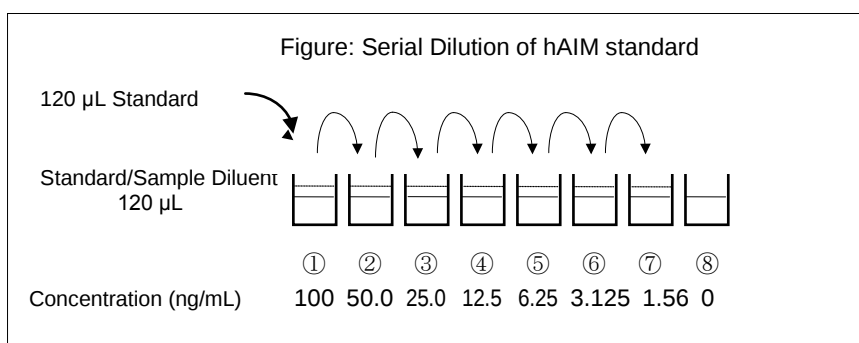
- Wash Buffer

Add 25 mL of Wash Concentrate to 475 mL of distilled water to prepare 500 mL solution.

- hAIM Standard

Reconstitute hAIM Standard with 250 μ L of distilled water to prepare a 200 ng/mL stock standard. Add 120 μ L Standard/Sample Diluent to 8 tubes, respectively. Perform serial doubling dilutions by adding 120 μ L of each standard to the next tube to create concentrations as described below.

#1; 100 ng/mL, #2; 50.0 ng/mL, #3; 25.0 ng/mL, #4; 12.5 ng/mL, #5; 6.25 ng/mL, #6; 3.125 ng/mL, #7; 1.5625 ng/mL, #8; 0 ng/mL



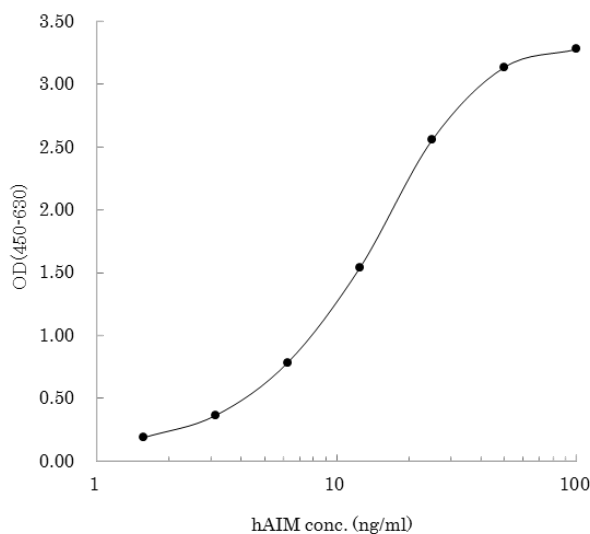
ASSAY PROCEDURE

1. Pipette 300 µL of Wash Buffer to each well, and soak at 25°C for 20 minutes. (See Flowchart indicated below)
2. Wash wells by filling with 300 µL/well Wash buffer, and tap the plate to remove any residual buffer. Repeat wash 3 times.
3. Pipette 50 µL of each standard or sample into antibody coated wells, and incubate for 1 hour at 37°C.
4. Wash wells as in Step 2.
5. Pipette 50 µL of Biotinylated Antibody solution into each well, and incubate for 1 hour at 37°C
6. Wash wells as in Step 2.
7. Add 50 µL of HRP-labeled Avidin solution into each well, and incubate for 1 hour at 37°C.
8. Wash wells as in Step 2.
9. Add 100 µL of TMB Substrate Reagent to each well. Incubate for 10 minutes at room temperature (25°C) in the dark.
10. Add 100 µL of Stop Solution to each well.
11. Read absorbance at 450 nm (reference wavelength at 630 nm) utilizing microplate reader.

Figure: Flowchart

	Test Sample	Standard	Test Sample Blank	Reagent Blank
Reagents	Test sample 50 μ L	Diluted Standard (Tube-1~-7) 50 μ L	Standard/Sample Diluent (Tube-8) 50 μ L	Standard/Sample Diluent 50 μ L
Incubation for 1 hour at 37°C with plate lid				
Washing 3 times				
Biotinylated Antibody	50 μ L	50 μ L	50 μ L	—
Incubation for 1 hour at 37°C with plate lid				
Washing 3 times				
HRP-labeled Avidin	50 μ L	50 μ L	50 μ L	—
Incubation for 1 hour at 37°C with plate lid				
Washing 3 times				
Chromogen	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubation for 10 minutes at room temperature (shielded)				
Stop solution	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Read the plate at $\angle 450$ nm -630 nm within 30 minutes after application of Stop solution				

STANDARD CURVE



REPRODUCIBILITY

Domain of standard curve: 1.56~100 ng/mL

Minimum measurement value for detection: 3.13 ng/mL

Minimum dilution rate of the serum sample: 500 fold

Within-run (n=10, 3 concentration) : CV(%) =12.4、3.19、3.94

Between-run (n=10, 3 concentration) : CV(%) =12.4、5.07、8.43

Recovery test : In the recovery study, recoveries within the range of 91.8-116.9% were obtained when hAIM in known concentration (30 ng/mL, 7 ng/mL) were added into 500 times dilutions of the sample serum.

STORAGE INFORMATION

Store kit at 2-8°C.

Expiration date is indicated on the outside of the package.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- Store kit at 2-8°C.
- This kit is intended for research use, not for clinical diagnostic use.
- Please handle the reagent with care. Especially, avoid contact of skin, clothing, eyes, or mouth with sulfuric acid or Substrate Reagents.
- Handle biological samples with extreme caution to prevent infection.
- Store kit in defined condition, and use before the expiration date.
- Comply with the local regulations for disposal of used plates, tubes, and waste solution.

REFERENCES

- 1) Miyazaki, T. *et al.* (1999) J. Exp. Med 189: 413-422.
- 2) Arai, S. *et al.* (2005) Cell Metab. 1: 201-213.
- 3) Kurokawa, J. *et al.* (2010) Cell Metab. 11: 479-492.



- 4) Kurokawa, J. *et al.* (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108: 12072-12077.
- 5) Miyazaki, T. *et al.* (2011) Cir. J. 75: 2522-2531.
- 6) Arai, S., *et al.* (2013) Cell Rep., 3: 1187-98.
- 7) Oba, M. *et al.* (2012) Seikagaku 84: 588-591.

Manufacturer



7-1-14 Minatojimaminami-machi, Chuo-ku, Kobe, Japan 650-0047

Telephone: +81-78-306-0295 FAX: +81-78-306-0296

URL: <http://www.transgenic.co.jp> techstaff@transgenic.co.jp

Human Apoptosis Inhibitor of Macrophage (hAIM) 測定用 ELISA キット

序論

AIM (apoptosis inhibitor of macrophage)は、マクロファージから産生され血中に存在するタンパク質で、脂肪細胞やマクロファージ自身などに作用します¹⁾。AIM は、脂肪細胞に蓄積した中性脂肪を分解、マクロファージの細胞死を抑制することが知られており、肥満、動脈硬化、糖尿病など様々な生活習慣病の病態に強い関連が認められます²⁻⁵⁾。近年では、肥満に伴う自己免疫疾患の発症機序にも AIM が関わっていることが明らかにされています⁶⁾。このように、血中 AIM 量は現代社会で問題となっている種々の疾患の病態と関連しており、その測定が生活習慣病の診断・治療法の研究に有用であることが示唆されています。AIM は血中で IgM と結合しているため、抗体によっては正確な AIM 量が測定できない場合がありますが、本キットで用いる抗体は、IgM の影響を受けることなく、正確な AIM 量を測定することが出来ます⁷⁾。

測定原理

本キットは、ヒト AIM(hAIM)タンパク質を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法による測定システムです。マイクロプレートには既に hAIM 特異抗体が固相化されています。

キャリブレーター及び、検体(細胞株の培養上清や血清などの生体試料)中の hAIM は、マイクロプレートの各ウェルに固相化された抗体と特異的に結合します。続いて、ビオチン標識された hAIM 特異抗体、さらに HRP 標識アビジンと反応させます。最後に、発色基質液(TMB)を添加し反応させることで、試料中の hAIM 量に応じた発色が得られます。硫酸で酵素反応を停止させたのち、一般的なプレートリーダーを用いて主波長 450 nm(副波長 630 nm 付近)で吸光度を測光します。キャリブレーターを用いて検量線を作成し、試料の測定吸光度を検量線に代入することによって、試料中の hAIM 濃度を求めることができます。

キットの構成

○ 抗体固相化プレート	--- 1 枚 (6 ストリップ)
○ ビオチン標識抗体 (30 倍)	--- 1 本 (200 μ L)
○ HRP 標識アビジン (30 倍)	--- 1 本 (200 μ L)
○ 抗体希釈液	--- 1 本 (12 mL)
○ サンプル希釈液	--- 1 本 (30 mL)
○ 濃縮洗浄液 (20 倍)	--- 1 本 (30 mL)
○ TMB 基質液	--- 1 本 (12 mL)
○ 反応停止液 (硫酸)	--- 1 本 (12 mL)
○ hAIM 標準品 (凍結乾燥品)	--- 1 本 (使用直前に精製水 250 μ L を添加)

測定に必要なもの

- マイクロプレートリーダー（測定波長：450 nm [副波長 630 nm 付近]）
- ピペットあるいは、マルチチャンネルピペットと使い捨てチップ（10–1000 μ L が測り取れるもの）
- 希釈操作の容器（タンパク低吸着性）
- 洗浄液調製用のメスシリンダーあるいは、ビーカー（500 mL 容量）
- 精製水

操作上の注意

- 他のロットの試薬を混合して使用しないで下さい。
- 希釈調製した試薬は、当日中にご使用ください
- 操作を途中で中断しないで下さい。また、操作中のウェルを乾燥させたまま放置しないでください。
- 場合により、反応中の乾燥を防ぐ目的でプレートカバーを御用意ください。
- 検体および標準品の測定は、二重測定を推奨します。

サンプルの準備

細胞株の培養上清や血清などの生体試料は、任意の倍率までサンプル希釈液で希釈します。
血清の希釈の目安は、500～1000 倍です。

試薬の準備

○ ビオチン標識抗体液

180 μ L のビオチン標識抗体を 5220 μ L の抗体希釈液で希釈し、5.4 mL 溶液とします

○ HRP 標識アビジン溶液

180 μ L の HRP 標識アビジンを 5220 μ L の抗体希釈液で希釈し、5.4 mL 溶液とします

○ 洗浄液

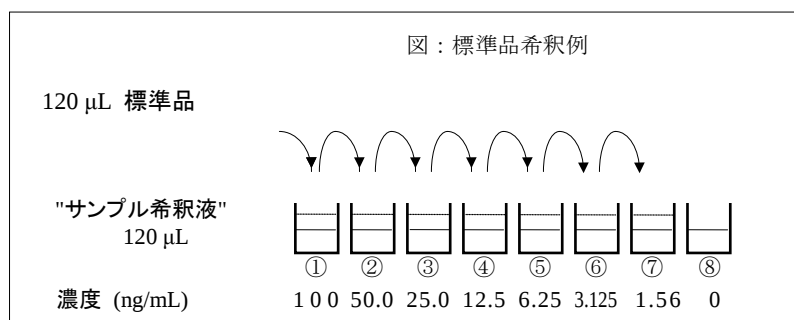
25 mL の濃縮洗浄液を脱イオン水で希釈し、500 mL とします。

○ hAIM キャリブレーター

hAIM 標準品を 250 μ L の精製水で完全に溶解します。この溶解液の hAIM 濃度は 200 ng/mL となります。

希釈用チューブを 8 本用意し、それぞれへサンプル希釈液を 120 μ L ずつ添加します。うち 7 本のチューブを用いて、hAIM 標準品の 2 倍段階希釈を行い、以下のキャリブレーターを作成します。

#1; 100 ng/mL, #2; 50.0 ng/mL, #3; 25.0 ng/mL, #4; 12.5 ng/mL, #5; 6.25 ng/mL, #6; 3.125 ng/mL,
#7; 1.5625 ng/mL, #8; 0 ng/mL



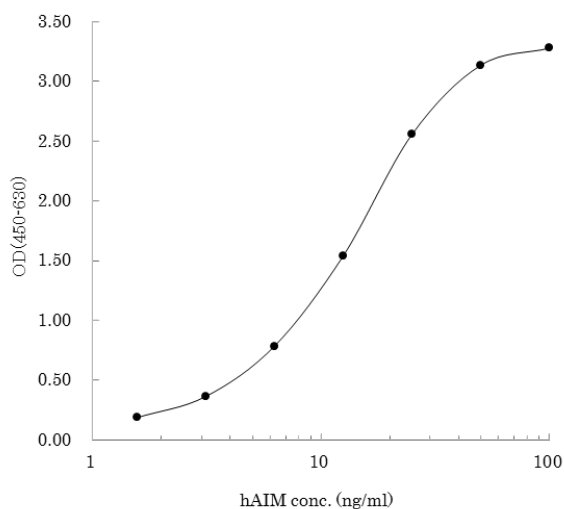
測定方法

1. 300 μ L の洗浄液をウェルに添加し、常温(25℃)で 20 分間 浸漬します。(以降、図 Flowchart 参照)
2. 300 μ L の洗浄液で 3 回、ウェルを洗浄し、液滴が残らないようにタッピングします。
3. 50 μ L ずつのキャリブレーター及び、検体を抗体固相化プレートのウェルに添加し、37℃で 1 時間インキュベートします。
4. ウェルの洗浄操作を、2.と同様に行います。
5. 50 μ L のビオチン標識抗体液をウェルに添加し、37℃で 1 時間インキュベートします。
6. ウェルの洗浄操作を、2.と同様に行います。
7. 50 μ L の HRP 標識アビジン溶液をウェルに添加し、37℃で 1 時間インキュベートします。
8. ウェルの洗浄操作を、2.と同様に行います。
9. 100 μ L の TMB 基質液をウェルに添加後、遮光し、常温(25℃)で 10 分間インキュベートします。
10. 100 μ L の反応停止液をウェルに添加します。
11. プレートリーダーを用いて波長 450 nm (副波長 630 nm)で測光します。

図 : Flowchart

	Test Sample	Standard	Test Sample Blank	Reagent Blank
Reagents	Test sample 50 μ L	Diluted Standard (Tube-1~-7) 50 μ L	Sample buffer (Tube-8) 50 μ L	Sample buffer 50 μ L
Incubation for 1 hour at 37°C with plate lid				
Washing 3 times				
Biotinylated Antibody	50 μ L	50 μ L	50 μ L	—
Incubation for 1 hour at 37°C with plate lid				
Washing 3 times				
HRP-labeled Avidin	50 μ L	50 μ L	50 μ L	—
Incubation for 1 hour at 37°C with plate lid				
Washing 3 times				
Chromogen	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubation for 10 minutes at room temperature (shielded)				
Stop solution	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Read the plate at $\angle$ 450nm -630nm within 30 minutes after application of Stop solution				

標準曲線



キットの性能

標準曲線領域: 1.56~100 ng/mL

最低検出域: 3.13 ng/mL

最低血清希釈倍率: 500 倍

日内再現性 (n=10, 3 濃度): CV(%)=12.4, 3.19, 3.94

日間再現性 (n=10, 3 濃度): CV(%)=12.4, 5.07, 8.43

添加回収試験: × 500 正常血清に既知濃度の hAIM (30 ng/mL, 7 ng/mL)を添加した場合: 91.8–116.9%以内

貯法

構成品は 2–8℃保存品です。

キットの有効期限は外箱に表示してあります。

使用上の注意

- 2–8℃で保存してください。
- 本品は研究用試薬です。臨床上の診断などの目的にはご使用になれません。
- 試薬の取り扱いには十分気をつけてください。特に、硫酸および基質液は、皮膚や着衣についたり、目や口に入らないようにしてください。
- 生体試料の取り扱いには、感染等に十分注意してください。
- キットは定められた条件下で適切に保管し、有効期限内にご使用ください。
- 使用後の容器および廃液は、各自治体の規定に従って処理して下さい。

参考文献

- 1) Miyazaki, T. *et al.* (1999) J. Exp. Med 189: 413–422.
- 2) Arai, S. *et al.* (2005) Cell Metab. 1: 201–213.
- 3) Kurokawa, J. *et al.* (2010) Cell Metab. 11: 479–492.
- 4) Kurokawa, J. *et al.* (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108: 12072–12077.
- 5) Miyazaki, T. *et al.* (2011) Cir. J. 75: 2522–2531.

6) Arai, S., *et al.* (2013) Cell Rep., 3: 1187–98.

7) Oba, M. *et al.* (2012) Seikagaku 84: 588–591.

製造元



株式会社トランスジェニック

〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 7-1-14

TEL: 078-306-0295 FAX: 078-306-0296

URL: <http://www.transgenic.co.jp>

techstaff@transgenic.co.jp