

Rat Osteopontin Assay Kit - IBL

96 Well

ご使用の際はこの添付文書をよく読んでから使用してください。

全般的な注意

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。

形状 構造等 (キットの構成)

1 抗体プレート (Anti-Rat OPN(O-17) Rabbit IgG A.P. 固相)	96Well x 1
2 標識抗体濃縮液 (30 倍濃度) (HRP 標識 Anti-Rat OPN(O-165) Rabbit IgG Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3 標準物質 (Recombinant Rat OPN)	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

測定対象

ラットの EDTA 血漿、尿および培養上清

測定原理

本製品は、サンドイッチ法による ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent 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 次反応をおこないます。その後、HRP 標識された 2 次抗体を加え 2 次反応をおこない、反応後過剰の 2 次抗体を洗浄除去した後、Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させます。

操作上の注意

- Osteopontin (OPN)は非常に不安定なタンパク質です。採取後すぐに測定できない場合は-80℃以下に保存してください。融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。また、凍結融解の繰り返しはお勧めしません。凍結融解の繰り返しにより測定値は低下しますので注意が必要です。
- Rat 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勧めしません。また、ヘパリン結合部位も存在しますのでヘパリン血漿では正確な測定ができない可能性があります。
- EDTA 血漿および尿検体は、あらかじめ PBS で希釈することをお勧めします。希釈の目安は 10 倍ですが、測定範囲を超えた場合はさらに希釈し再検してください。
- ラットの種によっては尿中に全長の OPN が殆ど存在せず、原液でも検出感度以下となる場合があります。希釈は各施設で事前に検討されることをおすすめします。
- 尿中の OPN は分解しやすいので PMSF 等の protease inhibitor を添加することをお勧めします。
- 培養上清中の OPN の測定については測定可能な希釈は対象培養細胞の OPN 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。
- トロンピンで分解された Rat OPN は測定できません。
- 組み換え体、自然体どちらの Rat OPN も測定できます。
- 検体や標準物質は、二重測定することをお勧めします。
- 測定に当たってはその都度検量線を作成してください。
- 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。
- 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ことを確かめてください。
- 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。
- 洗浄ピンを用いて洗浄する場合は、洗浄液をウェルに満たし、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おこなってください。操作は洗浄むらのないよう十分注意しておこなってください。
- 洗浄液を捨てた後に、プレートをペーパータオルの上でたたいて、完全に水分を切ってください。この時ペーパータオルがウェルの中に入らないよう注意してください。
- 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。使用に際しては必要量を採取用容器にとり分けてください。
- 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。
- 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。

用法および用量 (操作方法)

- 必要な器具 器材**
プレートリーダー
希釈用テストチューブ
マイクロピペットおよびチップ
メスシリンダーおよびビーカー

精製水
ペーパータオル
恒温器 (37°C±1°C)
PBS (検体希釈用)

プレートウォッシャー
採取用容器 (清潔な試験管など)
冷蔵庫

2 準備

(1) 濃縮洗浄液の希釈方法

濃縮洗浄液を精製水で 40 倍希釈してください。これを洗浄液とします。必要量を調製してください。

(2) 標識抗体濃縮液の希釈方法

標識抗体濃縮液を別に用意した採取用容器にて、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。

(3) 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 9.5 ng/mL となります。

希釈用テストチューブを 7 本用意し希釈用緩衝液を 230 μL ずつ量り取ります。

4.75 ng/mL の希釈用テストチューブに 9.5 ng/mL の標準物質溶液を 230 μL 加え混和しその溶液 230 μL を 2.38 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 4.75 ng/mL~0.15 ng/mL までの 7 点を希釈標準品とします。

Tube-1	4.75 ng/mL
Tube-2	2.38 ng/mL
Tube-3	1.19 ng/mL
Tube-4	0.59 ng/mL
Tube-5	0.30 ng/mL
Tube-6	0.15 ng/mL
Tube-7	0.07 ng/mL

(4) 検体の希釈方法

EDTA 血漿および尿検体は 10 倍以上希釈し測定してください。

培養上清は 2 倍以上希釈し測定してください。

3 測定操作方法 (測定操作一覧 参照)

- 検体ブランクの添加
検体ブランクのウェルを設定し、希釈用緩衝液を 100 μL 入れます。
- 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 をそれぞれのウェルに入れます。
- プレートカバーをして第 1 反応
- 洗浄
ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。
- 標識抗体の添加
標識抗体を 100 μL 添加します。
- プレートカバーをして第 2 反応
- 洗浄
ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。
- TMB 基質液の添加
TMB 基質液を 100 μL 添加します。
- 遮光して発色反応
- 停止液の添加
停止液を 100 μL 添加します。
- 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、検体ブランクを対照とした検体および標準の吸光度を測定してください。

測定波長: 450 nm、

2 波長の場合は主波長: 450 nm、副波長: 600~650 nm

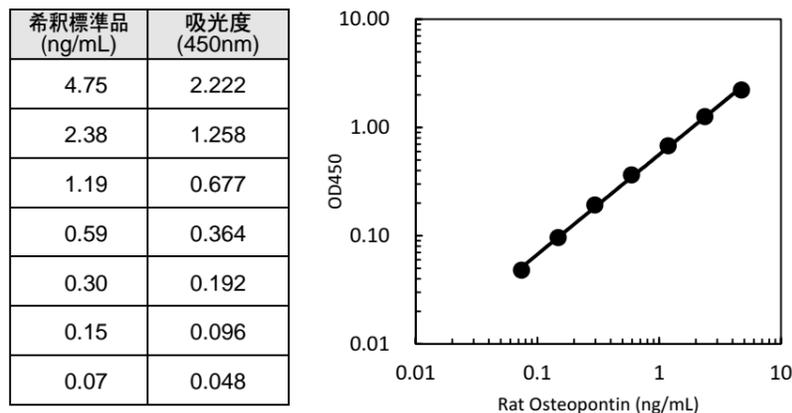
測定操作一覧

	検体	標準	検体ブランク
試料	検体 100 μL	希釈標準品 100 μL	希釈用緩衝液 100 μL
第 1 反応	プレートカバーをして 37°C 60 分間反応		
洗浄	4 回 (洗浄液 350 μL 以上)		
標識抗体	100 μL	100 μL	100 μL
第 2 反応	プレートカバーをして 2-8°C 30 分間反応		
洗浄	5 回 (洗浄液 350 μL 以上)		
TMB 基質液	100 μL	100 μL	100 μL
発色反応	遮光常温 30 分間反応		
停止液	100 μL	100 μL	100 μL
吸光度測定	450 nm / 600~650 nm		

測定結果の算出方法

1. グラフの X 軸に希釈標準品濃度を、Y 軸にその吸光度をプロットします。各プロットに適当な回帰曲線を当てはめ(例: 両対数変換の二次回帰等)、検量線を作成します。
2. 検体の吸光度を検量線に当てはめ、濃度を読みとります。
3. その値に検体の希釈倍率を乗じ、検体の濃度を算出します。

測定値と検量線作成例


性能
1 感度

0.01 ng/mL

2 測定範囲

0.07 ~ 4.75 ng/mL

3 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)	理論値 (ng/mL)	測定値 (ng/mL)	%
培地 (10%FCS 添加 RPMI-1640)	2	1.19	1.11	93.3
	4	0.60	0.59	98.3
	8	0.30	0.30	100.0
血漿 (ラット) (EDTA)	6	3.39	2.72	80.2
	12	1.71	1.78	104.1
	24	0.89	0.93	104.5
尿 (ラット)	1000	1.59	1.75	110.1
	2000	0.79	0.86	108.9
	4000	0.39	0.41	105.1

4 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) (x2)	1.19	0.98	82.4
	0.60	0.53	88.3
	0.30	0.26	86.7
血漿 (ラット) (EDTA) (x10)	2.76	2.26	81.9
	2.17	2.29	105.5
	1.87	2.15	115.0
尿 (ラット) (x1000)	1.60	1.62	101.3
	1.01	1.12	110.9
	0.71	0.78	109.9

5 同時再現性

測定値 (ng/mL)	SD 値 (ng/mL)	CV 値 (%)	n
3.11	0.10	3.2	23
0.72	0.04	5.6	23
0.22	0.01	4.5	23

6 測定間再現性

測定値 (ng/mL)	SD 値 (ng/mL)	CV 値 (%)	n
3.18	0.16	5.0	35
0.73	0.04	5.5	35
0.22	0.01	4.5	35

7 特異性

測定物質	交差率 (%)
Rat OPN	100
Human OPN	≤ 0.1
Mouse OPN	≤ 0.1

使用上または取り扱い上の注意
1 取り扱い上(危険防止)の注意

- (1) 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。
- (2) 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。

2 使用上の注意

- (1) 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。
- (2) 保存は、2~8°C としてください。
- (3) 希釈用緩衝液、標識抗体濃縮液および濃縮洗浄液は、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ぬ。
- (4) 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、交換したりして使用しないでください。
- (5) 期限切れの試薬は、使用しないでください。

3 廃棄上の注意

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。

貯蔵方法 有効期限

2~8°C 保存

使用期限は外箱に記載

包装単位および製品番号

96 Well

製品番号 27360

参考文献

1. Kim JH, Skates SJ, Uede T, Wong KK, Schorge JO, Feltmate CM, Berkowitz RS, Cramer DW, Mok SC. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA*. 2002 Apr 3;287(13):1671-9.
2. Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 6;96(14):8156-60.
3. Shijubo N, Uede T, Kon S, Nagata M, Abe S. Vascular endothelial growth factor and osteopontin in tumor biology. *Crit Rev Oncog*. 2000;11(2):135-46.
4. Chiba S, Rashid MM, Okamoto H, Shiraiwa H, Kon S, Maeda M, Murakami M, Inobe M, Kitabatake A, Chambers AF, Uede T. The role of osteopontin in the development of granulomatous lesions in lung. *Microbiol Immunol*. 2000;44(4):319-32.
5. Kon S, Maeda M, Segawa T, Hagiwara Y, Horikoshi Y, Chikuma S, Tanaka K, Rashid MM, Inobe M, Chambers AF, Uede T. Antibodies to different peptides in osteopontin reveal complexities in the various secreted forms. *J Cell Biochem*. 2000 Apr;77(3):487-98.
6. Takemoto M, Yokote K, Nishimura M, Shigematsu T, Hasegawa T, Kon S, Uede T, Matsumoto T, Saito Y, Mori S. Enhanced expression of osteopontin in human diabetic artery and analysis of its functional role in accelerated atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Mar;20(3):624-8.
7. Weiss JM, Renkl AC, Maier CS, Kimmig M, Liaw L, Ahrens T, Kon S, Maeda M, Hotta H, Uede T, Simon JC. Osteopontin is involved in the initiation of cutaneous contact hypersensitivity by inducing Langerhans and dendritic cell migration to lymph nodes. *J Exp Med*. 2001 Nov 5;194(9):1219-29.
8. Takahashi F, Takahashi K, Okazaki T, Maeda K, Ienaga H, Maeda M, Kon S, Uede T, Fukuchi Y. Role of osteopontin in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Mar;24(3):264-71.
9. Gang X, Ueki K, Kon S, Maeda M, Naruse T, Nojima Y. Reduced urinary excretion of intact osteopontin in patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2001 Feb;37(2):374-9.
10. Ohshima S, Yamaguchi N, Nishioka K, Mima T, Ishii T, Umeshita-Sasai M, Kobayashi H, Shimizu M, Katada Y, Wakitani S, Murata N, Nomura S, Matsuno H, Katayama R, Kon S, Inobe M, Uede T, Kawase I, Saeki Y. Enhanced local production of osteopontin in rheumatoid joints. *J Rheumatol*. 2002 Oct;29(10):2061-7.
11. Ohshima S, Kobayashi H, Yamaguchi N, Nishioka K, Umeshita-Sasai M, Mima T, Nomura S, Kon S, Inobe M, Uede T, Saeki Y. Expression of osteopontin at sites of bone erosion in a murine experimental arthritis model of collagen-induced arthritis: possible involvement of osteopontin in bone destruction in arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002 Apr;46(4):1094-101.
12. Kon S, Yokosaki Y, Maeda M, Segawa T, Horikoshi Y, Tsukagoshi H, Rashid MM, Morimoto J, Inobe M, Shijubo N, Chambers AF, Uede T. Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences. *J Cell Biochem*. 2002;84(2):420-32.
13. Shijubo N, Uede T, Kon S, Maeda M, Segawa T, Imada A, Hirasawa M, Abe S. Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Oct;160(4):1269-73.
14. Yumoto K, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Tsuchiya Y, Kon S, Nifuji A, Uede T, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 2;99(7):4556-61.
15. Koguchi Y, Kawakami K, Kon S, Segawa T, Maeda M, Uede T, Saito A. Penicillium marneffei causes osteopontin-mediated production of interleukin-12 by peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun*. 2002 Mar;70(3):1042-8.

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

電話 : 0274-22-2889

FAX : 0274-23-6055