

Tenascin-C Large (FNIII-B) Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

テネイシン C (Tenascin-C) は細胞外マトリックス糖タンパク質の一種で、4つのドメインから成る分子量 210~400 kDa のサブユニットで構成されています。このサブユニットには N 末側から TA ドメイン、続いて Epidermal Growth Factor 様配列が繰り返されるドメイン (EGF 様ドメイン) があり、さらにフィブロネクチンタイプ III (FNIII) 繰り返しドメインと続き、C 末にはフィブリノーゲン様ドメインがあります。FNIII 繰り返しドメインには選択的スプライシングを受ける領域があり、分子量の異なる多種のバリエーションをつくり出しています。このサブユニットが N 末付近のコイル状部位でより合わさり 3 量体を形成し、さらにこの 3 量体が S-S 結合によって結合して 6 量体となり組織に存在していると言われています。

低分子量バリエーションが正常組織にも恒常的に存在するのに対し、このテネイシン C 高分子量バリエーションは、がんを始めとしてさまざまな病変組織で特異的に発現していると言われています。

本製品は、固相抗体として、高分子量バリエーションの FNIII 繰り返しドメイン中に挿入されるドメイン B (FNIII-B) にエпитープを有するモノクローナル抗体を用い、標識抗体として、全てのバリエーションに定常的に存在する EGF 様ドメインにエпитープを有するモノクローナル抗体を用いることにより、FNIII-B を含むサブユニットを持つテネイシン C 高分子量バリエーションを特異的に測定できます。

* 製品名の「Large」は高分子量バリエーションを表現したものです。

関連製品

| 製品番号 | 製品名 | 容量 |
|-------|--|---------|
| 27767 | Tenascin-C Large (FNIII-B) Assay Kit - IBL | 96 Well |
| 27751 | Human Tenascin-C Large (FNIII-C) Assay Kit - IBL | 96 Well |

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。この発色は、FNIII-B を含むテネイシン C 高分子量バリエーションの量に比例します。

固相抗体: Anti-Tenascin-C (4C8MS) Mouse IgG MoAb: この抗体はヒト、マウス、ラットの テネイシン C 高分子量バリエーションに挿入される FNIII-B に反応します。

標識抗体: Anti-Tenascin-C (4F10TT) Mouse IgG Fab'-HRP: この抗体はテネイシン C の全てのバリエーションに定常的に存在する EGF 様ドメインに反応します。

3. 測定範囲

0.20 ~ 12.5 ng/mL

4. 使用目的

- マウス、ラットおよびヒト血清中の、FNIII-B を含むテネイシン C 高分子量バリエーションを測定できます。
- マウス、ラットおよびヒト EDTA 採血血漿中の、FNIII-B を含むテネイシン C 高分子量バリエーションを測定できます。
- 血液検体はあらかじめ希釈用緩衝液で希釈することをおすすめします。希釈の目安は約 400 から 1,600 倍希釈です。(希釈用緩衝液が足りない場合は PBS をご使用ください。希釈用緩衝液の追加購入も承ります)
- 培養細胞上清液中の FNIII-B を含むテネイシン C 高分子量バリエーションを測定できます。本キットはウシ胎仔血清中のテネイシン C にも交差するため、無血清培地での測定を推奨いたします。(止むを得ずウシ胎仔血清添加培養液にて測定する場合は陰性コントロールをおいて測定値から差し引いてください)

5. 構成試薬

| | | |
|---|--|------------|
| 1 | 抗体プレート (抗 Tenascin-C (4C8MS) 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 Tenascin-C (4F10TT) Mouse IgG Fab' A.P.) | 0.4mL x 1 |
| 3 | 標準物質 (Purified Human Tenascin-C) | 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ピッカー |
| 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°C±1°C) | 採取用容器 (清潔な試験管など) |
| 冷蔵庫 (4°C として) | PBS (検体希釈用) |

(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。

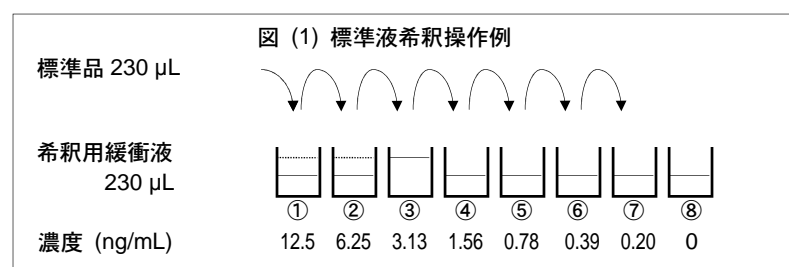
標準物質の希釈方法

標準物質のバイアル瓶に精製水を 0.5mL 加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は 25 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

12.5 ng/mL, 6.25 ng/mL, 3.13 ng/mL, 1.56 ng/mL, 0.78 ng/mL, 0.39 ng/mL, 0.20 ng/mL, 0 ng/mL の表示をします。

12.5 ng/mL の希釈用テストチューブに 25 ng/mL の標準物質溶液を 230 μL 加え混和しその溶液 230 μL を 6.25 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 12.5 ng/mL~0.20 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

| 試料 | 検体 100 μL | 標準 希釈標準品 100 μL | 検体ブランク 希釈用緩衝液 100 μL | 試薬ブランク 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 |
| プレートをつ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します。

- 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。
- 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。
- 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。
- 吸光度測定は、停止液添加後 30 分以内におこなってください。

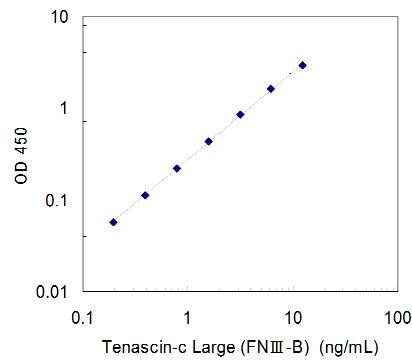
8. 測定結果の算出方法

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 (ng/mL) | 吸光度 (450nm) |
|---------------|-------------|
| 12.5 | 2.940 |
| 6.25 | 1.639 |
| 3.13 | 0.862 |
| 1.56 | 0.458 |
| 0.78 | 0.241 |
| 0.39 | 0.136 |
| 0.20 | 0.081 |
| 0 (検体ブランク) | 0.025 |



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) | % |
|------------------------|----------|-------------|-------------|-------|
| 血清 (SD ラット) | 400 | 1.99 | 2.17 | 91.7 |
| | 800 | 1.02 | 1.13 | 90.3 |
| | 1,600 | 0.52 | 0.55 | 94.5 |
| 血漿 (EDTA) (SD ラット) | 400 | 2.37 | 2.57 | 92.2 |
| | 800 | 1.24 | 1.30 | 95.4 |
| | 1,600 | 0.64 | 0.63 | 101.6 |
| 血清 (Balb/c マウス) | 400 | 3.31 | 3.39 | 97.6 |
| | 800 | 1.64 | 1.73 | 94.8 |
| | 1,600 | 0.79 | 0.86 | 91.9 |
| 血漿 (EDTA) (Balb/c マウス) | 400 | 3.19 | 3.27 | 97.6 |
| | 800 | 1.57 | 1.65 | 95.2 |
| | 1,600 | 0.77 | 0.80 | 96.3 |
| 培地 (RPMI-1640) | 2 | 6.24 | 6.25 | 99.8 |
| | 4 | 2.85 | 3.13 | 91.1 |
| | 8 | 1.31 | 1.56 | 84.0 |
| 血清 (健康人) | 400 | 2.12 | 2.31 | 91.8 |
| | 800 | 1.04 | 1.16 | 89.7 |
| | 1,600 | 0.55 | 0.58 | 94.8 |
| 血漿 (EDTA) (健康人) | 400 | 2.03 | 2.11 | 96.2 |
| | 800 | 1.04 | 1.03 | 101.0 |
| | 1,600 | 0.50 | 0.52 | 96.2 |

(2) 添加回収試験

| 検体 | 理論値 (ng/mL) | 測定値 (ng/mL) | % |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------|
| 血清 (SD ラット) (×400) | 2.85 | 2.78 | 97.5 |
| | 2.07 | 2.06 | 99.5 |
| | 1.68 | 1.64 | 97.6 |
| 血漿 (EDTA) (SD ラット) (×400) | 2.50 | 2.35 | 94.0 |
| | 2.11 | 2.03 | 96.2 |
| | 1.91 | 1.91 | 100.0 |
| 血清 (Balb/c マウス) (×800) | 2.69 | 2.40 | 89.2 |
| | 1.90 | 1.74 | 91.6 |
| | 1.51 | 1.39 | 92.1 |
| 血漿 (EDTA) (Balb/c マウス) (×800) | 2.57 | 2.29 | 89.1 |
| | 1.79 | 1.64 | 91.6 |
| | 1.40 | 1.31 | 93.6 |
| 培地 (RPMI-1640) (×2) | 6.25 | 6.21 | 99.4 |
| | 3.13 | 2.84 | 90.7 |
| | 1.56 | 1.49 | 95.5 |
| 血清 (健康人) (×400) | 7.81 | 7.51 | 96.2 |
| | 3.12 | 2.96 | 94.9 |
| | 1.75 | 1.72 | 98.3 |
| 血漿 (EDTA) (健康人) (×400) | 7.75 | 7.05 | 91.0 |
| | 3.06 | 2.84 | 92.8 |
| | 1.69 | 1.65 | 97.6 |

(3) 同時再現性

| 測定値 (ng/mL) | SD 値 | CV 値 (%) | n |
|-------------|------|----------|----|
| 5.43 | 0.35 | 6.4 | 24 |
| 1.21 | 0.08 | 6.6 | 24 |
| 0.30 | 0.03 | 10.0 | 24 |

(4) 測定間再現性

| 測定値 (ng/mL) | SD 値 | CV 値 (%) | n |
|-------------|------|----------|---|
| 6.55 | 0.23 | 3.5 | 3 |
| 1.38 | 0.09 | 6.8 | 3 |
| 0.31 | 0.03 | 8.8 | 3 |

(5) 感度

44 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

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 有効期限切れの試薬は、使用しないでください。
- 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 27767

14. 参考文献

- Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn*. 2000 Jun; 218(2):235-59.
- Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yasutomi Y, Toyozaki T, Tsuchiya T, Noda N, Maki T, Nishikawa T, Sakakura T, Yoshida T. Tenascin-C is a useful marker for disease activity in myocarditis. *J Pathol*. 2002 Jul; 197(3):388-94.
- Sato M, Toyozaki T, Odaka K, Uehara T, Arano Y, Hasegawa H, Yoshida K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Hiroe M, Tadokoro H, Irie T, Tanada S, Komuro I. Detection of experimental autoimmune myocarditis in rats by 111In monoclonal antibody specific for tenascin-C. *Circulation*. 2002 Sep 10;106(11):1397-402.
- Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Nishikawa T, Ishiyama S, Shimajo T, Ohta Y, Sakakura T, Yoshida T. Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Lab Invest*. 2001 Jul; 81(7):1015-24.
- Yoshida T, Matsumoto E, Hanamura N, Kalembeiyi I, Katsuta K, Ishihara A, Sakakura T. Co-expression of tenascin and fibronectin in epithelial and stromal cells of benign lesions and ductal carcinomas in the human breast. *J Pathol*. 1997 Aug; 182(4):421-8.
- Tsunoda T, Inada H, Kalembeiyi I, Imanaka-Yoshida K, Sakakibara M, Okada R, Katsuta K, Sakakura T, Majima Y, Yoshida T. Involvement of large tenascin-C splice variants in breast cancer progression. *Am J Pathol*. 2003 Jun; 162(6):1857-67.
- Sato A, Aonuma K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Isobe M, Kawase D, Kinoshita N, Yazaki Y, Hiroe M. Serum tenascin-C might be a novel predictor of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Jun 6; 47(11):2319-25.
- Tanaka H, El-Karef A, Kaito M, Kinoshita N, Fujita N, Horiike S, Watanabe S, Yoshida T, Adachi Y. Circulating level of large splice variants of tenascin-C is a marker of piecemeal necrosis activity in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2006 Apr; 26(3):311-8.
- Hasegawa M, Sudo A, Nagakura T, Hirata H, Kinoshita N, Yoshida T, Uchida A. Tenascin-C levels in pseudosynovial fluid of loose hip prostheses. *Scand J Rheumatol*. 2005 Nov-Dec; 34(6):464-8.
- Morimoto S, Imanaka-Yoshida K, Hiramitsu S, Kato S, Ohtsuki M, Uemura A, Kato Y, Nishikawa T, Toyozaki T, Hishida H, Yoshida T, Hiroe M. Diagnostic utility of tenascin-C for evaluation of the activity of human acute myocarditis. *J Pathol*. 2005 Mar; 205(4):460-7.
- Hasegawa M, Hirata H, Sudo A, Kato K, Kawase D, Kinoshita N, Yoshida T, Uchida A. Tenascin-C concentration in synovial fluid correlates with radiographic progression of knee osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2004 Oct; 31(10):2021-6.
- Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T. Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease: multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling. *Histol Histopathol*. 2004 Apr; 19(2):517-25.
- Hanamura N, Yoshida T, Matsumoto E, Kawarada Y, Sakakura T. Expression of fibronectin and tenascin-C mRNA by myofibroblasts, vascular cells and epithelial cells in human colon adenomas and carcinomas. *Int J Cancer*. 1997 Sep 26; 73(1):10-5.

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

Version 2.

2016年12月更新*