

製品コード MK107

研究用

---

# Takara

## Laminin E1A Kit

---

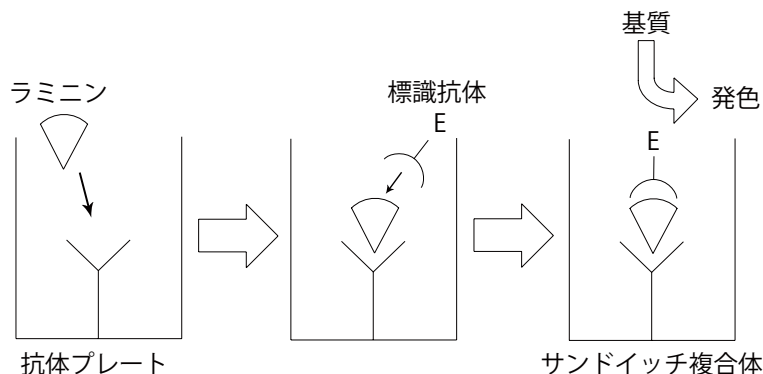
説明書

v201606Da

ラミニン (LN) は基底膜を構成する高分子糖蛋白質でその生理活性は、細胞接着、伸展、細胞間信号伝達、正常細胞および癌細胞を含めた細胞増殖、細胞分化誘導、癌細胞転移、などというように多岐にわたっています。ラミニンの構造は、3つの異なるサブユニットからなりそれぞれがジスルフィド結合で結ばれ、電子顕微鏡によると十字架構造をとっているのが観察されます。各ラミニン鎖の名称は、1994年にBurgesonらにより新命名法が提案され、A鎖は $\alpha$ 1、B1鎖は $\beta$ 1鎖、B2鎖は $\gamma$ 1鎖と呼ばれ、 $\alpha$ 鎖で5種類、 $\beta$ 鎖で3種類、 $\gamma$ 鎖で2種類同定され、それらの組み合わせから、すでに11種類のラミニンが見出されています。これらラミニンはコラーゲン、ヘパリン、プロテオグリカンその他の成分と結合しあって、基底膜構造を形成しています。

ラミニンは種々の培養細胞より産生されることがわかってきましたが、特に浸潤性の高い癌細胞からラミニンレセプターが単離されたことから<sup>5)</sup>、癌細胞の転移成立のためには基底膜ラミニンへの接着が第一の転移ステップと思われる。転移が進行すると基底膜破壊が起こり、血中にラミニンが放出されることから、疾患による基底膜の分解の程度を示唆するマーカーとしてラミニンが注目され始めました。その後、血中のみならずフラグメント化したラミニンが尿中に排出されていることが見いだされ<sup>14)</sup>、なお一層高感度な測定系が求められました。本キットはラミニン $\gamma$ 1鎖(旧B2鎖)を認識するモノクローナル抗体を使用しています。体液中のラミニンを測定するために構築され、完全体のラミニンはもちろんのことフラグメント化したラミニンを捕捉・定量するのにも適した測定系で、操作法も迅速で簡便です。測定対象としてヒト・ウサギ検体が可能です。ウシ抗原とは交差反応しませんので、牛胎児血清を含む培地で培養した細胞の上清をそのまま測定サンプルとして用いることができます。

## I. 測定原理



## II. キットの内容

- |  |           |
|--|-----------|
| (1) Antibody Coated Microtiterplate<br>抗ラミニンモノクローナル抗体コーティングプレート<br>96 ウェル (8 ウェル× 12 strips) | 1 plate   |
| (2) Antibody-POD Conjugate (凍結乾燥品)<br>ペルオキシダーゼ標識抗 HLN モノクローナル抗体                              | 11 ml 用   |
| (3) Standard (凍結乾燥品)<br>ラミニン含有標準物質 320 ng  | 1 ml 用    |
| (4) Sample Diluent<br>25% ブロックエース含有 PBS 含防腐剤   | 11 ml × 2 |
| (5) Substrate Solution (TMBZ)<br>3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン溶液                                     | 12 ml     |

---

### III. キット以外に必要な試薬や器具（主なもの）

- ・ Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid（製品コード MK021）  
洗浄液成分（10 × PBS；50 ml × 5 本、Tween 20；3 ml）と反応停止液（60 ml）\*のセットです。  
\*：本品は、1N 硫酸を含まないペルオキシダーゼ反応停止液です。
- ・ 反応停止液として 1N 硫酸も使用できます。  
1N 硫酸の取扱いには充分にご注意ください。  
<ご注意> 1N 硫酸は腐食性があり、皮膚に接触するとただれ等を起こすことがあります。手や粘膜についた場合は、ただちに多量の水で洗い流し、医師の指示に従ってください。
- ・ ピペット、マイクロピペットおよびチップ
- ・ マイクロプレートリーダー（450 nm 設定で吸光度 3.5 まで測定可能なもの）

### IV. 保存 4℃

### V. 使用目的

ヒト、ウサギの培養細胞上清中および尿、血液中に含まれる完全体およびフラグメント化したラミニンの定量。

注：本キットは研究用です。人や動物の臨床診断には使用できません。

### VI. 使用方法

#### 1. 検体の調製方法

検体は測定時に調製するようにする。12 時間を過ぎて測定する場合は凍結保存する。ヒト血清および血漿検体の場合では、検体を（4）Sample Diluent を用いて 6 倍から 10 倍に希釈して測定するのが適当である。溶血血液サンプルは、高値となるので注意する。使用する抗凝固剤及び採血条件は後述するデータを参照して選択する。ヒト尿検体の場合は異常高値を除いては、原液で測定できる。ただし、いずれもクレアチニン補正が必要となる。潜血尿は高値となるので注意する。

---

## 2. 試薬の調製

- 抗体プレート (1) Antibody Coated Microtiterplate  
使用前に室温に戻してから開封する。
- 標識抗体液  
(2) Antibody-POD Conjugate を蒸留水 11 ml で溶解する。溶解後は 4℃ で 1 週間安定である。それ以上保存する場合は -20℃ で凍結保存する。この場合 1 ヶ月安定であるが、凍結融解は 1 回が限度である。
- ラミネン標準液  
(3) Standard に蒸留水 1 ml を加えて溶解し、ラミネン標準液を調製する (320 ng/ml)。これを (4) Sample Diluent で段階希釈して、160、80、40、20、10、5 ng/ml の各濃度の標準液を調製する。0 濃度は Sample Diluent を用いる。希釈した標準液はその日のうちに使用する。溶解した標準液 (320 ng/ml) は -80℃ 保存で 1 ヶ月間安定であるが、凍結融解は 1 回が限度である。
- 基質液 (5) Substrate Solution (TMBZ)  
反応に用いる前に室温に戻し、そのまま使用する。使用前に基質液が濃い青い色に変色していないことを確認する。金属イオンと反応すると呈色する恐れがあるので、特に水道水が混入しないように注意する。数回に分けて使用する場合は、あらかじめ必要量を取り分けるようにする。
- 反応停止液 (Stop Solution) \*  
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) の Stop Solution をそのまま用いる。  
\* : 粘度の高い溶液であるため、投入後プレートミキサー等で十分に攪拌してください。
- 洗浄用 0.1% Tween 20 含有 PBS  
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) の 10 × PBS 1 本 (50 ml) を蒸留水で 500 ml に希釈し、さらに Tween 20 を 500 μl 添加する。十分に混合後、洗浄用バッファー (0.1% Tween 20/PBS) として使用する。

## 3. 操作法

- 測定は二重測定で行う。
  - キット中の各試薬ならびにサンプルは使用前に室温に戻し、泡立てないように混和し、液を均一にしてから用いる。
1. 各濃度のラミネン標準液およびサンプルをマイクロピペットで 96 ウェル抗体プレートの各ウェルに 100 μl ずつ 2 連で加え、室温 (20 ~ 30℃) で 1 時間反応させる。この場合、サンプルをあらかじめ別の 96 ウェルプレートに用意しておき、8 連ピペットなどで速やか (5 分以内) に抗体プレートに投入する。プレート内の測定値の信頼性を高めるためにも、1 列目と 12 列目の両方に標準液の希釈系列をおくと良い。(第一反応)
  2. 反応液を捨て、0.1% Tween 20 含有 PBS で 3 回洗浄後、8 連ピペットなどを用いて標識抗体液を各ウェルに 100 μl ずつ加え、室温 (20 ~ 30℃) で 1 時間反応させる。(第二反応)
  3. 反応液を捨て、0.1% Tween 20 含有 PBS で 4 回洗浄後、8 連ピペットなどを用いて (5) Substrate Solution (TMBZ) を各ウェルに 100 μl ずつ加え、室温 (20 ~ 30℃) で 10 ~ 15 分間反応させる。(第三反応)
  4. Substrate Solution (TMBZ) を加えた順番で Stop Solution を各ウェルに 100 μl ずつ加えて反応を止めた後、よく混合する。
  5. マイクロプレートリーダーを用いて波長 450 nm の吸光度を測定する。発色は反応停止後 1 時間まで安定である。
  6. グラフ用紙の横軸に各ヒトラミネン標準液の濃度を、縦軸に対応する吸光度をプロットして標準曲線を作成し、検体の吸光度から対応するラミネン濃度を読みとる。

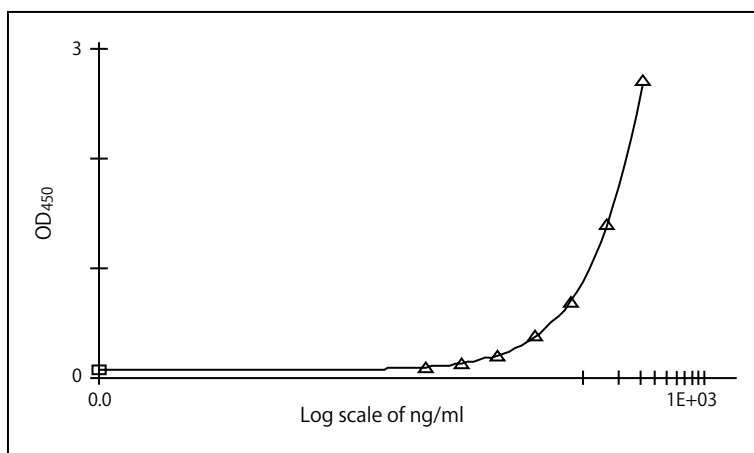
## VII. 性能

### 1. 標準曲線 (Laminin EIA Kit)

下記の標準曲線は代表的な一例である。正確な結果を得るためには、測定ごとに標準曲線を作成してください。

最少検出感度 5.0 ng/ml

Curve Fit : 4-Parameter Corr. Coeff : - 1.00  
 $y = (A - D) / \{1 + (x/C)^B\} + D$   
 A = 0.0787      B = 1.15      C = 1.10E + 03      D = 13.6



HLN 濃度 (ng/ml)	320	160	80	40	20	10	5	0
A450 nm	2.712	1.418	0.700	0.385	0.215	0.145	0.104	0.075

(発色時間 : 15 分)

### 2. 再現性

<同時再現性>

現性ヒト血清を希釈して作製した 3 種類の濃度コントロールを用いて再現性試験を実施した。

検体 (n = 16)	平均値 (ng/ml)	標準偏差 (ng/ml)	C.V. 値 (%)
コントロール A	121.3	6.3	5.2
コントロール B	36.6	1.5	4.0
コントロール C	11.0	0.6	5.7

<日差再現性>

3 日にわたり 3 種類の濃度コントロールを定量し、再現性試験を実施した。

検体 (n = 3)	平均値 (ng/ml)	標準偏差 (ng/ml)	C.V. 値 (%)
コントロール A	120.4	2.9	2.4
コントロール B	36.8	0.12	0.3
コントロール C	10.4	0.54	5.1

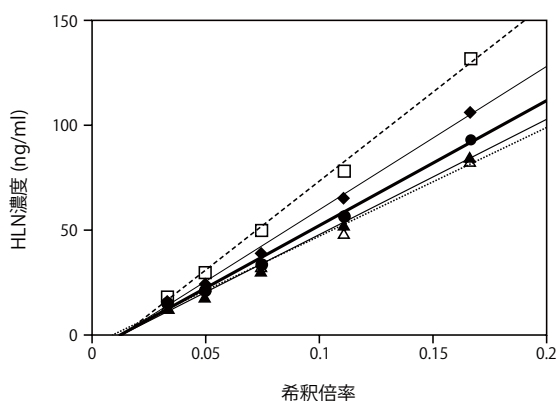
### 3. 添加回収試験

異なる濃度のサンプルを等量ずつ混合して得られた測定値と理論値とから回収率を算出した。

サンプル A (ng/ml)	サンプル B (ng/ml)	A + B 実測値 (ng/ml)	A + B 理論値 (ng/ml)	回収率 (%)
198.6	0.0	103.0	99.3	103.7
198.6	198.6	200.0	198.6	100.7
198.6	97.3	145.4	148.0	98.3
198.6	45.6	121.8	122.1	99.8
198.6	26.9	110.8	112.8	98.3
198.6	9.8	104.1	104.2	99.9
97.3	0.0	50.7	48.7	104.2
97.3	97.3	96.9	97.3	99.6
97.3	45.6	71.4	71.5	99.9
97.3	26.9	56.4	62.1	90.8
97.3	9.8	51.4	53.6	96.0
45.6	0.0	25.1	22.8	110.1
45.6	45.6	46.1	45.6	101.1
45.6	26.9	35.8	36.3	98.8
45.6	9.8	30.7	27.7	110.8
26.9	0.0	13.3	13.5	98.9
26.9	26.9	24.4	26.9	90.7
26.9	9.8	18.1	18.4	98.6

### 4. 希釈直線性

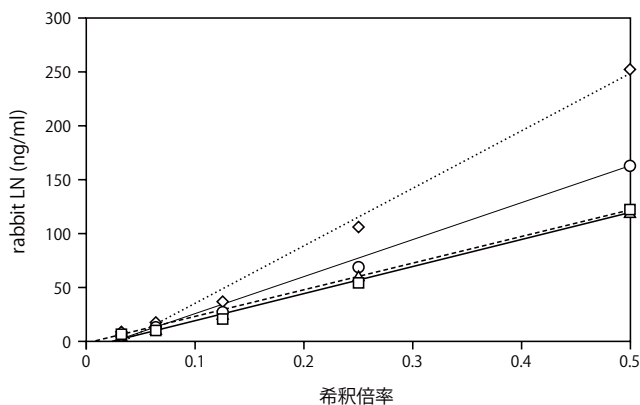
5種類のアヒ血清検体を用いて希釈直線を示した。まずサンプル 150  $\mu$ l に Sample Diluent 750  $\mu$ l を加え 6 倍希釈とする。その検体液 300  $\mu$ l に Sample Diluent 150  $\mu$ l を加えて 1.5 倍ずつの段階希釈をし、それぞれの測定値をプロットした。



● no.1	$y = 593.187x - 7.681$	$r = 0.997$
◆ no.2	$y = 682.517x - 9.374$	$r = 0.998$
△ no.3	$y = 515.298x - 5.146$	$r = 0.994$
▲ no.4	$y = 545.773x - 7.669$	$r = 0.998$
□ no.5	$y = 851.807x - 12.321$	$r = 0.998$

## 5. 各種抗凝固剤のちがいによる測定値の比較と希釈直線（正常ウサギ例）

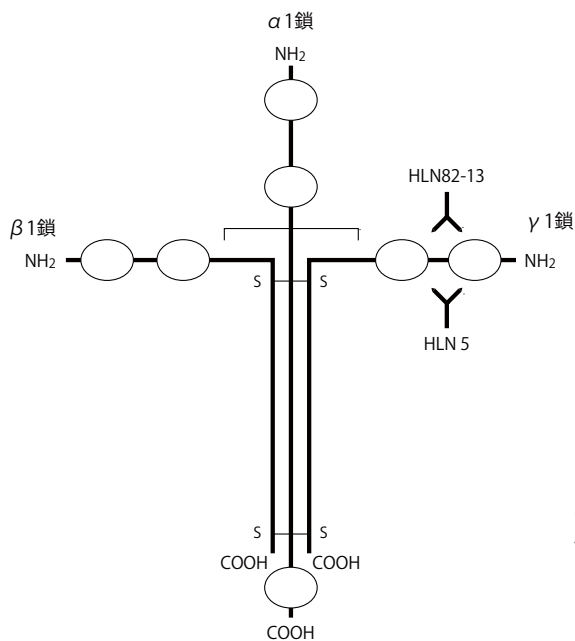
同一ウサギ（日本白色種 10 週齢 雄）で抗凝固剤を変えて同時採血した血液サンプルを 2 倍から 2 段階希釈した場合の希釈直線を示している。



□ クエン酸	$y = 248.571x - 4.988$	$r = 0.997$
◇ EDTA.2Na	$y = 530.374x - 19.094$	$r = 0.996$
○ ヘパリン	$y = 339.691x - 9.358$	$r = 0.997$
△ 血清	$y = 244.382x - 2.177$	$r = 0.999$

## VIII. 測定に関する基本資料

### 1. 抗体の特異性



固相抗体 HLN82-13・標識抗体 HLN5 の認識部位は  $\gamma 1$  鎖の N 末端から分子量 42 kDa までのところに存在することが、尿中ラミニン抗原を単離し配列解析を行なった結果、明らかになった。<sup>14)</sup>

## 2. 尿中 HLN の定量例

### 個人の尿中ラミニンの日差変動

- \* ラミニン (ULN)、フィブロンネクチン (UFN) 測定には尿の原液を使用している。
- \* E-カドヘリン (UEcad) 測定には 9 倍希釈した尿を使用している。
- \* 採尿時間は昼間の随時尿
- \* 従来キット (製品コード MK015、MK007、MK017 ; 終売) 使用。さらに、クレアチニン (Cr) も同時測定

		ULN (ng/ml)	Cr (g/l)	ULN/Cr ( $\mu$ g/g.Cr)	UFN/Cr ( $\mu$ g/g.Cr)	UEcad (/Cr) (mg/g.Cr)
1. female	day 1	75.6	1.264	59.8	76.8	2.82
	day 2	42.5	1.004	42.3	66.2	3.66
	day 3	36.1	0.605	59.7	75.4	4.33
	day 4	94.8	1.514	62.6	134.4	2.69
	day 5	81.6	2.346	34.8	57.5	3.42
	day 6	93.1	1.915	48.6	48.9	4.20
	day 7	87.3	1.313	66.5	99.8	3.89
	day 8	61.4	0.483	127.2	106.6	6.08
2. female	day 1	41.0	1.182	34.7	19.7	1.11
	day 2	64.2	2.045	31.4	17.6	0.59
	day 3	30.3	1.594	19.0	10.7	0.49
	day 4	66.8	1.565	42.7	21.4	0.20
	day 5	48.4	1.814	26.7	9.1	0.40
	day 6	63.5	2.562	24.8	20.1	0.22
	day 7	55.6	2.031	27.4	7.4	0.23
	day 8	60.8	1.579	38.5	14.8	0.33
3. male	day 1	54.3	1.195	45.4	58.5	0.73
	day 2	9.6	0.403	23.9	0.0	0.17
	day 3	61.5	1.016	60.5	56.4	0.86
	day 4	64.0	1.397	45.8	78.9	0.93
	day 5	16.8	0.422	39.9	5.7	1.37
	day 6	43.3	0.561	77.2	18.2	0.14
	day 7	53.4	1.466	36.4	21.6	1.17
	day 8	52.5	0.645	81.4	42.9	1.61

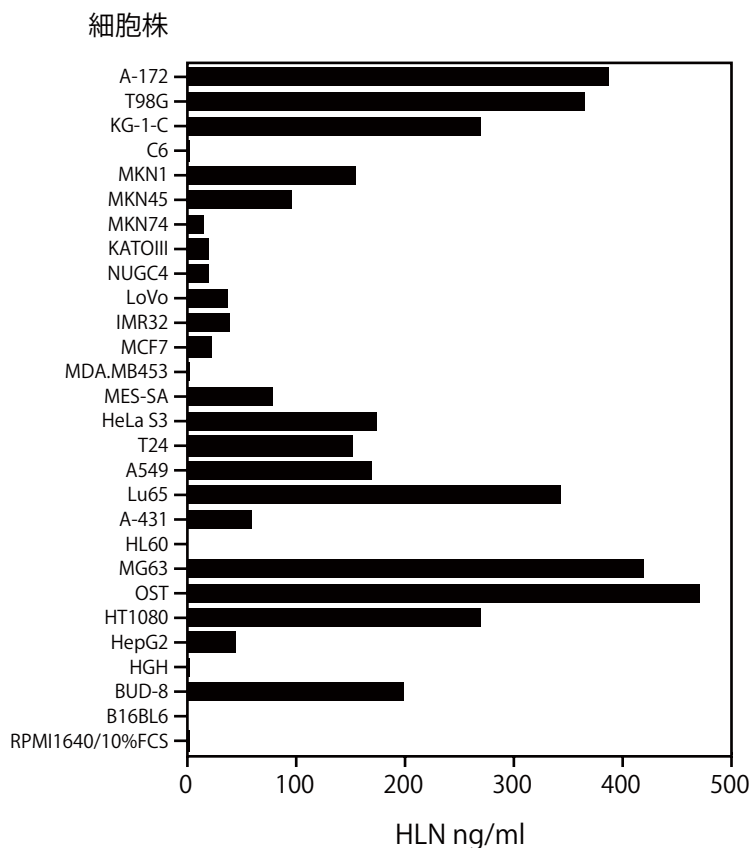
### 個人の 1 日のラミニンおよびその他尿中蛋白質の総排泄量

	尿量 (ml)	ULN Cr (ng/ml)	Cr (g/l)	ULN/Cr (g/l)	UFN/Cr ( $\mu$ g/g.Cr)	UEcad (/Cr) (mg/g.Cr)
4. male	270	114.8	1.760	65.2	113.4	0.40
	525	54.2	1.100	49.3	172.6	0.26
	70	101.7	1.489	68.3	44.7	1.04
	570	36.0	0.897	40.1	12.5	0.47
5. female	80	83.3	1.331	62.6	13.1	0.94
	100	135.0	1.441	93.7	28.0	0.80
	180	59.7	1.478	40.4	15.1	0.58
	200	52.8	0.974	54.2	46.8	1.52
	180	77.8	1.466	53.1	26.2	0.63
6. male	350	22.6	0.584	38.7	40.8	0.85
	470	11.8	0.481	24.6	24.3	1.32
	370	27.7	0.676	41.0	17.9	0.53
	180	62.5	1.548	40.4	49.5	0.50
	130	79.2	1.890	41.9	15.9	0.31
7. male	250	94.7	1.718	55.1	35.3	1.04
	150	117.8	2.759	42.7	53.9	1.47
	160	89.2	1.579	56.5	72.6	2.43
	175	163.9	2.400	68.3	59.1	1.43
	175	118.6	1.844	64.3	51.6	1.33



### 3. 培養上清中の HLN の定量例

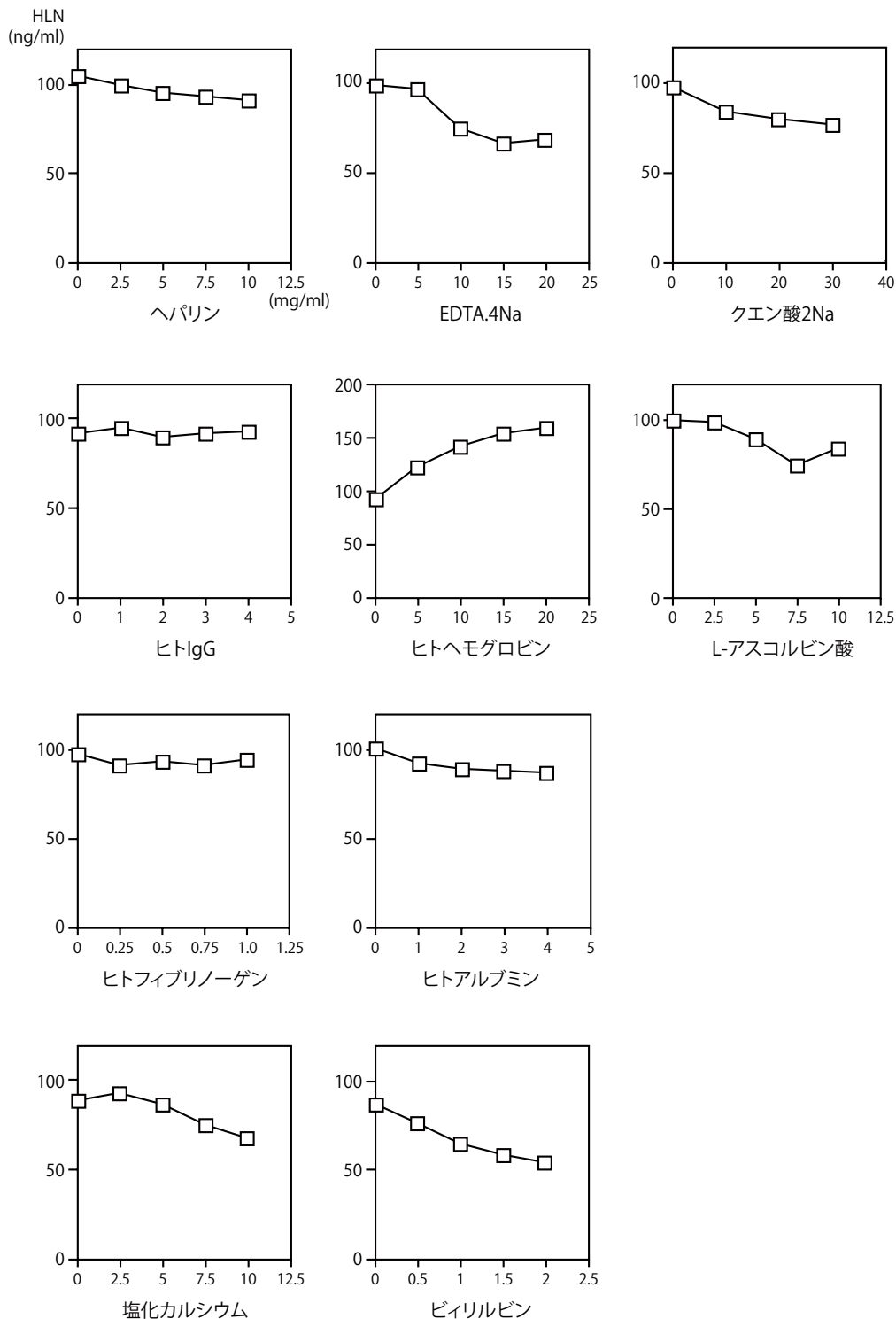
各種細胞株を血清培地で培養後、各々の上清中の HLN を本キットを用いてを測定した。本キットによる測定は、ウシ胎児血清の存在下でも妨害されない。



A-172	: ヒトグリア芽細胞腫	T24	: ヒト膀胱癌
T98G	: ヒトグリア芽細胞腫	A549	: ヒト肺癌
KG-1-C	: ヒトグリオーマ	Lu65	: ヒト肺癌
C6	: ラットグリオーマ	A-431	: ヒト類表皮癌
MKN1	: ヒト胃癌	HL60	: ヒト白血病細胞
MKN45	: ヒト胃癌	MG63	: ヒト骨肉腫
MKN74	: ヒト胃癌	OST	: ヒト骨肉腫
KATOIII	: ヒト胃癌	HT1080	: ヒト線維肉腫
NUGC4	: ヒト胃癌	HepG2	: ヒト肝癌
LoVo	: ヒト結腸線癌	HGH	: ヒト心臓細胞
IMR32	: ヒト神経芽腫	BUD-8	: ヒト正常皮膚細胞
MCF7	: ヒト乳癌	B16BL6	: マウスメラノーマ
MDA.MB453	: ヒト乳癌	RPMI1640/10% FCS	: 培地ブランク
MES-SA	: ヒト子宮癌		
HeLa S3	: ヒト子宮癌		

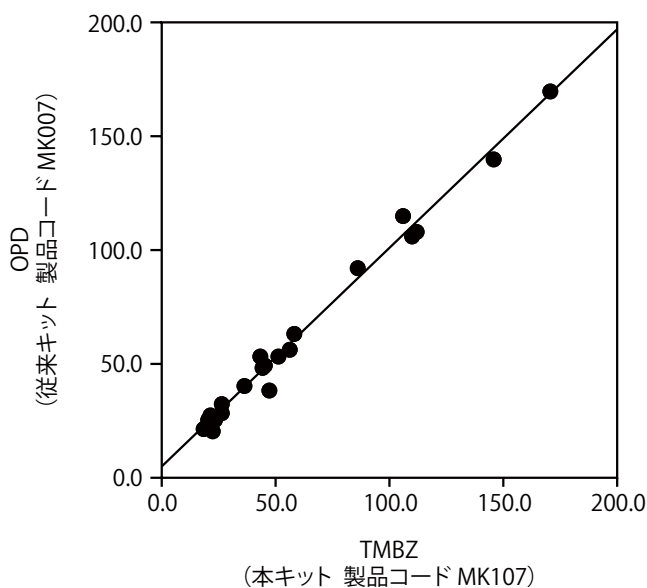
#### 4. 共存物質の影響

サンプル4容量に対して供試物質1容量を加え、測定系に与える影響を調べた。グラフ内の供試物質濃度は終濃度で表されている。溶血血清は系に影響を及ぼすことが予想されるので注意が必要である。



## 5. 従来キットとの相関性

従来の用時調製タイプのキット（製品コード MK007；終売）と本キット（製品コード MK107）を用いて血清検体 22 例を測定した。



相関性データ  $y = 0.960x + 4.404$   $r = 0.995$

## IX. 参考文献

- 1) Kleinman, H. K. *et al.* (1985) *J Cell Biochem.* **27**, 317.
- 2) Burgeson, R. *et al.* (1994) *Matrix Biology.* **14**, 209-211.
- 3) Beck, K. *et al.* (1990) *FASEB J.* **4**, 148.
- 4) Timpl, R. (1989) *Eur J Biochem.* **180**, 487.
- 5) Rao, C. N. *et al.* (1989) *Biochemistry.* **28**, 7476-7486.
- 6) Sonnenberg, A. *et al.* (1988) *Nature.* **336**, 487.
- 7) Timpl, R. *et al.* (1979) *J Biol Chem.* **254**, 9933.
- 8) Wewer, U. *et al.* (1983) *J Biol Chem.* **258**, 12654.
- 9) Alitalo, K. *et al.* (1980) *Cell.* **19**, 1053.
- 10) Kropf, J. *et al.* (1988) *Clin Chem.* **34**, 2026.
- 11) Niemelä, O. *et al.* (1985) *Eur J Clin Invest.* **15**, 132.
- 12) Kropf, J. *et al.* (1991) *Clin Chem.* **37**, 30.
- 13) Brocks, D. G. *et al.* (1986) *Clin Chem.* **32**, 787.
- 14) Katayama, M. *et al.* (1992) *Br J Cancer.* **65**, 509-514.

## X. 関連製品

Anti-Human Laminin, Monoclonal (Clone LN82-13) (製品コード M020)

## XI. 使用上の注意

1. ロット番号の異なるキット及び試薬を混ぜて使用しないでください。
2. 保存もしくは反応中に試薬を強い光に当てないでください。
3. (5) Substrate Solution (TMBZ) および Stop Solution に用いるピペット等は金属が使われていないものを用いてください。
4. (5) Substrate Solution (TMBZ) や Stop Solution は皮膚や粘膜につかないようご注意ください。
5. 着色した (5) Substrate Solution (TMBZ) は使用しないでください。
6. 各反応は時間、温度の影響を受けますので測定ごとに標準曲線を作成してください。
7. 血液検体の取扱いには充分注意してください。

## XII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

---

**タカラバイオ株式会社**