

製品コード MK129

研究用

---

**TaKaRa**

**Mouse Glu-Osteocalcin  
High Sensitive EIA Kit**

---

説明書

v201606Da

オステオカルシン (Osteocalcin : OC) は、分子中に  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) を 2～3 残基含み、ヒトではアミノ酸 49 残基 (分子量約 5,900)、マウスではアミノ酸 46 残基の、ビタミン K 依存性カルシウム結合性・非コラーゲン性タンパク質として知られています。骨芽細胞のみで産生されていることから、標準的な骨芽細胞特異マーカーです。ヒドロキシアパタイト結合能のある Gla 型オステオカルシンは骨形成のマーカータンパク質であり、一方、ヒドロキシアパタイト結合能のない Glu 型は、相対して骨吸収マーカーとして着目されています。

骨芽細胞内で産生した未修飾・Glu 型のオステオカルシンは、ビタミン K 依存性  $\gamma$ カルボキシラーゼにより分子内の 3ヶ所のグルタミン酸が Gla 化され、カルシウムを捕捉できるポケットを形成し、骨基質に結合できる活性型の Gla オステオカルシンへ変換されます。細胞中での Glu から Gla への変換率は 100% ではなく、2つの分子種がバランスをもって常に共存しています。血中でも 2種の分子形態が存在しており、個体の成長期 (骨代謝) と関連していると考えられています。Glu 型オステオカルシンの最近の知見として、骨代謝に限定されず、糖代謝にかかわる重要な役目を担っている可能性が考えられています。

本製品は、マウス骨組織から破骨細胞保有酵素等により溶出した脱炭酸オステオカルシンや、あるいは骨芽細胞から産生されたがカルボキシル化を受けなかった Glu 型のオステオカルシン (不活性型オステオカルシン) を特異的かつ高感度に測定できるモノクローナル抗体を用いた定量キットです。

マウスのオステオカルシンは、他の動物と比較すると、N 末端領域で 4 アミノ酸の欠損があり、全長で 46 アミノ酸から成り立っており、C 末端領域ではヒト・ウシなどの大型動物とはやや異なる配列を持っています。(下記、アミノ酸一次構造参照)

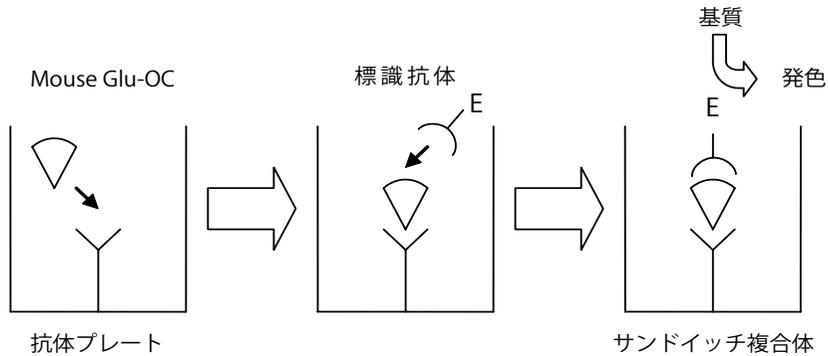
そのため、第一段階で C 末端領域にエピトープを持つ抗体を用いて抗原を捕捉することにより、ウシ血清培地存在下でも、培養上清中のオステオカルシンを直接的に定量することが可能となりました。これにより、マウス骨芽前駆細胞はもちろんのこと、マウス ES 細胞や iPS 細胞といった多分化万能細胞から骨芽系細胞への分化過程を培地成分の影響を受けることなくモニタリングすることができます。

なお、検出用抗体にオステオカルシンの Gla 残基を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた Mouse Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK127) を用いて Gla 型オステオカルシンを同時に測定することで、Gla 型と Glu 型の両キットによる相対評価を行い、骨代謝回転に必要な情報を得ることも可能です。

#### <各動物オステオカルシンのアミノ酸一次構造>

		10	20	30	40	50
Human	1	YLYQWLGAPV	PYPDPLEPRR	EVCELNPDCD	ELADHIGFQE	AYRRFYGP-V
Bovine	1	YLDHWLGAPA	PYPDPLEPKR	EVCELNPDCD	ELADHIGFQE	AYRRFYGP-V
Rat	1	YLNNGLGAPA	PYPDPLEPHR	EVCELNPDCD	ELADHIGFQD	AYKRIYGTTV
Mouse	1	YL----GASV	PSPDPLEPTR	EQCELNPACD	ELSDQYGLKT	AYKRIYGITI
Chicken	1	YAQDSGVAGA	P-PNPLEAQR	EVCELSPDCD	ELADQIGFQE	AYRRFYGP-V
Monkey	1	YLYQWLGAPA	PYPDPLEPKR	EVCELNPDCD	ELADHIGFQE	AYRRFYGP-V
Pig	1	YLDHGLGAPA	PYPDPLEPRR	EVCELNPDCD	ELADHIGFQE	AYRRFYGI-A

## I. 測定原理



## II. キットの内容

(1) Antibody Coated Microtiterplate 抗 Mouse OC モノクローナル抗体コーティングプレート (96 well : 8 well × 12 strips)	1 plate
(2) Antibody-POD Conjugate (凍結乾燥品) ペルオキシダーゼ標識抗 Glu-OC モノクローナル抗体	11 ml 用
(3) Standard (凍結乾燥品) Mouse Glu 型オステオカルシン全長合成ペプチド 8 ng	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°C

## V. 使用目的

- マウス由来生体サンプル中の Glu 型オステオカルシン量 (Mouse Glu-OC) の測定
- マウス骨芽細胞上清中の Gla 化前の Glu 型オステオカルシン量の測定  
(ウシ血清共存下でも測定可能)

注：本キットは研究用です。診断目的には使用できません。

---

## VI. 使用方法

### 1. 検体

- 検体はマウス血清・血漿・腹水・細胞培養上清・細胞抽出液等を用いる。
- 検体は 2 ～ 10℃ に保存し、12 時間を過ぎて測定する場合は凍結保存する。
- 希釈が必要な場合は、(4) Sample Diluent を用いて希釈する。
- マウス血清検体の場合、4 ～ 8 週齢で 3 ～ 4 倍希釈して用いるとよい。  
(異なる週齢や多検体測定の場合は、検体の希釈倍率検討が必要。一般的に幼若動物ほど高値が予想される。)
- 本製品は、ウシ抗原には交差反応しないため、ウシ血清培地を使用した細胞培養上清を直接測定できる。
- 溶血血清は、測定値が低値となる傾向にある。

### 2. 試薬調製

- 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 4℃ で 1 週間は安定である。それ以上保存する場合には - 20℃ 凍結し 1 ヶ月安定である。ただし、凍結融解は一度までにとどめる。
- Mouse Glu-OC 標準液  
(3) Standard に蒸留水を 1 ml 加えて溶解し、Mouse Glu-OC 標準液 (8.0 ng/ml) を調製する。これを (4) Sample Diluent で用時段階希釈して、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 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。  
溶解した Mouse Glu-OC 標準液 (8.0 ng/ml) は 4℃ 保存では一週間安定で、- 20℃ 保存では 1 ヶ月安定である。ただし、凍結融解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 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 Standard および検体を 100  $\mu$ l 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 1 時間反応させる。サンプルはあらかじめ別の 96 穴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 の加温は抗原性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、0.1% Tween 20 含有 PBS で 3 回洗浄後、標識抗体液を 100  $\mu$ l 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、0.1% Tween 20 含有 PBS で 4 回洗浄後、(5) Substrate Solution (TMBZ) を 100  $\mu$ l ずつ 8 連ピペットで各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30°C) で 15 分反応させる。(第三反応)
4. 反応停止液を 100  $\mu$ l 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整し、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 Standard 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 Mouse Glu-OC 濃度を読み取る。

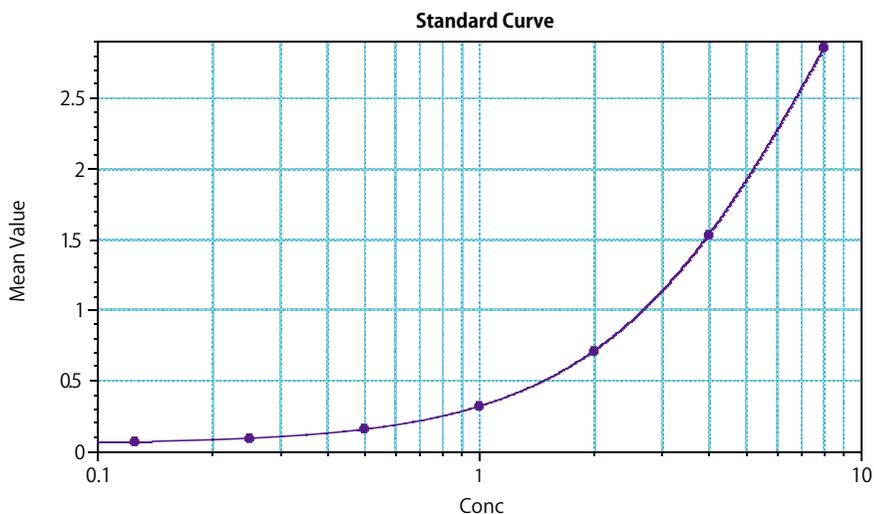
## VII. 性能

### 1. 標準曲線 (Mouse Glu-Osteocalcin EIA Kit)

下記の標準曲線は代表的な一例である。各ロットの標準曲線については、測定ごとに標準曲線を作成してください。

最少検出感度 : 0.25 ng/ml

Curve Fit : 4-Parameter



$$4\text{-P Fit : } y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$$

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
0.0513	1.41	8.91	6.11	1

Mouse Glu-OC 濃度 (ng/ml)	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5	0.25	0.125	0
Absorbance 450 nm	2.851	1.534	0.704	0.314	0.163	0.092	0.066	0.045

発色時間 15 分

### 2. 再現性

<同時再現性試験>

Mouse Glu-Osteocalcin 全長ペプチドを含む 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=8)	平均値 (ng/ml)	SD	CV (%)
コントロール A	4.124	0.159	3.9
コントロール B	1.861	0.040	2.2
コントロール C	0.948	0.025	2.6

<日差再現性試験>

3 日間にわたり 3 種類の濃度コントロールの定量を行い、再現性試験を実施した。

検体 (n=3)	平均値 (ng/ml)	SD	CV (%)
コントロール D	4.082	0.057	1.4
コントロール E	1.838	0.020	1.1
コントロール F	0.866	0.075	8.6

<添加回収>

種々の濃度のマウス血清サンプルに、オステオカルシン濃度が異なる3種類のコントロールペプチド溶液を等量ずつ混合し、予想される理論値と実測値から回収率を調べた。マウス血清サンプルの希釈、またペプチド溶液の調製は、Sample Diluentで行った。

マウス血清4倍希釈溶液へのペプチド溶液添加においては添加回収率が平均111.7%と良好であったが、マウス血清2倍希釈溶液へのペプチド溶液添加においては添加回収率が平均126%と高値になった。

なお、2種のペプチド溶液を用いた添加回収は、平均98.1%と良好であった。

サンプルの状態が異なる場合は、添加回収率に影響がでることが予想される。

サンプル A マウス血清 (× 4)	サンプル B ペプチド溶液	理論値 (A+B)/2	実測値	添加回収率 (%)
2.150	4.139	3.145	3.523	112.0
2.150	1.903	2.027	2.454	121.1
2.150	0.894	1.522	1.852	121.7
2.231	4.139	3.185	3.277	102.9
2.231	1.903	2.067	2.243	108.5
2.231	0.894	1.563	1.766	113.0
1.730	4.139	2.935	3.340	113.8
1.730	1.903	1.817	2.034	111.9
1.730	0.894	1.312	1.321	100.7

サンプル C マウス血清 (× 2)	サンプル B ペプチド溶液	理論値 (A+B)/2	実測値	添加回収率 (%)
2.862	4.139	3.501	4.278	122.2
2.862	1.903	2.383	2.900	121.7
2.862	0.894	1.878	2.458	130.9
3.147	4.139	3.643	4.616	126.7
3.147	1.903	2.525	3.280	129.9

サンプル D ペプチド溶液	サンプル E ペプチド溶液	理論値 (A+B)/2	実測値	添加回収率 (%)
3.930	4.786	4.358	4.778	109.6
3.930	2.092	3.011	3.219	106.9
3.930	0.979	2.455	2.560	104.3
2.050	4.786	3.418	3.232	94.6
2.050	2.092	1.913	1.776	92.8
2.050	0.979	1.515	1.352	89.2
1.116	4.786	2.951	2.589	87.7
1.116	2.092	1.604	1.574	98.1
1.116	0.979	1.048	1.048	100.0

(サンプル A、B、C、D、E 単位 ng/ml)

### 3. マウスサンプルの希釈直線性

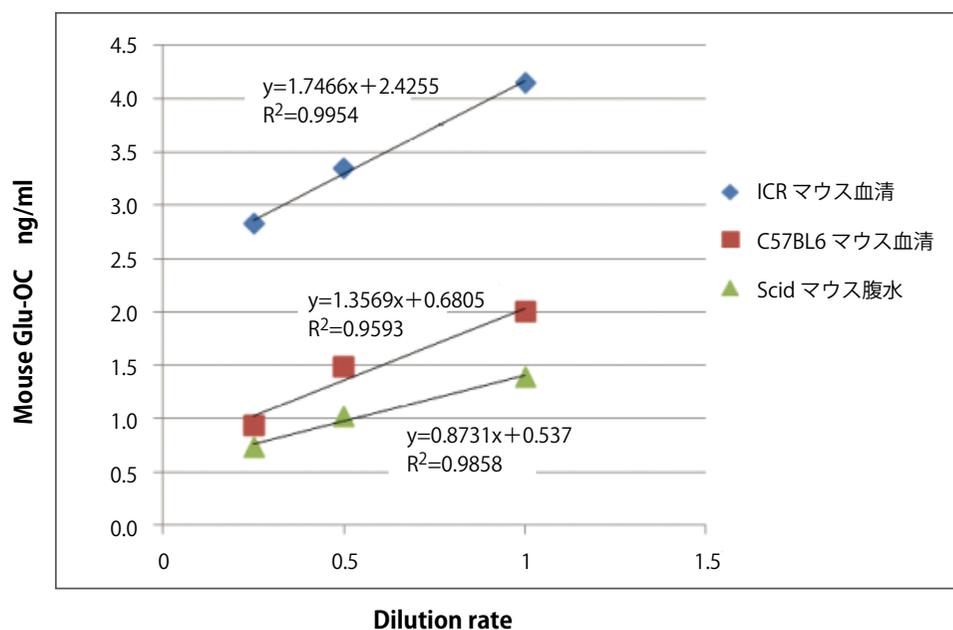
マウス血清や腹水サンプルの、それぞれ原液、2倍希釈、4倍希釈したサンプルを用いて測定を行った。

血清および腹水サンプルは、原液測定の場合、低値になる傾向があり、希釈直線性が得られるのは2倍希釈液からと予想される。

高週齢サンプルの場合は、血中で低濃度になるため、原液～2倍希釈での測定が望ましいが、相対評価する場合は、同一の希釈倍率で評価を行なうことが望ましい。

希釈倍率	ICR マウス血清 (8～9週齢)	C57BL6 マウス血清 (8～9週齢)	Scid マウス 腹水
× 1	4.155	1.997	1.395
× 2	3.350	1.480	1.019
× 4	2.828	0.939	0.725

(単位 ng/ml)

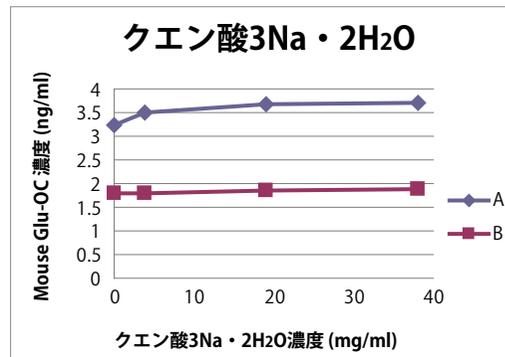
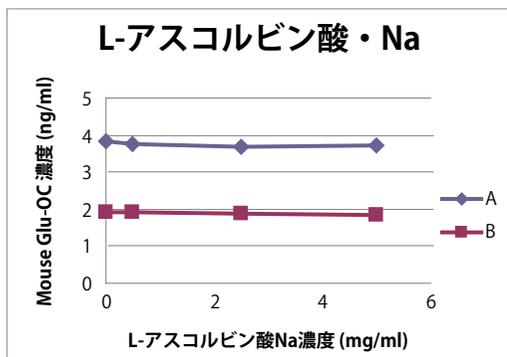
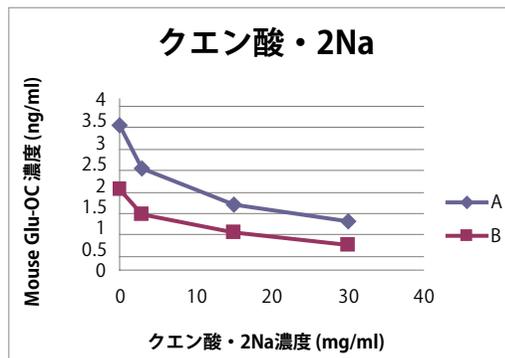
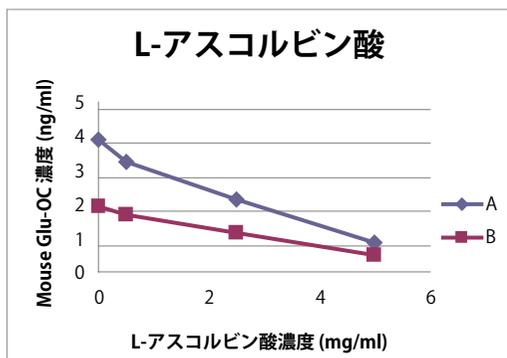
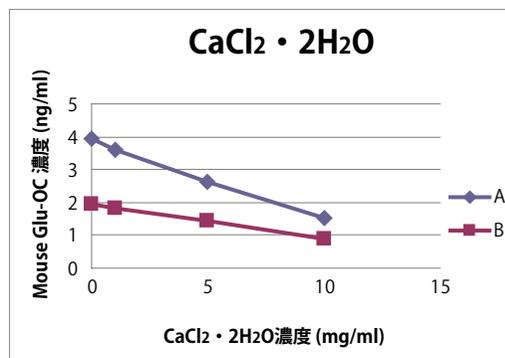
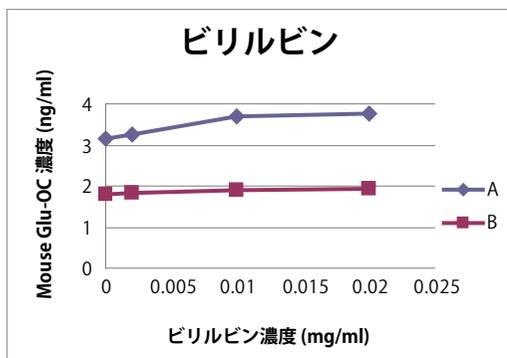
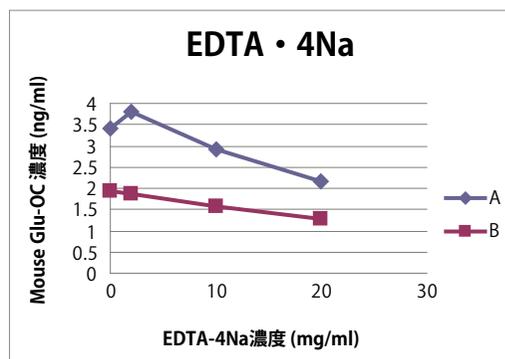
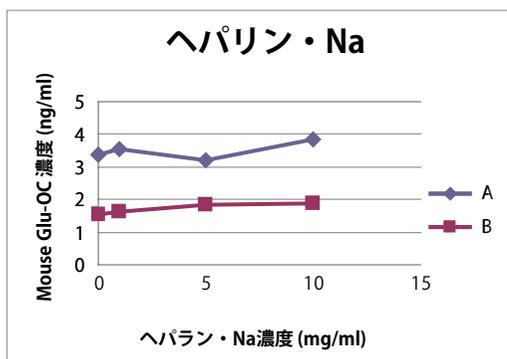


## VIII. 測定に関する基本資料

### 1. 共存物質の影響

オステオカルシン標準液 9 容量 (高・低の 2 濃度設定) に対し、供試物質 1 容量加え、反応系に与える影響をみた。グラフ内の横軸は、供試物質終濃度を表わしている。縦軸は測定している Glu 型オステオカルシン濃度を表わしている。(単位 ng/ml)

L-アスコルビン酸およびクエン酸は影響がみられるが、ナトリウム塩などを用いて pH を中性領域にしたものでは影響は見られない。



## 2. マウス培養細胞上清の測定例

マウス新生3日目以内の頭蓋骨から分離した初代培養骨芽細胞を培養し、Osteo-Inducer Reagent for Animal (製品コード MK430) を加えた培地を用いて骨芽誘導を行った。経日的に培養上清を採取し、培養上清に含まれる Glu 型および Gla 型のオステオカルシンを測定した。また、石灰化進行の様子をアリザリンレッド試薬で染色して可視化した。

### ・培養条件

基本培地 (10% FCS およびストレプトマイシン、ペニシリン含有 RPMI 1640 培地)  
骨芽細胞分化培地 (基本培地に Osteo-Inducer Reagent for Animal を添加)  
コントロールとして、基本培地のみでも培養を継続した。

### ・細胞数

まき込み時  $1 \times 10^5$  細胞/ウェル 24 ウェルプレート  
70% 飽和培養から実験開始し、100% 飽和へ移行させる。

### ・使用培地量

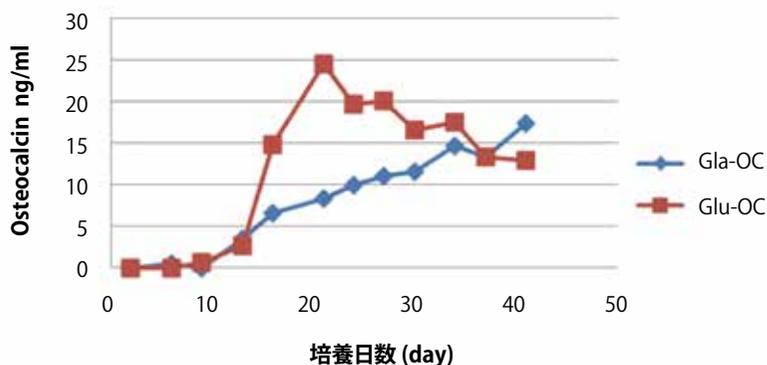
3 ml/ウェル 24 ウェルプレート

### ・測定条件

1 ml ずつ経日的に培養上清をサンプリングし、その都度新しい培地を等量補充する。  
Glu 型オステオカルシン：Mouse Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit  
Gla 型オステオカルシン：Mouse Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit  
を用いて、それぞれ原液を測定

培養日数 (day)	Glu-OC 濃度 (A450 nm)		Gla-OC 濃度 (A450 nm)		アリザリンレッド (A555 nm)		
	骨芽誘導 +	骨芽誘導 -	骨芽誘導 +	骨芽誘導 -	骨芽誘導 +	骨芽誘導 -	
2	0.050	0.048	0.048	0.045	0.039	0.038	
6	0.047	0.059	0.057	0.042	0.064	0.060	
9	0.069	0.053	0.048	0.043	0.068	0.068	
13	0.170	0.045	0.067	0.045	0.090	0.084	
16	1.382	0.057	0.102	0.044	0.073	0.070	
21	2.343	0.048	0.129	0.043	0.564	0.107	
24	1.882	0.048	0.161	0.042	1.264	0.081	
27	1.917	0.049	0.180	0.043	2.649	0.076	
30	1.561	0.090	0.192	0.044	3.672	0.071	
34	1.660	0.048	0.267	0.042	3.712	0.099	
37	1.241	0.051	0.235	0.042	3.634	0.093	
41	1.169	0.048	0.342	0.046	3.702	0.112	

## Glu & Gla 型 オステオカルシンの測定



### <結果>

骨芽誘導した細胞培養上清には、Gla 型、Glu 型いずれのオステオカルシンも検出された。Glu 型の産生量は、21 日目をピークに減少傾向にあるが、Gla 型は一律に増加傾向にあった。

なお、Gla 型の一部は、細胞の石灰化とともに細胞表面の骨基質に取り込まれている様子が抗マウスオステオカルシン抗体染色により観察された。(染色データ未公開)

## IX. 関連製品

Mouse Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK127)  
Human Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK128)  
Gla-Type Osteocalcin (Gla-OC) EIA Kit (製品コード MK111)  
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)  
Pig Gla-Osteocalcin EIA Kit (製品コード MK139)  
Pig Glu-Osteocalcin EIA Kit (製品コード MK149)  
TRACP & ALP double-stain Kit (製品コード MK300)  
TRACP & ALP Assay Kit (製品コード MK301)  
Osteoblast-Inducer Reagent (for animal cell) (製品コード MK430)  
Anti-Mouse Osteocalcin, Monoclonal (Clone R21C-01A) (製品コード M188)  
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)

## 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 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. 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