

使用説明書
Instruction manual

Equol ELISA Kit

エクオール ELISA キット

Item No. EEQ-01

本製品の使用は研究目的に限られます。
診断目的には使用できません。FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

製造元

株式会社ヘルスケアシステムズ
名古屋千種区千種2-22-8 NALIC 105
TEL 03-6809-2722 FAX 050-3737-3691
<https://hc-sys.com>
E-mail : support@hc-sys.jp
WEB:<https://hc-sys.com>

Healthcare Systems Co., Ltd.

05 NALIC 2-22-8, Chikusa, Chikusa-ku Nagoya-city, Aichi 464-0858, JAPAN
TEL +81-3-6809-2722 FAX +81-50-3737-3691
E-mail:support@hc-sys.jp
WEB:<https://hc-sys.com>株式会社ヘルスケアシステムズ
〒464-0858 愛知県名古屋市千種区千種2-22-8 NALIC 105
TEL 03-6809-2722 FAX 050-3737-3691
support@hc-sys.jpHealthcare Systems Co., Ltd.
105 NALIC 2-22-8, Chikusa, Chikusa-ku Nagoya-city, Aichi 464-0858, JAPAN
TEL +81-3-6809-2722 FAX +81-50-3737-3691
support@hc-sys.jp

目次

1. 使用目的……3
2. 測定原理……3
3. 安全上の注意……4
4. 保存と安定性……4
5. キットの内容……4
6. 本キット以外に必要な機器……4
7. 検体の採取と保存……5
8. 試薬の調製……5
9. 試験手順……6
10. 結果の計算……6
11. 性能特性……7
12. 文献……8

1. 使用目的

本製品は生体試料(尿、その他体液等)や食品に含まれるエクオール(Equol)を定量的に検出するためのELISAキットです。

本製品の使用は研究目的に限られます。診断、治療など、研究以外の目的には使用できません。

2. 測定原理

本製品はエクオールに特異的なモノクローナル抗体¹⁾を用いた競合ELISAを基本的な原理としています。



1. 本キットでは、あらかじめエクオールがマイクロプレートに固相化されています。

○ …固相化エクオール

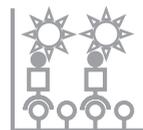


2. HRP標識抗エクオール抗体と検体を加えます。HRP標識抗エクオール抗体は、固相化エクオールと検体由来エクオールと競合的に結合します。

□ …HRP標識抗エクオール抗体 ○ …検体由来エクオール



3. 検体由来エクオールと結合したHRP標識抗エクオール抗体を洗浄により除去します。



4. 発色試薬を加える事により、反応液が青色に呈色します。さらに停止液を加える事により黄色に呈色し、吸光度を計測します。

☀ …発色試薬

3. 安全上の注意

1. 測定開始前に使用説明書を十分に読んで下さい。使用説明書はキットに同封の物を使用してください。
2. 本製品は使用期限以内に使用して下さい。使用期限内でも、常温保管、冷凍保管された場合は十分な精度で測定できない場合があります。
3. 測定の際は、必要に応じて白衣、保護メガネ、ラテックスグローブ等を使用して身体を保護して下さい。

4. 保存と安定性

本製品は直射日光を避け、冷蔵条件(2-8℃)で保存して下さい。冷凍はしないで下さい。測定後に余ったストリップウェルはジップ袋に密封して冷蔵保管して下さい。その他試薬類も同様に冷蔵保管して下さい。開封後のストリップウェル、試薬類は1週間以内に使い切して下さい。

5. キットの内容

	内容	数量
1	Pre-Coated Microplate (12×8 well strips)	1plate/ 96wells
2	Equol Standard (2500 µg/mL)	1vial/ 50 µL
3	Equol Detection Antibody	1vial/ 15 µL
4	Reagent Diluent	1 bottle / 50 mL
5	Wash Buffer Concentrate (10×)	1 bottle / 50 mL
6	TMB Substrate Solution	1 bottle / 12 mL
7	Stop Solution	1 bottle / 6 mL
8	Plate Seal	2 sheets

6. 本キット以外に必要な機器類

1. マイクロピペット(1-20 µL)及びチップ
2. マイクロピペット(50-200 µL)及びチップ
3. 8チャンネルマイクロピペット(50-200 µL)及びチップ
4. マイクロプレートリーダー(測定波長450 nm、リファレンス波長570-620 nm)

7. 検体の採取と保存

採取した検体を保管する場合は、-20℃以下の冷凍条件で保存して下さい。

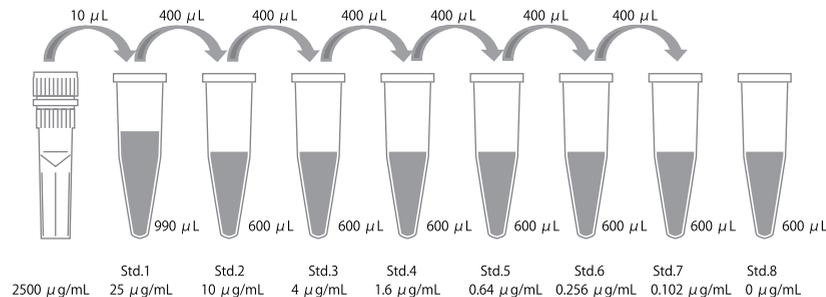
1. 尿…Reagent Diluentで10倍希釈して測定に供して下さい。測定値が検量線の上限値に近い場合は定量性が低下しますので、より希釈倍率を高めて再測定して下さい。尿中の総エクオール量を定量する場合は、文献等²⁾を参考に脱抱合処理を行って下さい。

例;50 µLの尿検体と、50 µLのβ-グルクロニダーゼ(*Helix pomatia* 由来、125 U/100 µL 0.1 M酢酸バッファー(pH 5.0))を混合し、37℃で1時間処理。

2. 血清…血清中のエクオール濃度は尿に比べて低値のため、測定値が定量限界以下になる場合があります。必要に応じて、文献等を参考に検体を濃縮して下さい。
3. 食品等…食品の種類により、抽出方法が変わります。文献等を参考に抽出を行って下さい。

8. 試薬の調製

1. 測定前に全ての試薬を常温に戻して下さい。
2. Equol Detection Antibodyを遠心機でスピンドウンし、内溶液をチューブの底に集めて下さい。Equol Detection AntibodyをReagent Diluentで400倍希釈して下さい。
3. Wash Buffer Concentrate (10×)の全量を450 mLの蒸留水で希釈して下さい。
4. 10 µLのEquol Standard (2500 µg/mL)と990 µLのReagent Diluentを混合して下さい(Std.1)。400 µLのStd.1と600 µLのReagent Diluentを混合し、これをStd.2とします。同様の操作を繰り返し、Std.7まで調製して下さい。Std.8はReagent Diluentを使用します。



9. 試験手順

- 「7. 検体の採取と保存」「8. 試薬の調製」の項目に従い、各試薬類を調製します。
- 希釈済み検体、段階希釈したEquol Standardを、下記レイアウト表を参考に50 μ Lずつ各ウェルに分注します。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std.1	Std.1	Sam-1	Sam-1								
B	Std.2	Std.2	Sam-2	Sam-2								
C	Std.3	Std.3	Sam-3	Sam-3								
D	Std.4	Std.4	Sam-4	Sam-4								
E	Std.5	Std.5	Sam-5	Sam-5								
F	Std.6	Std.6	Sam-6	Sam-6								
G	Std.7	Std.7	Sam-7	Sam-7								
H	Std.8	Std.8	Sam-8	Sam-8								

- 希釈済みEquol Detection Antibodyを50 μ Lずつ各ウェルに分注します。
- マイクロプレートを左右に振とうし混合した後、プレートをシールし、室温で1時間反応させます。
- ウェルの反応液を捨て、希釈済みのWash Bufferを300 μ Lずつ分注し、ウェル内のWash Bufferを捨てます。これを4回繰り返します。最後にマイクロプレートを上下反転させ、ウェル内のWash Bufferを可能な限り取り除きます(きれいなペーパータオルに軽く叩きつけて余分な液体を除去します)。
- 全てのウェルにTMB Substrate Solutionを100 μ Lずつ分注し、プレートをシールし、遮光下室温で15分間反応させます。
- 全てのウェルにStop Solutionを50 μ Lずつ分注し、マイクロプレートを左右に振とうし混合した後、マイクロプレートリーダー(測定波長450 nm、リファレンス波長570-620 nm)にて吸光度を測定します。

10. 結果の計算

標準液の濃度と吸光度から検量線を作成します。カーブフィッティングには、4係数ロジスティック曲線の使用を推奨します。

単位の変換

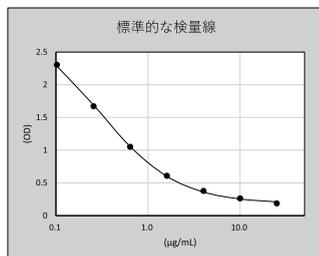
$$\text{エクオール}(\mu\text{g/mL}) \times 4.13 = \mu\text{mol/L}$$

検量線の例

参考例です。実際の計算

には使用しないでください。

エクオール ($\mu\text{g/mL}$)	OD (450nm/570nm)
25.00	0.187
10.00	0.264
4.00	0.377
1.60	0.610
0.64	1.051
0.26	1.670
0.10	2.305
0.00	2.979



11. 性能特性

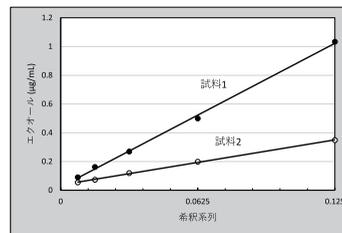
感度

検出限界	0.037 $\mu\text{g/mL}$ (0.151 μM)	RSD>30% RSD: 相対標準偏差
定量限界	0.173 $\mu\text{g/mL}$ (0.716 μM)	RSD>10% RSD: 相対標準偏差

精度

	平均($\mu\text{g/mL}$)	SD($\mu\text{g/mL}$)	CV(%)	N
同時再現性	10.0	1.08	10.8	6
	19.3	1.59	8.2	6
	50.3	3.06	6.1	6
日差再現性	10.4	1.06	10.2	6
	17.8	1.80	10.1	6
	39.6	5.11	12.9	6

希釈直線性



添加回収

尿検体	検体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	添加濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	予想値 ($\mu\text{g/mL}$)	測定値 (pg/mL)	回収率 (%)
1	9.2	23.2	32.3	31.6	97.8
1	9.2	8.2	17.4	17.3	99.5
1	9.2	3.1	12.3	12.3	100.0
2	27.2	23.2	50.3	48.3	96.0
2	27.2	8.2	35.4	38.5	108.9
2	27.2	3.1	30.3	30.8	101.9

HPLCとの比較

回帰式	r	N
ELISA = 0.934 × HPLC + 1.055	0.968	40

抗体の特異性

物質	濃度 (μM)	交差性 (%)
S-エクオール	10	100.0
R-エクオール	10	88.2
ダイゼイン	10	ND
ゲニステイン	10	0.1
グリシテイン	10	1.6
ゲニスチン	10	ND

ND：非検出

測定値の例

尿検体	平均(μg/mL)	SD	N
	64.5	60.8	40

1 2. 文献

1. Niwa T., Yokoyama S., Osawa T. (2009). Preparation of soy isoflavonoids for the production of anti-equol monoclonal antibody, *Phytochemistry Letters* 2(4), 220–222.
2. Taylor JI., Grace PB., Bingham SA. (2005). Optimization of conditions for the enzymatic hydrolysis of phytoestrogen conjugates in urine and plasma, *Analytical Biochemistry* 341, 220–229.

TABLE OF CONTENTS

1. INTENDED USE.....10
2. TEST PRINCIPLE.....10
3. SAFETY PRECAUTIONS.....11
4. STORAGE AND STABILITY.....11
5. MATERIALS SUPPLIED.....11
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED11
7. SAMPLE COLLECTION AND STRAGE.....12
8. REAGENT PREPARATION.....12
9. TEST PROCEDURE.....13
- 1 0. CALCULATION OF RESULTS.....13
- 1 1. PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....14
- 1 2. PRODUCT LITERATURE REFERENCES15

1. INTENDED USE

Equol ELISA Kit is an immunoassay specifically designed and validated for quantitative measurement of biological products (urine and other body fluid) or food samples. It is intended only for research. It is not for diagnostic use or treatment.

2. TEST PRINCIPLE

This product is based on the competitive ELISA using monoclonal antibody specific for equol¹⁾ as the basic principle.



1. The microplate provided in this kit has been pre-coated with equol.

 ...Solid phased equol



2. Add Equol Detection Antibody (HRP-labeled anti-equol antibody) and samples. HRP-labeled anti-equol antibody competitively binds to solid phased equol and specimen derived equol.

 ...HRP-labeled anti-equol antibody  ...Specimen derived equol



3. After incubation, HRP-labeled anti-equol antibody bound to specimen derived equol is washed off.



4. Adding a coloring reagent (TMB Substrate Solution), the reaction solution change blue. Add a Stop Solution to develop a yellow color and measure the absorbance.

 ...Coloring reagent

3. SAFETY PRECAUTIONS

1. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit.
2. Please use this product within the expiration date. Even within the expiration date, measurement may not be possible with sufficient accuracy when stored at room temperature or frozen.
3. In an assay, please protect your body using white coat, protective eyeglasses, latex gloves etc. as necessary.

4. STORAGE AND STABILITY

The kit should be stored at 2-8 °C. Keep away from direct sunlight and freezing. After measurement, please seal the surplus strip well and refrigerate it in a zip bag. Please keep other reagents refrigerated as well. Please use up stripwell, reagents within 1 week after the kit is opened.

5. MATERIALS SUPPLIED

	Component	Quantity/Size
1	Pre-Coated Microplate (12×8 well strips)	1plate/ 96wells
2	Equol Standard (2500 μg/mL)	1vial / 50 μL
3	Equol Detection Antibody	1vial / 15 μL
4	Reagent Diluent	1 bottle / 50 mL
5	Wash Buffer Concentrate (10×)	1 bottle / 50 mL
6	TMB Substrate Solution	1 bottle / 12 mL
7	Stop Solution 	1 bottle / 6 mL
8	Plate Seal	2 sheets

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

1. Micropipette (1-20 μL) and tips
2. Micropipette (50-200 μL) and tips
3. 8-Channel Micropipette (50-200 μL) and tips
4. Microplate reader (measurement wavelength 450 nm, reference wavelength 570 - 620 nm)

7. SAMPLE COLLECTION AND STRAGE

Storing the collected specimens, please store under freezing condition at -20 °C or less.

1. Urine...In general, urine samples are diluted 10-fold with Reagent Diluent and added directly to the wells. If the measured value is close to the upper limit of the calibration curve, the quantitative-ness will decrease. We recommend remeasuring with increasing dilution factor. When quantifying the total equol amount in urine, please perform deconjugation referring to the literature ²⁾.

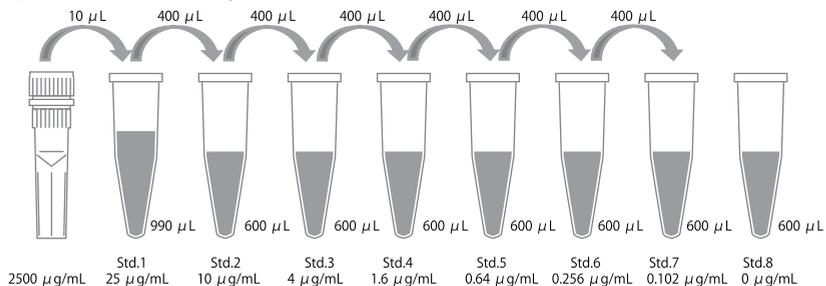
Example: 50 μ L of urine sample and 50 μ L of β -glucuronidase (derived from *Helix pomatia*, 125 U / 100 μ L 0.1 M acetate buffer (pH 5.0)) are mixed and treated at 37 °C for 1 hour.

2. Serum...The concentration of equol in serum is lower than urine, so the measured value may be below the limit of quantification. If necessary, concentrate the specimen with reference to literatures.

3. Foods...The extraction method will change depending on the type of food. Please extract according to literatures.

8. REAGENT PREPARATION

1. Bring all reagents and samples to room temperature (18–25 °C) before use.
2. Briefly spin or centrifuge the Equol Detection Antibody to collect the inner solution to the bottom of the tube. Dilute the Equol Detection Antibody 400-fold with Reagent Diluent.
3. Dilute the whole volume of Wash Buffer Concentrate (10 \times) with 450 mL of distilled water.
4. Mix 10 μ L Equol Standard (2500 μ g / mL) with 990 μ L Reagent Diluent (Std. 1). Mix 400 μ L of Std.1 and 600 μ L of Reagent Diluent, and make it Std.2. Repeat the same operation, please prepare up to Std.7. Std.8 uses Reagent Diluent.



9. TEST PROCEDURE

1. Prepare all reagents, standards, and samples as directed in "7. SAMPLE COLLECTION AND STRAGE" and "8. REAGENT PREPARATION".
2. Dilute samples and serial diluted equol standards, divide each 50 μ L of solution into wells with reference to the layout table below.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std.1	Std.1	Sam-1	Sam-1								
B	Std.2	Std.2	Sam-2	Sam-2								
C	Std.3	Std.3	Sam-3	Sam-3								
D	Std.4	Std.4	Sam-4	Sam-4								
E	Std.5	Std.5	Sam-5	Sam-5								
F	Std.6	Std.6	Sam-6	Sam-6								
G	Std.7	Std.7	Sam-7	Sam-7								
H	Std.8	Std.8	Sam-8	Sam-8								

3. Add 50 μ L of diluted Equol Detection Antibody into each wells.
4. Shake the microplate gently, seal the plate and incubate for 1 hour at room temperature.
5. Aspirate the solution of each wells and wash each wells four times with 300 μ L of diluted Wash Buffer. After the last wash, remove the remaining fluid as much as possible (invert the plate and blot it against clean paper towels to remove excess liquid).
6. Add 100 μ L of TMB Substrate Solution into all wells, seal the plate and incubate for 15 minutes at room temperature in the dark.
7. Add 50 μ L of Stop Solution to all wells, shake and mix the microplate gently, then measure the absorbance with a microplate reader (measurement wavelength 450 nm, reference wavelength 570 - 620 nm)

10. CALCULATION OF RESULTS

The obtained OD of the standards (y-axis, linear) are plotted against their concentration (x-axis, logarithmic).

We recommend using four-parameter logistic regression models.

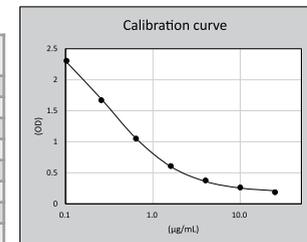
Conversion of units

$$\text{Equol } (\mu\text{g} / \text{mL}) \times 4.13 = \mu\text{mol} / \text{L}$$

Typical calibration curve

Example. Do not use for calculation.

Equol (μ g/mL)	OD (450nm/570nm)
25.00	0.187
10.00	0.264
4.00	0.377
1.60	0.610
0.64	1.051
0.26	1.670
0.10	2.305
0.00	2.979



11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

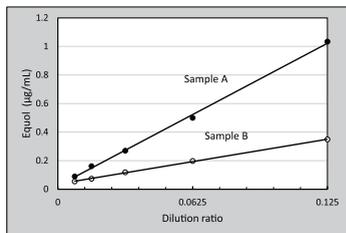
Sensitivity

Detection Limit	0.037 $\mu\text{g/mL}$ (0.151 μM)	RSD>30% RSD: relative standard deviation
Quantitative Limit	0.173 $\mu\text{g/mL}$ (0.716 μM)	RSD>10% RSD: relative standard deviation

Precision

	Mean($\mu\text{g/mL}$)	SD($\mu\text{g/mL}$)	CV(%)	N
Intra-Assay	10.0	1.08	10.8	6
	19.3	1.59	8.2	6
	50.3	3.06	6.1	6
Inter Assay	10.4	1.06	10.2	6
	17.8	1.80	10.1	6
	39.6	5.11	12.9	6

Linearity



Recovery

Urine Sample	Endogenous ($\mu\text{g/mL}$)	Added ($\mu\text{g/mL}$)	Expected ($\mu\text{g/mL}$)	Observed (pg/mL)	Recovery (%)
1	9.2	23.2	32.3	31.6	97.8
1	9.2	8.2	17.4	17.3	99.5
1	9.2	3.1	12.3	12.3	100.0
2	27.2	23.2	50.3	48.3	96.0
2	27.2	8.2	35.4	38.5	108.9
2	27.2	3.1	30.3	30.8	101.9

Method Comparison

Regression equation	r	N
ELISA = 0.934 × HPLC + 1.055	0.968	40

Antibody Specificity

Compound	Concentration (μM)	Cross Reactivity (%)
S-equol	10	100.0
R-equol	10	88.2
Daidzein	10	ND
Genistein	10	0.1
Glycitein	10	1.6
Genistin	10	ND

ND : Not Detected

Equol Example Ranges

Urine	Mean($\mu\text{g/mL}$)	SD	N
	64.5	60.8	40

12. PRODUCT LITERATURE REFERENCES

1. Niwa T., Yokoyama S., Osawa T. (2009). Preparation of soy isoflavonoids for the production of anti-equol monoclonal antibody, *Phytochemistry Letters* 2(4), 220–222.
2. Taylor JL, Grace PB., Bingham SA. (2005). Optimization of conditions for the enzymatic hydrolysis of phytoestrogen conjugates in urine and plasma, *Analytical Biochemistry* 341, 220–229.