

Human Osteopontin N-Half Assay Kit - IBL

96Well

1. はじめに

Osteopontin (OPN) は、もとは骨から分離された分泌性糖タンパク質です。現在では、骨芽細胞、腎臓細管細胞、マクロファージ、活性化されたT細胞および血管平滑筋細胞を含む多くの細胞によって分泌される高酸性、カルシウム結合性、糖鎖結合のリン酸化蛋白質として知られています。その分子量は、糖鎖形成とリン酸化に依存し、44kDa から 66 kDa の範囲で報告されています。

OPN の一つの重要な特徴は、Arg-Gly-Asp (RGD)アミノ酸シーケンスを含むことです。このモチーフはフィブロネクチン、ビトロネクチンおよび他の細胞外タンパク質に存在しており、このモチーフを介して $\alpha v \beta 3$ のような細胞表面受容体の integrin ファミリーメンバーに結合することが知られています。

もう一つの重要な特徴は、OPN が RNA スプライシング、糖化、リン酸化、硫酸化およびプロテアーゼ分解等を受けることで、生体内で様々な分子形式として存在することです。OPN は創傷、炎症、血管新生、および腫瘍組織などの局所でトロンピンと共存することが予想されており、その結果、蛋白質分解を生じ易く、このプロセスは生理学上重要である可能性があります。ある報告では、トロンピン処理が OPN の細胞接着効果を増強することが実証されました。このことはトロンピンによる OPN の開裂が、隠れた接着部位の配列を露出することを示唆しています。また、トロンピンにより開裂した OPN 断片が $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンに反応することが報告されています。さらに、OPN は多くの細胞結合部位を有し種々の受容体と反応することから、これらの相互作用が別の機能を果たしているかもしれません。

本キットはトロンピンにより分解された OPN の N 末端側の分子 (以下 OPN N-Half と呼びます) を特異的に測定出来るキットです。また、本キットではトロンピン分解を受けていない OPN 分子はほとんど検出されません。

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、プレートに固相化されていますので、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、Human OPN N-Half の量に比例します。

3. 測定範囲

6.25 ~ 400 pmol/L

4. 使用目的

- 本製品はヒト EDTA 採血血漿、尿、関節液および培養上清中の OPN N-Half を定量できます。OPN 自身は非常に不安定なタンパク質です。測定するまでの検体保存は -80°C にておこなってください。室温放置や凍結融解の繰り返しにより測定値が低下しますので注意が必要です。
- ヒト EDTA 血漿中の OPN N-Half を測定できます。検体はあらかじめ希釈用緩衝液もしくは PBS で希釈することをおすすめします。希釈の目安は約 2~8 倍です。
ただし、健康人血漿中の OPN N-Half は多くの場合微量にしか存在しない事が確認されており、本キットでの測定では感度以下となることが予想されます。
- 血清を検体にした場合は、正確な測定値が得られない場合があります。ヒト OPN 中には、トロンピン開裂部位が存在しますので、血清を検体とすることはおすすめしません。
- ヒト尿中の OPN N-Half を測定できます。検体はあらかじめ希釈用緩衝液もしくは PBS で希釈することをおすすめします。希釈の目安は約 5~10 倍です。尿検体は、分解しやすいので PMSF (protease inhibitor) 等を添加することをおすすめします。また、採取後すぐに測定できない場合は -80°C 以下に保存してください。凍結融解の繰り返しにより測定値が低下しますので注意が必要です。尿中ヒト OPN 量は、尿量と反比例するという報告があります。測定の際はクレアチニン補正をすることをおすすめします。
- ヒト由来培養細胞上清液中の OPN N-Half を測定できます。測定可能な希釈率は対象培養細胞の発現量により異なりますので各施設で決定してください。
- 組み換え体、自然体どちらのヒト OPN N-Half も測定可能です。

5. 構成試薬

1	抗体プレート (抗 OPN N-Half (34E3) Mouse IgG MoAb A.P.固相)	96 Well x 1
2	標識抗体濃縮液 (30 倍濃度 HRP 標識 抗 Human OPN (O-17) Rabbit IgG Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3	標準物質 (Recombinant Human OPN N-Half)	0.5mL x 2
4	希釈用緩衝液*	30mL x 1
5	標識抗体用溶解液*	12mL x 1
6	TMB 基質液	15mL x 1
7	停止液*	12mL x 1
8	濃縮洗浄液*	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
恒温器 ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)	冷蔵庫 (4°C として)
PBS	採取用容器 (清潔な試験管など)

(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

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

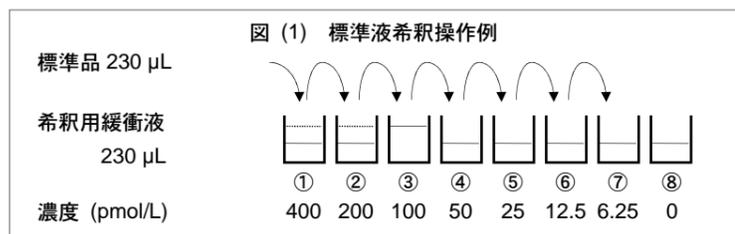
標準物質のバイアル瓶に精製水を 0.5 mL 加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は 800 pmol/L となります。

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

400 pmol/L, 200 pmol/L, 100 pmol/L, 50 pmol/L, 25 pmol/L, 12.5 pmol/L, 6.25 pmol/L, 0 pmol/L の表示をします。

400 pmol/L の希釈用テストチューブに 800 pmol/L の標準物質溶液を 230 μL 加え混和しその溶液 230 μL を 200 pmol/L 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 400 pmol/L から 6.25 pmol/L までの 7 点を希釈標準品と 0 pmol/L 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もしくは PBS にて希釈し測定してください。

(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を確かめてください。

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 ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。*
- 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 ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。*
- 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				
4 回 (洗浄液 350 μL 以上)*				
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				
5 回 (洗浄液 350 μL 以上)*				
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 450nm 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

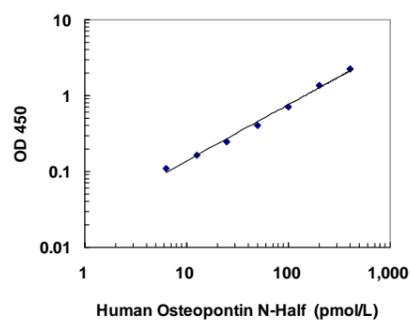
- 1 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。
- 2 検体は必要に応じて希釈用緩衝液または PBS にて希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定することをおすすめいたします。
- 4 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 5 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 6 洗浄液は、プレートを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。
- 9 尿検体は、分解しやすいので PMSF (protease inhibitor) 等を添加することをおすすめします。また、採取後すぐに測定できない場合は -80°C 以下に保存してください。凍結融解の繰り返しにより測定値が低下しますので注意が必要です。
- 10 血漿は、EDTA 採血とし採取後すぐに測定できない場合は -80°C 以下に保存してください。凍結融解の繰り返しにより測定値が低下しますので注意が必要です。

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 Human-OPN N-Half 濃度を取り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取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 (pmol/L)	吸光度 (450nm)
400	2.313
200	1.437
100	0.775
50	0.469
25	0.303
12.5	0.225
6.25	0.169
0 (検体ブランク)	0.059



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 (pmol/L)	理論値 (pmol/L)	%
尿 (健康人)	4	186.29	201.41	92.5
	8	100.70	100.00	100.7
	16	47.32	50.00	94.6
	32	25.23	25.00	100.9
	64	13.54	12.50	108.4
血漿 (EDTA) (健康人)	2	291.53	400.86	72.7
	4	189.64	200.36	94.6
	8	93.95	100.00	93.9
	16	46.23	50.00	92.5
	32	21.72	25.00	86.9
培地 (10%FCS 添加 TIL Media*)	2	299.45	400.00	74.9
	4	184.69	200.00	92.3
	8	96.99	100.00	97.0
	16	47.57	50.00	95.1
	32	25.82	25.00	103.3

(2) 添加回収試験

検体	理論値 (pmol/L)	測定値 (pmol/L)	%
尿 (健康人) (x10)	399.05	350.71	87.9
	249.05	230.54	92.6
	174.05	167.92	96.5
	136.55	132.25	96.9
	117.80	115.29	97.9
血漿 (EDTA) (健康人) (x4)	301.40	291.96	96.9
	151.40	161.79	106.9
	76.40	81.05	106.1
	38.90	37.73	97.0
	20.15	19.75	98.0
培地 (10%FCS 添加 TIL Media*) (x2)	300.00	260.89	87.0
	150.00	123.73	82.5
	75.00	59.15	78.9
	37.50	32.50	86.7
	18.75	18.50	98.7

※TIL Media : 株式会社 免疫生物研究所 Code No.33640

(3) 同時再現性

測定値 (pmol/L)	SD 値	CV 値 (%)	n
24.51	2.39	9.8	14
80.05	1.87	2.3	14
267.40	4.47	1.7	14

(4) 測定間再現性

測定値 (pmol/L)	SD 値	CV 値 (%)	n
21.76	3.08	14.2	14
83.82	3.42	4.1	14
304.02	15.18	5.0	14

(5) 感度

3.09 pmol/L

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をして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

96Well 製品番号 27258

15. 参考文献

1. Hasegawa M, Nakoshi Y, Iino T, Sudo A, Segawa T, Maeda M, Yoshida T, Uchida A. Thrombin-cleaved osteopontin in synovial fluid of subjects with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2009 Feb;36(2):240-5.

14. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所
〒375-0005 群馬県藤岡市中 1091-1
TEL 0274-22-2889 FAX 0274-23-6055

Version 2.

2016年10月更新*