

製品コード MK111

研究用

Takara

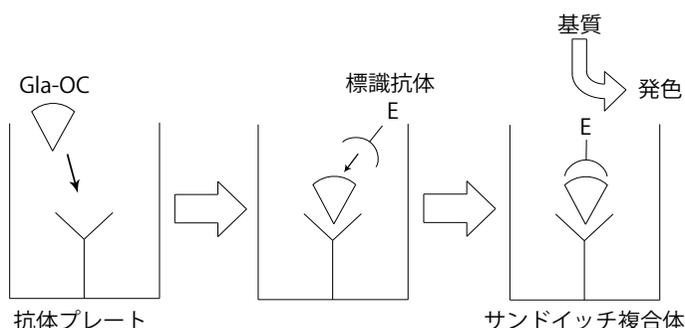
**Gla type Osteocalcin (Gla-OC)
EIA Kit**

説明書

v201606Da

オステオカルシンは骨中に存在する分子量約 5,900 の非コラーゲン性タンパク質であり、刺激を受けた骨芽細胞により合成されて血中に放出されることが知られています。骨中のオステオカルシンは局所の石灰化調節をしたり、骨一体液間の Ca^{2+} の動きを制御するといった骨代謝において重要な生理的役割を果たしていると考えられています。血中には様々なオステオカルシンの存在様式（インタクトおよびフラグメント）があるとの報告¹⁾がされており、本キットはヒドロキシアパタイトに結合できる（いわば生理活性を有する）Gla 残基含有オステオカルシン（Gla-OC）のみを特異的に測定できるキットです。

I. 測定原理



II. キットの内容

(1) Antibody Coated Microtiterplate 抗 Gla-OC モノクローナル抗体 (96 ウェル：8 ウェル× 12 strips)	1 plate
(2) Antibody-POD Conjugate ペルオキシダーゼ標識抗 OC モノクローナル抗体（凍結乾燥品）	11 ml 用
(3) Standard Gla 型オステオカルシン 全長合成ペプチド 16 ng（凍結乾燥品）	1 ml 用
(4) Sample Diluent ブロックエース粉末含有 PBS 含防腐剤	11 ml×2
(5) Substrate Solution (TMBZ) 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、ウシ、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、サルの血清中、培養上清・培養抽出液中の Gla 型オステオカルシン (Gla-OC) の測定。

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

- ・ 検体は血清、培養上清および培養抽出液を用いる。
- ・ ウシ血清など動物血清が添加された培養上清および培養抽出液は、測定が妨害されるため、無血清培養細胞抽出液、無血清培養上清を用いる。
ウシ血清含有培地で培養したヒト由来の培養サンプルの場合は、Human Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK128) の使用をお勧めする。
- ・ 血液サンプルの場合は、血清の使用をお勧めする。
- ・ EDTA 血漿の使用は避けてください。
- ・ 検体は 2 ~ 10°C に保存し、12 時間を過ぎて測定をする場合は凍結保存する。
- ・ 高値が予想される血液検体を含む測定の場合、(4) Sample Diluent を用いてすべての検体を 2 ないし 3 倍希釈し測定することをお勧めする。

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°C で 1 週間安定である。それ以上保存する場合は - 20°C 凍結し、1 ヶ月安定である。ただし、凍結は一度までにとどめる。
- ・ Gla-OC 標準液
(3) Standard に蒸留水 1 ml を加え溶解し、Gla-OC 標準液 (16 ng/ml) を調製する。
これを (4) Sample Diluent で用時段階希釈して、8.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25 ng/ml の各濃度の標準液を調製しておく。0 濃度は (4) Sample Diluent を用いる。
Gla-OC 標準液 (16 ng/ml) は - 20°C 保存で 1 ヶ月安定である。ただし、凍結は一度までにとどめる。
- ・ 基質液 (5) Substrate Solution (TMBZ)
反応に用いる前に室温にもどしそのまま使用する。使用前に基質液が濃い青色に変色していないか確認する。金属イオンと反応すると呈色するおそれがあるので、特に水道水が混入しないよう注意する。
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 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、十分に混合後、洗浄用 PBS として使用する。
(注) 本キットでは Wash and Stop Solution for ELISA (製品コード MK021) に含まれている Tween 20 は使用しません。

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もどし、泡立てないように混和し、液を均一にしてから用いる。

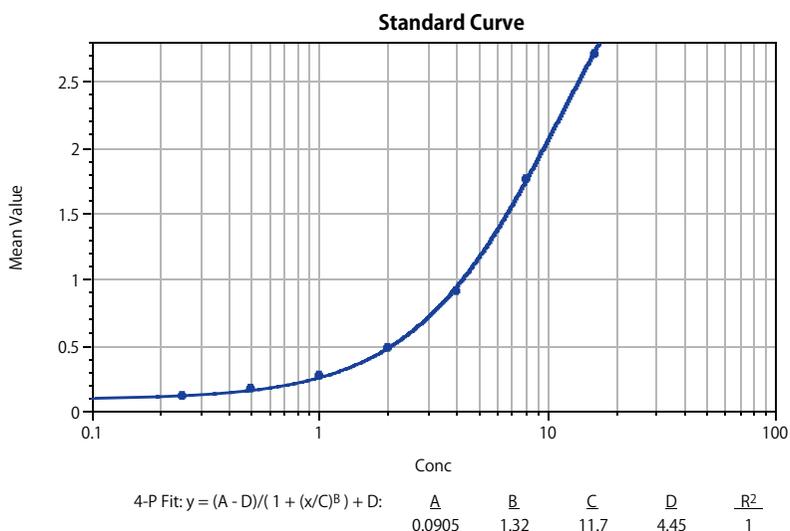
1. 各濃度の Gla-OC 標準液および検体を 100 μl ずつマイクロピペットで各ウェルに 2 連ずつ加え、室温 (20 ~ 30°C) で 2 時間反応する。サンプルはあらかじめ別の 96 ウェルプレートを利用して用意し、8 連ピペット等ですみやかに (5 分以内) 投入する。プレート内の測定値の信頼性を高めるためにも、1 列目と 12 列目とに標準液の希釈系列をおくとよい。37°C の加温は抗原をそこなう恐れがあるので室温反応にとどめること。(第一反応)
2. 反応液を捨て、PBS で 3 回洗浄後、標識抗体液を 100 μl ずつ 8 連ピペットで各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30°C) で 1 時間反応させる。(第二反応)
3. 反応液を捨て、PBS で 4 回洗浄後、(5) Substrate Solution (TMBZ) を 100 μl ずつ 8 連ピペットで各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30°C) で 10 ~ 15 分間反応させる。(第三反応)
4. 反応停止液を 100 μl ずつ、(5) Substrate Solution (TMBZ) を入れた順番に各ウェルに加え反応を停止させた後よく混和する。
5. 蒸留水を対照としてゼロ調節し、波長 450 nm で吸光度を測定する。発色は反応停止後 1 時間までは安定である。
6. グラフ用紙の横軸に各 Gla-OC 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 Gla-OC 濃度を読み取る。

VII. 性能

1. 標準曲線 (Gla-OC 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 0.5 ng/ml



Gla-OC 濃度 (ng/ml)	16.00	8.00	4.00	2.00	1.00	0.50	0.25	0.00
A450	2.713	1.759	0.916	0.481	0.277	0.173	0.117	0.088

(発色時間：15 分)

2. 再現性

<同時再現性試験>

ウシ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)	CV 値 (%)
コントロール A	12.00	0.40	3.3
コントロール B	1.48	0.04	3.0
コントロール C	0.60	0.03	4.8

<日差再現性試験>

三日間にわたり3種類の濃度コントロールの定量を実施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)	CV 値 (%)
コントロール A	12.10	0.12	1.0
コントロール B	1.49	0.01	0.7
コントロール C	0.62	0.02	2.4

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実測値と理論値とから回収率を算出した。

サンプル A	サンプル B	A + B 実測値	A + B 理論値	回収率 (%)
11.10	0.00	5.40	5.55	97
11.10	11.10	11.10	11.10	100
11.10	5.41	8.43	8.25	102
11.10	2.28	7.08	6.69	106
11.10	1.09	6.30	6.09	103
11.10	0.68	5.63	5.89	96
5.41	0.00	2.47	2.70	91
5.41	5.41	5.41	5.41	100
5.41	2.28	3.97	3.84	103
5.41	1.09	3.07	3.25	94
5.41	0.68	2.67	3.04	88
2.28	0.00	1.11	1.14	97
2.28	2.28	2.50	2.28	110
2.28	1.09	1.65	1.68	98
2.28	0.68	1.41	1.48	95
1.09	0.00	0.64	0.55	117
1.09	1.09	1.11	1.09	102
1.09	0.68	0.86	0.89	97
0.68	0.00	0.50	0.34	148
0.68	0.68	0.65	0.68	95

単位 ng/ml

VIII. 測定に関する基本資料

1. 抗体の特異性と測定可能なオステオカルシン存在形態

第一抗体----- 17位 γ -カルボキシグルタミン酸残基を認識する。
第二抗体----- N末端アミノ酸配列 4～9残基をエピトープとする。

インタクトオステオカルシン

1 17 21 24 49

フラグメントオステオカルシン

1 17 21 24 43

この2種類のいずれも17位が γ -カルボキシル化されているオステオカルシンを測定の対象としていると考えられる。

2. ハイドロキシアパタイト (HAP) 処理前後の血清 Gla-OC 値の変化と HAP からの回収値

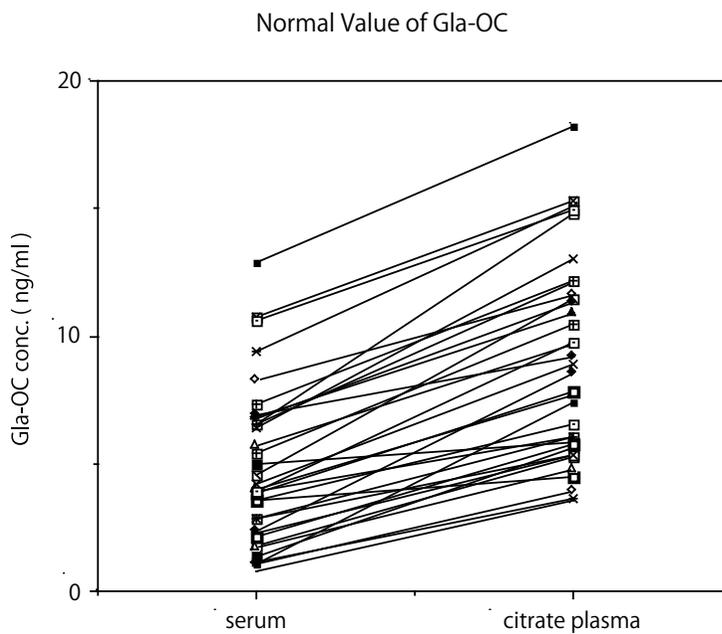
ハイドロキシアパタイト (HAP) 処理により骨組織に結合能のある OC (活性型 OC) は吸着し除かれる。このキットでは明らかに活性型 OC を直接的に測定している。

検体 No.	血清 Gla-OC	HAP 処理血清 Gla-OC	リン酸溶出 Gla-OC
1	0.469	0.091	0.946
2	0.563	0.000	0.950
3	0.407	0.410	1.332
4	0.955	0.451	2.118
5	2.973	0.000	3.299
6	0.320	0.000	0.810
7	0.330	0.174	0.628
8	1.451	0.255	2.527
9	10.160	0.299	9.336
10	1.636	0.000	2.231
11	20.000	0.000	14.860
12	1.592	0.000	2.331
13	0.265	0.000	0.432
14	0.247	0.306	0.805
15	1.810	0.000	2.363
16	3.459	0.000	5.102
17	1.784	0.000	3.058
18	1.236	0.000	1.609
19	0.524	0.000	0.655
20	0.215	0.000	0.373
21	3.027	0.000	3.590
22	0.181	0.000	0.364
23	0.724	0.000	0.691
24	0.095	0.000	0.287
25	0.554	0.000	0.614
26	0.200	0.000	0.369
27	0.990	0.237	1.614
28	0.113	0.000	0.301

単位 ng/ml

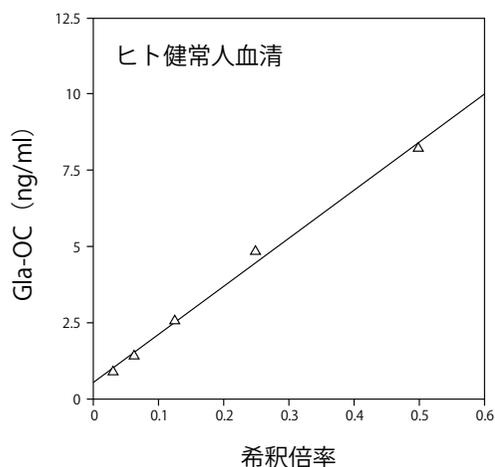
3. 健常人からのクエン酸血漿と血清 Gla-OC 値の比較

血清値はある一定の割合でクエン酸血漿値と比べ低値に出ている。

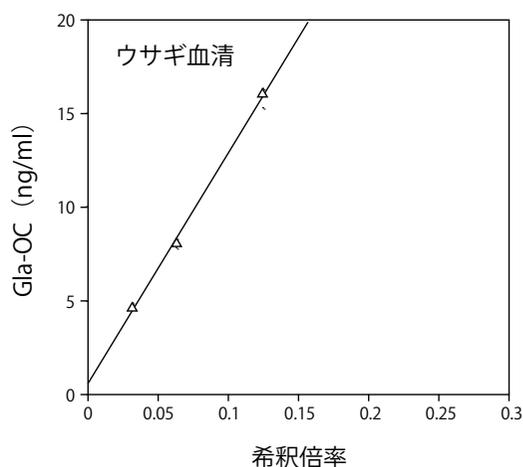


average	4.806 ng/ml	8.933 ng/ml
S.D.	3.052 ng/ml	3.896 ng/ml
n = 35 (age average 29)		

4. ヒト健常人および正常ウサギ血清の希釈曲線



$$y = 15.799x + 0.505 \quad r = 0.998$$

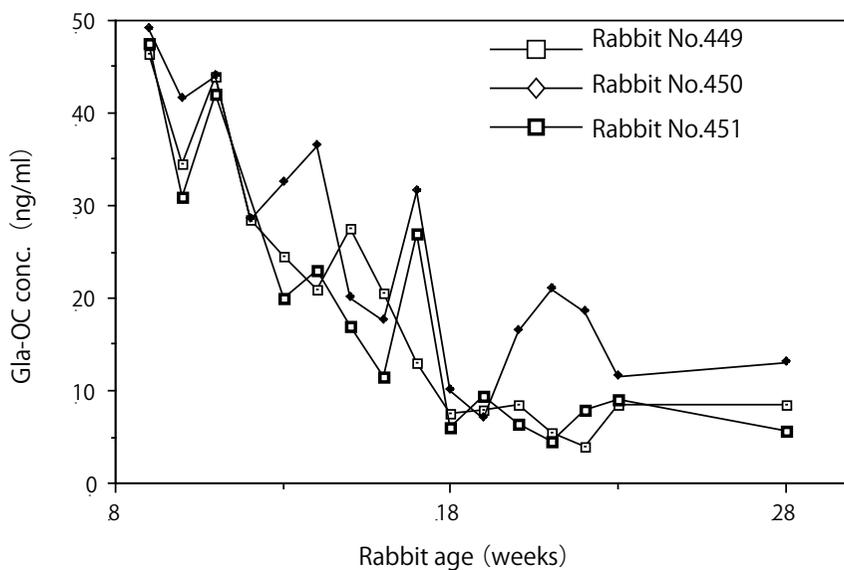


$$y = 123.182x + 0.600$$

5. 加齢に伴う血清中 Gla-OC 値の変化 (ウサギの例)

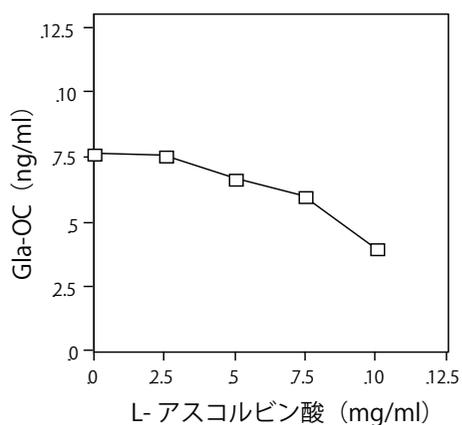
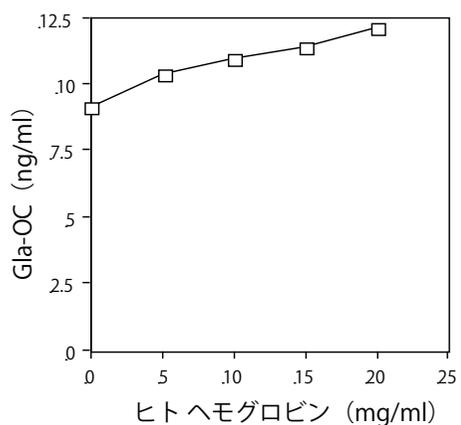
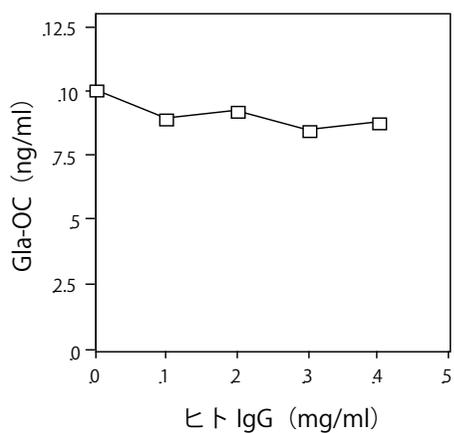
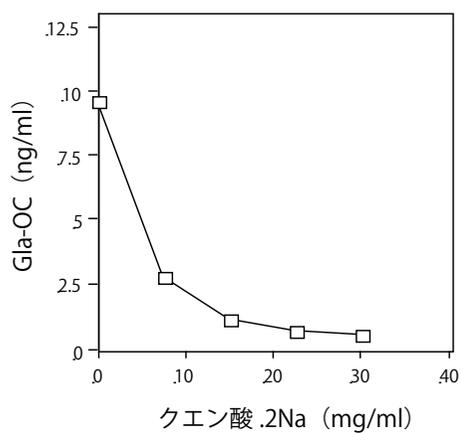
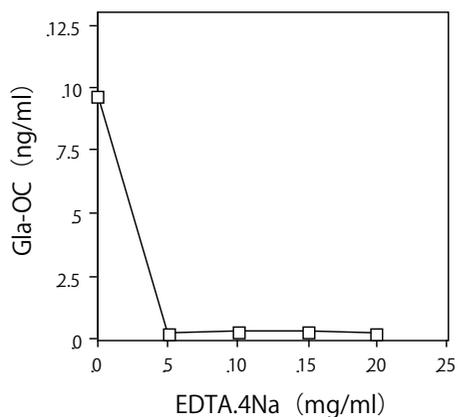
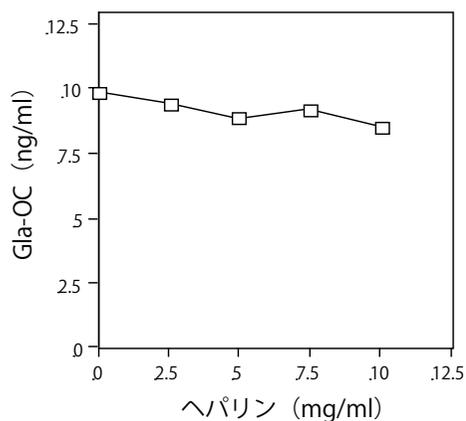
ウサギ (日本白色種) 生後9週齢より1週間おきに採血し、その血清の5倍希釈物の Gla-OC 値を測定した。加齢に伴い、著しく Gla-OC 値が変化していくことがわかる。

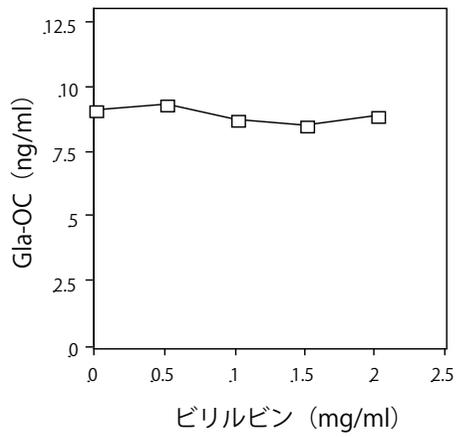
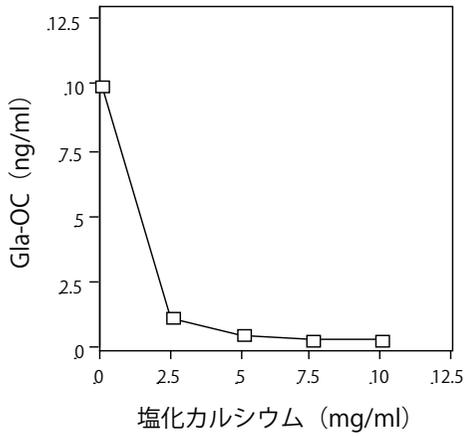
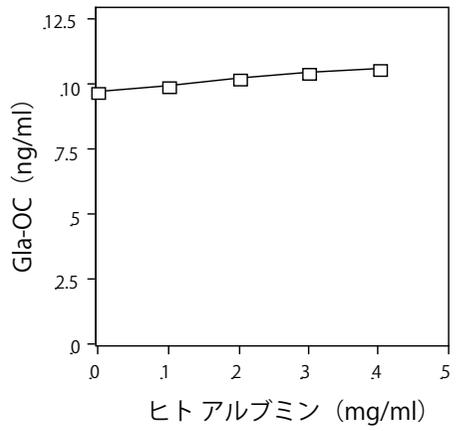
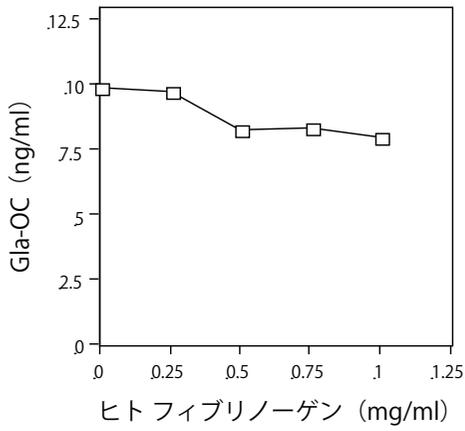
Alteration of serum Gla-OC



6. 共存物質の影響

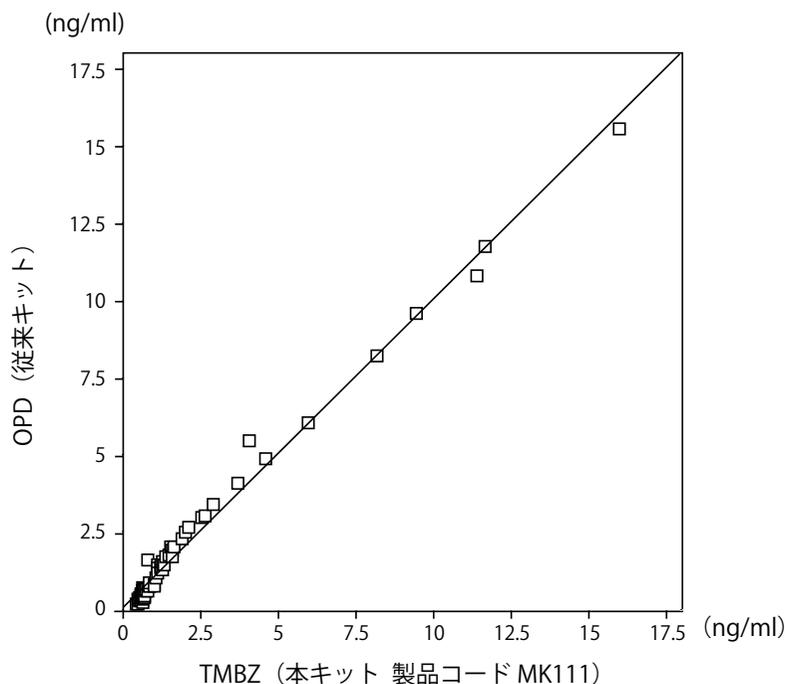
サンプル4容量に対し供試物質1容量を加え反応系に与える影響をみた。
グラフ内の供試物質濃度は終濃度で表されている。





7. 従来キットとの相関

従来の用時調製タイプのキットと本キット（製品コード MK111）を用いて 68 検体（血清）の測定を同時に実施した。



相関性データ

$$y = 0.997x + 0.098 \quad r = 0.994$$

IX. 関連製品

Human Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK128)

Pig Glu-Osteocalcin EIA Kit (製品コード MK149)

Pig Gla-Osteocalcin EIA Kit (製品コード MK139)

Mouse Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK127)

Mouse Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK129)

Rat Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK126)

Rat Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK146)

TRACP & ALP double-stain Kit (製品コード MK300)

TRACP & ALP Assay Kit (製品コード MK301)

Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)

ヒト骨芽細胞 (HOB) (製品コード C-12720)

骨芽細胞増殖培地 (Ready-to-use) (製品コード C-27001)

X. 使用上の注意

1. ロット番号の異なるキットの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) および反応停止液に用いるピペット等は金属がつかわれていないものを用いてください。
4. (5) Substrate Solution (TMBZ) や反応停止液は手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、温度の影響を受ける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。

XI. 参考文献

- 1) Garner P. *et al.* (1994) *J Bone Miner Res.* **9** (2), 255-264.
- 2) Koyama N. *et al.* (1991) *J Immunol Methods.* **139**, 17-23.
- 3) Yamaoka K. *et al.* (1996) 第 14 回日本骨代謝学会 抄録 . 157.
- 4) Shibuya T. *et al.* (1996) 第 14 回日本骨代謝学会 抄録 . 165.
- 5) Hirota, Y. *et al.* (1998) ホルモンと臨床 . **46**, 235-239.

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

TakaRa テクニカルサポートライン

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

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社