

Rat DMP1 Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

Dentin Matrix Protein 1(DMP1)は、Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein (SIBLING)ファミリーに属する、骨細胞外マトリックスの構成タンパク質の一つです。全長 105kDa の前駆タンパク質として合成され、分泌過程において、37kDa の N 端側と 57kDa の C 端側に分割されます。多数の酸性ドメインを持っており、組織内で負に荷電する特性によりカルシウムと結合し、骨石灰化に重要な役割を担っています。また、オステオポンチン、オステオカルシン、骨シアロプロテインといった、他の細胞外マトリックス構成タンパク質が骨芽細胞で発現しているのに対し、DMP1 は骨細胞で発現しています。骨の主要構成細胞である骨細胞は、破骨細胞と骨芽細胞の活性を制御し、骨再形成を調節しており、また、FGF-23 を分泌する内分泌細胞としても働いています。血中 DMP1 は、骨細胞の活性を反映するバイオマーカー候補と考えられており、骨代謝およびリン酸代謝の研究に、有用な情報となる可能性が示唆されています。

本キットは、ラットの血中 DMP1 濃度を定量することができます。

2. 原理および測定方法

本製品は、サンドイッチ法による 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。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た後、Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させます。この発色は、ラット DMP1 の量に比例します。

3. 測定範囲

39.06 ~ 2500 pg/mL

4. 使用目的

ラットの血清、EDTA-血漿および細胞培養上清中のラット DMP1 を測定できます。正常ラット血清および血漿検体の希釈の目安は 40 倍です。

5. 構成試薬

1 抗体プレート(抗 Rat DMP1 (90) Rabbit IgG A.P. 固相)	96Well x 1
2 標識抗体濃縮液 (30 倍濃度) HRP 標識抗 Rat DMP1 (149) Rabbit IgG Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3 標準物質 (Recombinant Rat DMP1)	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
冷蔵庫	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 1950mL 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)

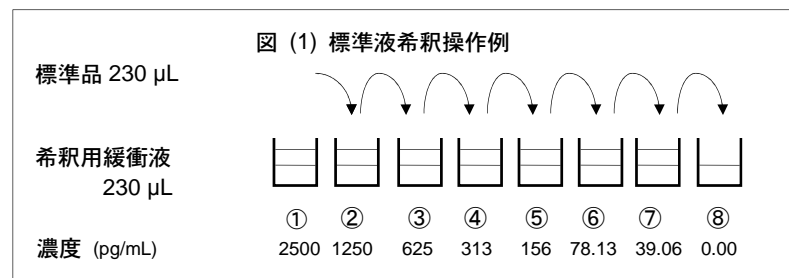
1 スリット (8 ウェル) 使用する場合=800 μL 必要(最低量)
(標識抗体濃縮液を 30 μL とり、標識抗体用溶解液 870 μL を加え良く混和し、100 μL ずつ使用します。)

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 5000 pg/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 ずつ取り取ります。各々のテストチューブに 2500 pg/mL, 1250 pg/mL, 625 pg/mL, 313 pg/mL, 156 pg/mL, 78.13 pg/mL, 39.06 pg/mL, 0.00 pg/mL の表示をします。2500 pg/mL の希釈用テストチューブに 5000 pg/mL の標準物質溶液を 230 μL 加え混和しその溶液 230 μL を 1250 pg/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 2500 pg/mL~39.06 pg/mL までの 7 点を希釈標準品とし、0.00 pg/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測定してください。正常ラット血清および血漿検体の希釈の目安は 40 倍です。

(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こと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作成してください。

抗体プレートで以下の操作をおこないます。

- 1 ブランクの添加 (以降図 (2) 参照)
試薬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。
- 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 をそれぞれのウェルに入れます。
- 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 2-8°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 2-8°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 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

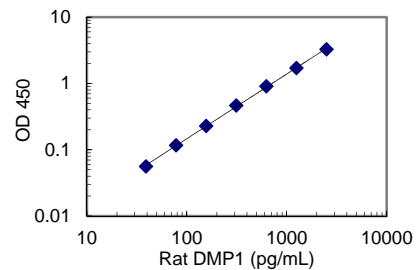
- 1 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。
- 2 検体は必要に応じて希釈用緩衝液で希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定をおすすめします。
- 4 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 5 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 6 洗浄後は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完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。
- 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

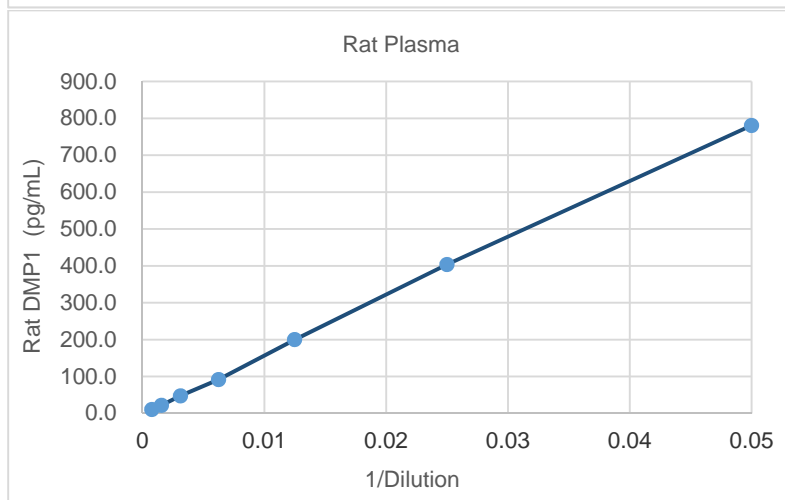
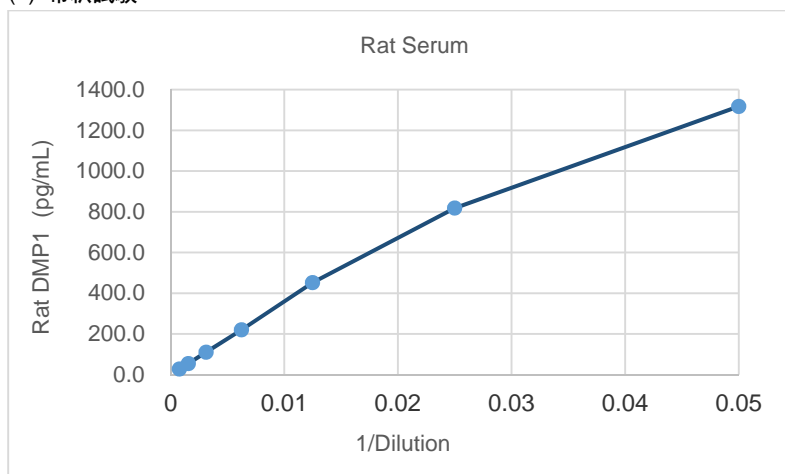
標準品濃度 (pg/mL)	吸光度 (450nm)
2500	3.270
1250	1.708
625	0.908
313	0.468
156	0.231
78.13	0.119
39.06	0.059
0.00 (検体ブランク)	0.003



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



(2) 添加回収試験

検体	理論値 (pg/mL)	測定値 (pg/mL)	%
ラット血清 (40倍)	959	889	92.7
	881	839	95.2
	842	764	90.7
ラット血漿 (EDTA) (40倍)	538	487	90.5
	460	424	92.2
	421	386	91.8
培地 (10%FBS添加) (2倍)	315	314	99.9
	159	155	97.5
	80.34	77.64	96.6

(3) 同時再現性

測定値 (pg/mL)	SD (pg/mL)	CV (%)	n
1049	59.39	5.7	24
307	13.64	4.5	24
81.54	3.74	4.6	24

(4) 測定間再現性

測定値 (pg/mL)	SD (pg/mL)	CV (%)	n
1110	36.36	3.3	8
319	13.29	4.2	8
87.70	5.31	6.1	8

(5) 特異性

測定物質	交差率
Rat DMP1	100%
Human DMP1	N.D.
Mouse DMP1	N.D.

(6) 感度

4.04 pg/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 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、交換したりして使用しないでください。
- 8 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 27363

14. 参考文献

1. Sato S, Hashimoto J, Usami Y, Ohyama K, Isogai Y, Hagiwara Y, Maruyama N, Komori T, Kuroda T, Toyosawa S. Novel sandwich ELISAs for rat DMP1: age-related decrease of circulatory DMP1 levels in male rats. *Bone*. 2013 Dec;57(2):429-36. doi: 10.1016/j.bone.2013.09.013. Epub 2013 Sep 26.
2. Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N, Komori T. Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2001 Nov;16(11):2017-26.
3. Qin C, Brunn JC, Cook RG, Orkiszewski RS, Malone JP, Veis A, Butler WT. Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *J Biol Chem*. 2003 Sep 5;278(36):34700-8. Epub 2003 Jun 17.
4. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 19;280(2):460-5.
5. Dallas SL, Bonewald LF. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Mar;1192:437-43. doi: 10.1111/j.1749-632.2009.05246.x. Review.

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

Version 2.

2017年3月更新*