CODE No. 7625

Revised: September, 2025 ver. 10

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

Quantitative test kit for Mouse IL-18

Mouse IL-18 ELISA Kit

CODE No. 7625 96 wells

MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

URL https://ruo.mbl.co.jp e-mail support@mbl.co.jp

CODE No. 7625

CONTENTS

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

CODE No. 7625

Before use, thoroughly read these Instructions.

Intended Use

The **Mouse IL-18 ELISA Kit** is based on sandwich ELISA and is capable of measuring mouse 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 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 Kupffer cells, activated macrophages, 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 T helper type 1 cytokines, IL-2, GM-CSF and IFN-γ in T cells, enhancement of Fas ligand expression by Th1 cells.

"Mouse IL-18 ELISA Kit" is the reagent for measuring mouse IL-18 specifically with high sensitivity by ELISA.

1 ng/ml of various cytokines, such as mouse IFN-α, IFN-γ, IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF and human IL-18 were not measured by this ELISA. The results were all bellow the detection limit of 25.0 pg/mL.

CODE No. 7625

Principle

The **Mouse IL-18 ELISA Kit** measures Mouse IL-18 by sandwich ELISA. This assay uses two monoclonal antibodies against two different epitopes of Mouse IL-18. Samples to be measured or standards are incubated in the microwells coated with anti-Mouse IL-18 monoclonal antibody. After washing, the peroxidase conjugated anti-Mouse 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 Mouse 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-Mouse IL-18 antibody	8-well strip × 12 strips
Mouse IL-18 calibrator	Mouse IL-18 (lyophilized powder)	2 vials
Conjugate reagent	Peroxidase conjugated anti-Mouse 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_2O_2 solution (ready-for-use)	20 mL × 1 bottle
Stop solution	0.5 M H_2SO_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.

Please see the label on this kit box.

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 **Mouse 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. Dilution

1) Dilute each sample with **Assay Diluent**.

e.g. Mouse serum

1:5 with **Assay Diluent**, e.g. by adding 50 μL of sample to 200 μL of **Assay Diluent**. Sample dilution may vary between different specimens. Appropriate sample dilution should be established by each investigator.

Since Mouse IL-18 calibrator contains FCS, any sample which does not contain serum component (such as FCS) may result different reactivity from the sample that contains serum component (e.g. mouse serum, mouse plasma and mouse derived cell culture supernatant containing FCS). Thus, this kit IS NOT SUITABLE FOR MEASURING THE SAMPLE WHICH DOES NOT CONTAIN ANY SERUM COMPONENT.

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

2. 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) Transfer 100 μL of each sample to Mouse IL-18 antibody coated **Microwells** simultaneously using multichannel pipette.
   *Reaction starts on pipetting to Mouse IL-18 antibody coated microwell. Pipetting 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)

Aspirate or discard the well contents. Fill the wells with **Wash solution** and then completely aspirate or discard the contents. Wash the wells 4 times with **Wash solution** using washing bottle. When autowasher is used, wash 4 times.

*Each laboratory is recommended to confirm its own appropriate washing times and set-up.

*Washing buffer should be used at room temperature (20-25°C).

STEP 3. (Conjugate incubation)

1) Pour **Conjugate solution** into the vessel. After removing Wash solution remained completely, pipette 100 μL of **Conjugate solution** to each well with multichannel pipette.

*To avoid dry up microwells, the Conjugate solution must be dispensed into the microwells as soon as remove the Wash solution

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

STEP 4. (Washing)

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

STEP 5. (Substrate incubation)

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

***Substrate reagent** should be used at room temperature (20-25°C).

*This vessel should be different from the one which was used for pouring **Conjugate solution**.

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

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

*To avoid dry up microwells, the **Substrate reagent** must be dispensed into the microwells as soon as remove the Wash solution.

2) Cover the plate and incubate for 30 minutes at room temperature (20-25°C).

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.

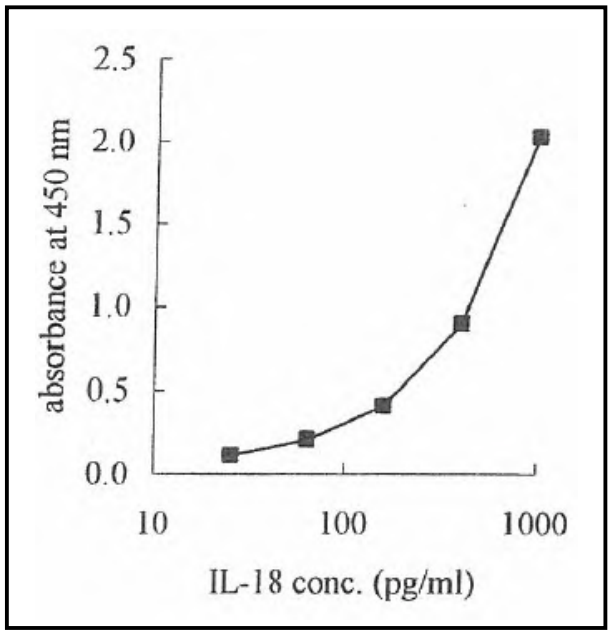
* Reading should be done within 30 minutes after stopping the reaction.

* 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., Mouse sera; x 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



Performance Characteristics

♦ Sensitivity

The sensitivity of the assay is 25.0 pg/mL.

The minimum detection limit estimated by serial dilution was 25.0 pg/mL since the mean + 2SD of the 12.5 pg/mL was lower than the mean - 2SD of the 25.0 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 in assay procedure.

Sample	serum 1	serum 2	serum 3	serum 4	serum 5	serum 6
Number of replicates	8	8	8	8	8	8
Mean (pg/ml)	3554.4	3285.9	2791.7	2212.8	992.3	625.3
C.V. (%)	2.5	2.0	5.8	5.3	3.1	3.8

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**".

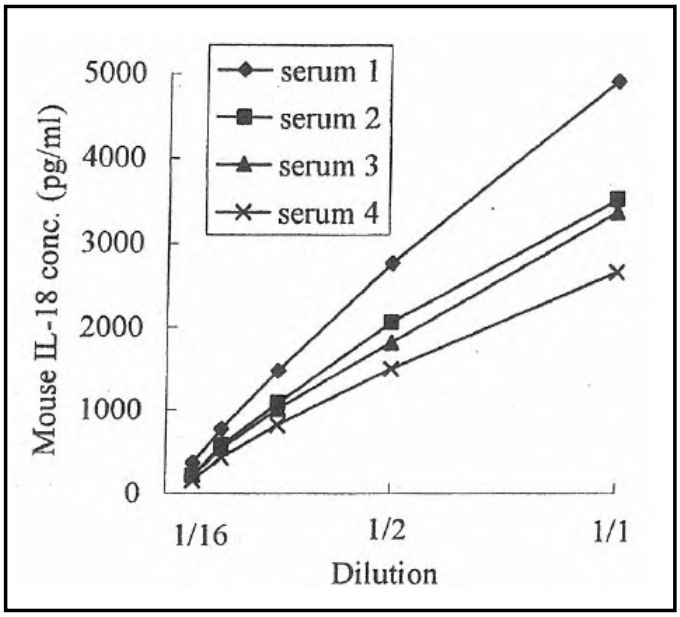
Sample	serum 1	serum 2	serum 3	serum 4	serum 5
Number of determinations	5	5	5	5	5
Mean (pg/ml)*	3500.2	3241.7	2557.9	2066.8	842.6
C.V. (%)	7.4	4.4	3.8	5.4	8.5

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

♦ Dilution test

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

IL-18 concentrations of the serum samples were calculated as described in calculation of results in assay procedure.



♦ Recovery test

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

IL-18 concentrations of the serum samples were calculated as described in calculation of results in assay procedure.

serum 1

(A) Additional rmIL-18* (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	956.0	-	-
536.0	1497.3	541.3	101.0
960.5	1873.3	917.3	95.5

serum 2

(A) Additional rmIL-18* (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	742.0	-	-
536.0	1279.0	537.0	100.2
960.5	1594.0	852.0	88.7

serum 3

(A) Additional rmIL-18* (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	1397.3	-	-
536.0	1921.8	524.5	97.9
960.5	2213.0	815.8	84.9

serum 4

(A) Additional rmIL-18* (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	340.8	-	-
536.0	884.5	543.8	101.4
960.5	1278.8	938.0	97.7

* rmIL-18 is abbreviation of recombinant mouse IL-18.

References

1) Okamura H., et al. Nature 378, 88-91 (1995)
2) Ushio S., et al. J. Immunol. 156, 4274-4279 (1996)
3) Micallef M., et al. Eur. J. Immunol. 26, 1647-1651 (1996)
4) Tao D., et al. Cell Immunol. 173, 230-235 (1998)
5) Taniguchi M., et al. J. Immunol. methods 206, 197-113 (1997)

As this product has been used in many researches, these references are a part of such reports.

Please visit our website at https://ruo.mbl.co.jp/.

Manufacturer

MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

URL https://ruo.mbl.co.jp / e-mail support@mbl.co.jp

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-1β変換酵素（ICE; IL-1β 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。

Mouse 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,マウス 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（マウス IFN-α、IFN-γ、IFN-β、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、GM-CSF およびヒト IL-18）は、検出されません。

測定原理

Mouse 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、マウス IL-18 を測定するキットです。本キットの検出感度は 25.0 pg/mL です。

抗 マウス 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マウス 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 マウス 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-Mouse IL-18 antibody	8-well strip × 12 strips
Mouse IL-18 calibrator	Mouse IL-18 (lyophilized powder)	2 vials
Conjugate reagent	Peroxidase conjugated anti-Mouse 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_2O_2 solution (ready-for-use)	20 mL × 1 bottle
Stop solution	0.5 M H_2SO_4 (ready-for-use)	20 mL × 1 bottle

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

保存と有効

2-8°C にて保存して下さい。有効期間は製造後 12 ヶ月です。

キットに貼られているラベルを参照下さい。

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

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きらいますので､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 (NaN_3)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（H_2SO_4）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 で保存した場合、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、必要量のみ用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**”の調製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

Mouse IL-18 calibrator を **Assay diluent** で溶解して“**Standards**”を作製します。

“**Standards**”の調製方法はキット添付の文書「Standards の調製方法」に従って下さい。

* 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 **Mouse 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下さい。

4. その他試薬

その他の試薬は全てそのままご使用下さい。

♦ 操作方法

1. 検体の準備

1) サンプルは、**Assay diluent** を用いて希釈して下さい。

（例）血清を測定する場合には、5 倍希釈して測定して下さい。

(Assay diluent 200 µL に対し、検体 50 µL を加え 5 倍希釈します。**)**

※検体希釈倍数は用いるサンプルによって異なります。最適な検体希釈倍数は研究室毎に設定して下さい。

※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。

※**Mouse IL-18 calibrator** には FCS が含まれています。従って FCS 等の血清成分を含まないサンプルは、血清成分を含むサンプル（例えばマウス血清、マウス血漿、FCS を含む細胞培養上清など）と異なった反応性を示します。従って、本キットは血清成分を含まないサンプルの測定には適しません。血清成分を含まないサンプルを測定した場合の定量値は参考値として扱って下さい。

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。

2. 操作の手順

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て下さい。

STEP 1.（1 次反応）

1) 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下さい。

2) プレートにカバーをかけ、室温（20-25°C）で 1 時間静置反応させます。

STEP 2.（洗浄）

用手法: 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下さい。

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下さい。

※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（20-25°C）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 µL 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（20-25°C）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 µL 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（20-25°C）で 30 分間静置反応させます。

* **Substrate reagent** は必ず室温（20-25°C）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。

* マイクロカップの乾燥を避けるため、**Substrate reagent** のマイクロカップへの分注は洗浄液除去後直ちに行って下さい。

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 µL 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 分以内に行って下さい。

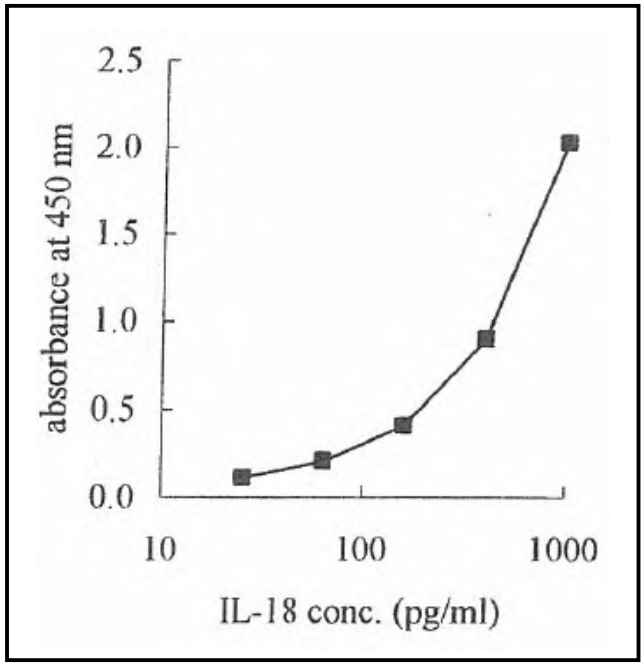
* プレートの裏側は汚れのない乾いた状態を保つようにして下さい。また、吸光度を測定する前にウェル内に気泡がないことを確認して下さい。

♦ 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下さい。

♦ 標準曲線の例



CODE No. 7625

性能

♦ 感度

最小検出濃度は、25.0 pg/mL です。

リコンビナント Mouse IL-18 を希釈して測定したとき、12.5 pg/mL 測定値の平均 ＋2SD が、25.0 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**の項を参照して下さい。）

Sample	serum 1	serum 2	serum 3	serum 4	serum 5	serum 6
Number of replicates	8	8	8	8	8	8
Mean (pg/ml)	3554.4	3285.9	2791.7	2212.8	992.3	625.3
C.V. (%)	2.5	2.0	5.8	5.3	3.1	3.8

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**の項を参照して下さい。）

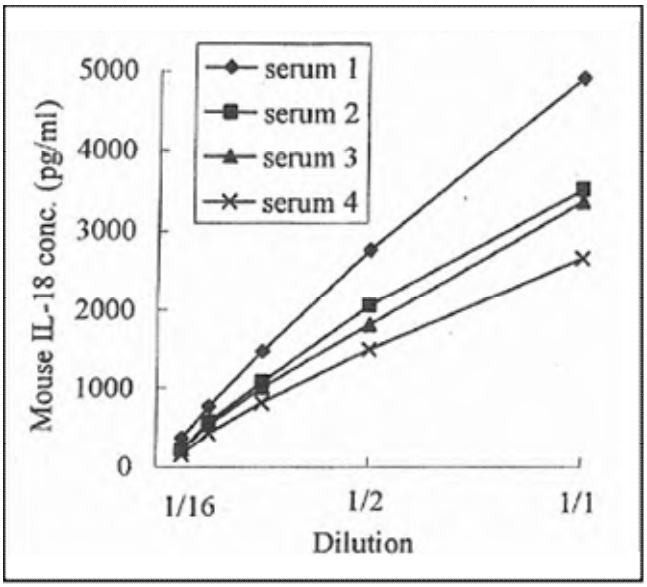
* 各血清サンプルは 6 重測定しました。

Sample	serum 1	serum 2	serum 3	serum 4	serum 5
Number of determinations	5	5	5	5	5
Mean (pg/ml)*	3500.2	3241.7	2557.9	2066.8	842.6
C.V. (%)	7.4	4.4	3.8	5.4	8.5

♦ 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。）



♦ 添加回収試験

血清 4 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**の項を参照して下さい。)

serum 1

(A) Additional rmIL-18* (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	956.0	-	-
536.0	1497.3	541.3	101.0
960.5	1873.3	917.3	95.5

serum 2

(A) Additional rmIL-18* (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	742.0	-	-
536.0	1279.0	537.0	100.2
960.5	1594.0	852.0	88.7

serum 3

(A) Additional rmIL-18* (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	1397.3	-	-
536.0	1921.8	524.5	97.9
960.5	2213.0	815.8	84.9

serum 4

(A) Additional rmIL-18* (pg/mL)	IL-18 concentration observed (pg/mL)	(B) recovery (pg/mL)	(B/A) recovery (%)
0.0	340.8	-	-
536.0	884.5	543.8	101.4
960.5	1278.8	938.0	97.7

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

参考文献

1) Okamura H., et al. Nature 378, 88-91 (1995)
2) Ushio S., et al. J. Immunol. 156, 4274-4279 (1996)
3) Micallef M., et al. Eur. J. Immunol. 26, 1647-1651 (1996)
4) Tao D., et al. Cell Immunol. 173, 230-235 (1998)
5) Taniguchi M., et al. J. Immunol. methods 206, 197-113 (1997)

ここにご紹介する以外にも多数の文献がございます。

詳細は弊社 Web サイトをご覧下さい。 **https://ruo.mbl.co.jp/**

製造元

株式会社 医学生物学研究所

URL https://ruo.mbl.co.jp / e-mail support@mbl.co.jp