

Rat N-ERC/Mesothelin Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

Ercは腎がん発症モデルRat (Eker Rat)の腎がん細胞において正常腎臓と比べて、高発現されている遺伝子として同定されたものです。このヒトHomologueは、MPF (megakaryocyte potentiating factor)やMesothelinと呼ばれ、特に中皮細胞で発現がみられるタンパク質です。この分子は中皮腫との関わりが示唆されており、腫瘍マーカーとしての意義が予想されます。ヒトにおいてはその他にも膀胱がん、卵巣がん、肺がんなどの関わりが示唆されています。全長分子量約71kDaのGPIアンカー型膜タンパク質として発現しますが、furin 様プロテアーゼによって消化されるといわれており、その結果約31kDaと約40kDaの断片となります。

弊社では、31kDa断片をN-ERC/ Mesothelin、40kDa断片をC-ERC/ Mesothelinとして測定系を構築しました。

本製品は、ラットのN-ERC/Mesothelinを測定するキットであり、腫瘍細胞株、血清、血漿を用いた詳細なERC発現解析をおこなうことを目的としたEIAキットです。

2. 原理および測定方法

本製品は、サンドイッチ法によるEIA (Enzyme Immuno Assay)キットです。1次抗体は、プレートに固相されていますので、検体および標準物質を加え、1次反応をおこない洗浄後 HRP 標識された2次抗体を加え2次反応をおこないます。反応後、過剰の2次抗体を洗浄除去します。Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させます。この呈色は、Rat N-ERC/Mesothelin の量に比例します。

3. 測定範囲

0.08 ~ 5 ng/mL

4. 使用目的

ラットの血清、EDTA-血漿、腹水および培養上清中の Rat N-ERC/Mesothelin を測定できます。

5. 構成試薬

| | |
|--|------------|
| 1 抗体プレート (抗 Rat ERC (30F2) Mouse IgG MoAb A.P. 固相) | 96Well x 1 |
| 2 標識抗体濃縮液 (30倍濃度 HRP 標識抗 Rat ERC (280) Rabbit IgG Fab' A.P.) | 0.4mL x 1 |
| 3 標準物質 (Rat N-ERC/Mesothelin) | 0.5mL x 2 |
| 4 希釈用緩衝液 (1% BSA, 0.05% Tween-20 含有 PBS) | 30mL x 1 |
| 5 標識抗体用溶解液 (1% BSA, 0.05% Tween-20 含有 PBS) | 12mL x 1 |
| 6 TMB 基質液 | 15mL x 1 |
| 7 停止液 (1N H ₂ SO ₄) | 12mL x 1 |
| 8 濃縮洗浄液 (40倍濃度リン酸緩衝液) | 50mL x 1 |

6. 用法および用量 (操作方法)

(1) 必要な器具・器材

| | |
|------------------------|------------------|
| プレートリーダー (測定波長: 450nm) | マイクロピペットおよびチップ |
| 希釈用テストチューブ | メスシリンダーおよびビーカー |
| 精製水 | グラフ用紙 (両対数) |
| ペーパータオル | 洗浄ピン |
| 冷蔵庫 (4°C として) | 採取用容器 (清潔な試験管など) |
| 恒温器 (37°C±1°C) | |

(2) 準備

濃縮洗浄液の希釈方法

濃縮洗浄液は、40倍濃度です。使用前に常温に戻し十分に転倒混和します。濃縮洗浄液 50mL に対して精製水を 1,950mL 加え混和します。これを洗浄液とします。冷蔵保存し 2 週間以内に使用してください。

標識抗体濃縮液の希釈方法

標識抗体濃縮液は 30 倍濃度です。別に用意した採取用容器にて、必要量に応じて標識抗体濃縮液を標識抗体用溶解液で 30 倍希釈してください。これを標識抗体とします。

希釈例)

1 スリット (8 ウェル) 使用する場合=800 μL 必要(最低量)
(標識抗体濃縮液を 30 μL とし、標識抗体用溶解液 870 μL を加え良く混和し、100 μL ずつ使用します。)

この操作は、標識抗体添加の直前におこなってください。

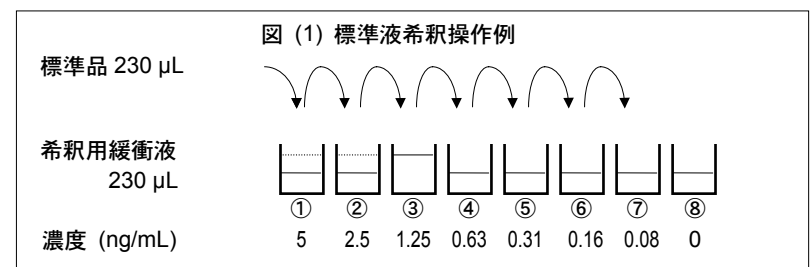
標識抗体濃縮液の残りは、蓋をしっかりと閉め冷蔵にて保存してください。有効期限内に再度使用できます。

標準物質の希釈方法

標準物質バイアル瓶に精製水を 0.5 mL 加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は 10 ng/mL となります。

希釈用テストチューブを 8 本用意し希釈用緩衝液を 230 μL ずつ量り取ります。各々のテストチューブに 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.63 ng/mL, 0.31 ng/mL, 0.16 ng/mL, 0.08 ng/mL, 0 ng/mL の表示をします。

5 ng/mL の希釈用テストチューブに 10 ng/mL の標準物質溶液を 230 μL 加え混和しその溶液 230 μL を 2.5 ng/mL の希釈用テストチューブに加え混和します。順次 2 倍連続希釈をおこない 5 ng/mL~0.08 ng/mL までの 7 点を希釈標準品とし、0 ng/mL を検体ブランクとします。(図(1) 参照)



検体の希釈方法

検体は必要に応じて希釈用緩衝液で適宜希釈して測定してください。

血清、血漿の希釈の目安は 40 倍です。腹水の場合は 1,000 倍前後から検討されることをおすすめします。

(3) 測定操作方法

試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し変化のない事確かめてください。

検体の測定と同時に希釈標準品を測定し検量線を設定してください。

- 1 ブランクの添加 (以降図 (2) 参照)
試薬ブランクを設定し希釈用緩衝液を 100 μL 入れます。
- 2 検体、希釈標準品の添加
検体 100 μL および希釈標準品各 100 μL ならびに検体ブランク 100 μL を入れます。
- 3 プレートカバーをして 37°C 60 分間反応
- 4 洗浄 7 回
洗浄操作に十分注意して測定してください。推奨する洗浄方法は、抗体プレートの各ウェルを洗浄ピンに入れた洗浄液を用いて勢い良く洗い流しその後、洗浄液をウェルに満たし 15~30 秒間静置しプレートを逆さまにして振り払い洗浄液を完全に除去します。この洗浄操作を規定回数以上おこない、ペーパータオル等の上でたたいて全ウェルの水分を完全に除去してください。プレートウォッシャーによる洗浄は、機種により洗浄が不十分な場合がありますので 4 回洗浄後、さらに上記洗浄方法による洗浄を 3 回おこなってください。
- 5 標識抗体の添加
検体、標準、検体ブランクに標識抗体を各々 100 μL 添加します。
- 6 プレートカバーをして 4°C 30 分間反応
- 7 洗浄 9 回
上記 4 洗浄と同様操作
- 8 TMB 基質液の添加
あらかじめ必要量を採取用容器にとり、そこからすべてのウェルに TMB 基質液を 100 μL 添加します。TMB 基質液添加後、反応液は徐々に青色に変わります。この時の反応は遮光してください。また、採取用容器に残った TMB 基質液は、コンタミの原因になりますので元に戻さないでください。
- 9 遮光をして常温 30 分間反応
- 10 停止液の添加
すべてのウェルに停止液を 100 μL 添加します。プレートの側面を軽くたたいて混和します。反応液は青色から黄色に変化します。
- 11 吸光度測定
プレート底面のよごれや水滴を拭き取り液面に気泡がないことを確認した後、30 分以内に試薬ブランクを対照として検体および標準ならびに検体ブランクの波長 450nm における吸光度を測定してください。

図(2) 測定操作一覧

| | 検体 | 標準 | 検体ブランク | 試薬ブランク |
|---|--------------|-----------------|------------------|------------------|
| 試料 | 検体 100 μL | 希釈標準品 100 μL | 希釈用緩衝液 100 μL | 希釈用緩衝液 100 μL |
| プレートカバーをして 37°C 60 分間反応 | | | | |
| 洗浄 7 回 | | | | |
| 標識抗体 | 100 μL | 100 μL | 100 μL | - |
| プレートカバーをして 4°C 30 分間反応 | | | | |
| 洗浄 9 回 | | | | |
| TMB 基質液 | 100 μL | 100 μL | 100 μL | 100 μL |
| 遮光常温 30 分間反応 | | | | |
| 停止液 | 100 μL | 100 μL | 100 μL | 100 μL |
| プレートをたたいて反応液を混和し、30 分以内に試薬ブランクを対照として 450 nm における検体、標準、検体ブランクの吸光度を測定 | | | | |

7. 操作上の注意事項

- 1 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。
- 2 検体は必要に応じて希釈用緩衝液にて希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定することをおすすめします。
- 4 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 5 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 6 洗浄液は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完全に除去してください。ペーパータオルをウェルの中に入れる事はしないでください。
- 7 TMB 基質液は、光に対して敏感です。遮光保存してください。金属との接触も避けてください。
- 8 吸光度測定は、停止液添加後 30 分間以内におこなってください。

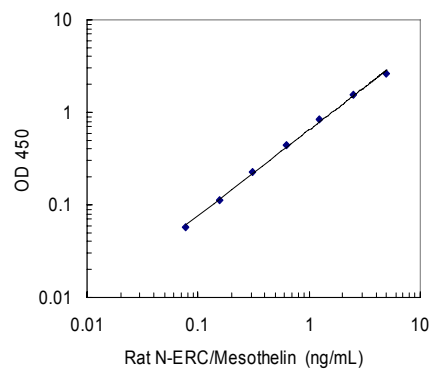
8. 測定結果の算出方法

対数グラフの縦軸に吸光度を、横軸に検体濃度と各標準物質濃度の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値をとり検量線を設定します。

試料検体の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値を検量線に当てはめ、検体濃度を読みとります。

9. 測定値と検量線作成例

| 標準品濃度 (ng/mL) | 吸光度 (450nm) |
|---------------|-------------|
| 5 | 2.586 |
| 2.5 | 1.547 |
| 1.3 | 0.851 |
| 0.63 | 0.450 |
| 0.31 | 0.229 |
| 0.16 | 0.115 |
| 0.08 | 0.060 |
| 0 (検体ブランク) | 0.003 |



* 上記検量線は作成例です。測定に当たってはその都度検量線を作成してください。

10. キットの性能

(1) 希釈試験 (標準物質を添加したサンプルを使用しています)

| 検体 | 希釈倍率 (x) | 測定値 (ng/mL) | 理論値 (ng/mL) | % |
|--------------------------|----------|-------------|-------------|-------|
| 培地 (10%FCS 添加 RPMI-1640) | 8 | 0.64 | 0.63 | 101.6 |
| | 16 | 0.32 | 0.31 | 103.2 |
| | 32 | 0.16 | 0.16 | 100.0 |
| 血清(SD ラット) | 8 | 2.70 | 2.84 | 95.1 |
| | 16 | 1.56 | 1.57 | 99.4 |
| | 32 | 1.03 | 0.95 | 108.4 |
| 血漿 (SD ラット) (EDTA) | 8 | 3.21 | 3.08 | 104.2 |
| | 16 | 1.74 | 1.70 | 102.3 |
| | 32 | 0.89 | 0.81 | 109.9 |

(2) 添加回収試験

| 検体 | 理論値 (ng/mL) | 測定値 (ng/mL) | % |
|-------------------------------|-------------|-------------|------|
| 培地 (10%FCS 添加 RPMI-1640) (x8) | 1.25 | 1.23 | 98.4 |
| | 0.63 | 0.59 | 93.7 |
| | 0.31 | 0.27 | 87.1 |
| 血清 (SD ラット) (x8) | 3.46 | 3.01 | 87.0 |
| | 2.84 | 2.50 | 88.0 |
| | 2.52 | 2.30 | 91.3 |
| 血漿 (SD ラット) (EDTA) (x8) | 3.75 | 3.64 | 97.1 |
| | 3.12 | 2.99 | 95.8 |
| | 2.81 | 2.69 | 95.7 |

(3) 同時再現性

| 測定値 (ng/mL) | SD 値 | CV 値 (%) | n |
|-------------|------|----------|----|
| 2.15 | 0.09 | 4.2 | 24 |
| 1.10 | 0.05 | 4.5 | 24 |
| 0.24 | 0.01 | 4.2 | 24 |

(4) 測定間再現性

| 測定値 (ng/mL) | SD 値 | CV 値 (%) | n |
|-------------|------|----------|---|
| 2.19 | 0.10 | 4.6 | 9 |
| 1.12 | 0.05 | 4.5 | 9 |
| 0.24 | 0.01 | 4.2 | 9 |

(5) 特異性

| 測定物質 | 交差率 |
|------------------------|---------|
| Rat N-ERC/Mesothelin | 100 % |
| Human N-ERC/Mesothelin | ≦ 0.1 % |
| Rat MCP-1 | ≦ 0.1 % |
| Rat TNF-α | ≦ 0.1 % |
| Rat Osteopontin | ≦ 0.1 % |

(6) 感度

0.01 ng/mL

本キットの感度は、NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)の評価方法に従い求めました。(National Committee for Clinical Laboratory Standards Evaluation Protocols, SC1, (1989) Villanova, PA : NCCLS 参照)

11. 使用上または取り扱い上の注意

- 1 保存は、2~8°Cとしてください。使用前に全ての試薬は常温に戻してください。
- 2 標準物質は、凍結乾燥品です。開封は、十分注意しゆっくりとおこなってください。
- 3 停止液は強酸性 (1N 硫酸) です。衣服 皮膚等への接触および廃棄には十分注意してください。
- 4 使用後の抗体プレートや試薬は、多量の水で洗い流してから廃棄してください。
- 5 標識抗体濃縮液は、まれに析出を認める場合がありますが、性能に問題はありません。
- 6 構成試薬には動物血液成分を含む物があります。取り扱いに注意し使用後は手洗いなどをおこなってください。
- 7 ロットが異なる製品の構成試薬や他のキットの構成試薬を混ぜたり、交換して使用することは避けてください。
- 8 有効期限切れの試薬は、使用しないでください。
- 9 本キットは、研究用試薬です。診断等に用いることはできません。

12. 保存方法および有効期限

2~8°C 保存

使用期限は外箱に記載

13. 包装単位および製品番号

96 Well

製品番号 27765

14. 参考文献

1. Hino O, Kobayashi E, Nishizawa M, Kubo Y, Kobayashi T, Hirayama Y, Takai S, Kikuchi Y, Tsuchiya H, Orimoto K, et al. Renal carcinogenesis in the Eker rat. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1995;121(9-10):602-5.
2. Yamashita Y, Yokoyama M, Kobayashi E, Takai S, Hino O. Mapping and determination of the cDNA sequence of the Erc gene preferentially expressed in renal cell carcinoma in the Tsc2 gene mutant (Eker) rat model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Aug 18;275(1):134-40.
3. Robinson BW, Creaney J, Lake R, Nowak A, Musk AW, de Klerk N, Winzell P, Hellstrom KE, Hellstrom I. Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet*. 2003 Nov 15;362(9396):1612-6.
4. Scholler N, Fu N, Yang Y, Ye Z, Goodman GE, Hellström KE, Hellström I. Soluble member(s) of the mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family are detectable in sera from patients with ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28;96(20):11531-6.
5. Robinson BW, Creaney J, Lake R, Nowak A, Musk AW, de Klerk N, Winzell P, Hellstrom KE, Hellstrom I. Soluble mesothelin-related protein--a blood test for mesothelioma. *Lung Cancer*. 2005 Jul;49 Suppl 1:S109-11.
6. Hassan R, Bera T, Pastan I. Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):3937-42.
7. Onda M, Willingham M, Nagata S, Bera TK, Beers R, Ho M, Hassan R, Kreitman RJ, Pastan I. New monoclonal antibodies to mesothelin useful for immunohistochemistry, fluorescence-activated cell sorting, Western blotting, and ELISA. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5840-6.
8. Hassan R, Remaley AT, Sampson ML, Zhang J, Cox DD, Pingpank J, Alexander R, Willingham M, Pastan I, Onda M. Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 15;12(2):447-53.
9. Shiomi K, Miyamoto H, Segawa T, Hagiwara Y, Ota A, Maeda M, Takahashi K, Masuda K, Sakao Y, Hino O. Novel ELISA system for detection of N-ERC/mesothelin in the sera of mesothelioma patients. *Cancer Sci*. 2006 Sep;97(9):928-32.
10. Maeda M, Hino O. Molecular tumor markers for asbestos-related mesothelioma: serum diagnostic markers. *Pathol Int*. 2006 Nov;56(11):649-54.
11. Nakaishi M, Kajino K, Ikesue M, Hagiwara Y, Kuwahara M, Mitani H, Horikoshi-Sakuraba Y, Segawa T, Kon S, Maeda M, Wang T, Abe M, Yokoyama M, Hino O. Establishment of the enzyme-linked immunosorbent assay system to detect the amino terminal secretory form of rat Erc/Mesothelin. *Cancer Sci*. 2007 May;98(5):659-64.
12. Kuwahara M, Takeda M, Takeuchi Y, Kuwahara M, Harada T, Maita K. Transforming growth factor beta production by spontaneous malignant mesothelioma cell lines derived from Fisher 344 rats. *Virchows Arch*. 2001 May;438(5):492-7.
13. Tsuchiya H, Tsuchiya Y, Kobayashi T, Kikuchi Y, Hino O. Isolation of genes differentially expressed between the Yoshida sarcoma and long-survival Yoshida sarcoma variants: origin of Yoshida sarcoma revisited. *Jpn J Cancer Res*. 1994 Nov;85(11):1099-104.
14. Hino O, Shiomi K, Maeda M. Diagnostic biomarker of asbestos-related mesothelioma: Example of translational research. *Cancer Sci*. 2007 Aug;98(8):1147-51.
15. Hagiwara Y, Hamada Y, Kuwahara M, Maeda M, Segawa T, Ishikawa K, Hino O. Establishment of a novel specific ELISA system for rat N- and C-ERC/mesothelin. Rat ERC/mesothelin in the body fluids of mice bearing mesothelioma. *Cancer Sci*. 2008 Apr;99(4):666-70.

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所 営業部

〒370-0831 群馬県高崎市あら町 5-1

TEL 027-310-8040 FAX 027-310-8045

Version 1.3