

製品コード MK146

研究用

TAKARA

**Rat 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 γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) 2~3 残基を含むアミノ酸 49 残基 (ラットの場合 50 残基)、分子量約 5,900 のビタミン K 依存性カルシウム結合・非コラーゲン性蛋白質です。オステオカルシンは主に骨芽細胞で合成されたのちに、細胞内でビタミン K 依存性カルボキシラーゼにより Gla 化されます。17 位、21 位、24 位のグルタミン酸が Gla 化され、カルシウムポケットを形成することから、Gla 化されたオステオカルシンのみがヒドロキシアパタイトと結合し、骨に蓄えられますが、Gla 化されていないオステオカルシンや分解などで脱炭酸もしくは低カルボキシル化したオステオカルシンは骨質と親和性が弱く血中に放出され、骨吸収の指標となることがわかってきました。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-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ます。

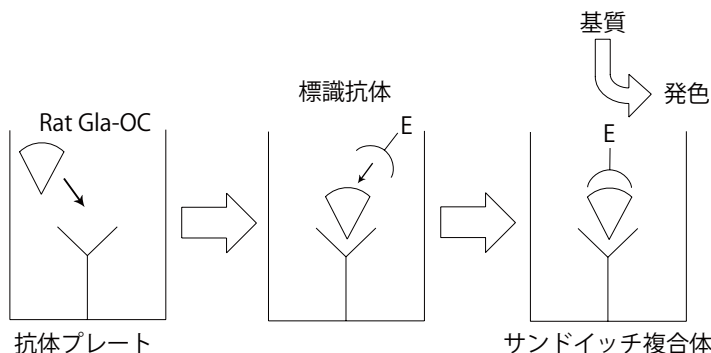
<各動物オステオカルシンのアミノ酸一次構造>

		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

ラットは、ウシに次いでヒトのオステオカルシンとホモロジーの高いオステオカルシンをもち、寿命の短さや取り扱いの容易さ、また個体数を確保できる実験系が可能なことから、骨関連の実験によく使用されてきました。^{1,2)} 骨形成マーカーとしてオステオカルシンを測定している文献も過去にいくつか見受けられます。当時はヨード標識したオステオカルシンを用いた RIA ですが、近年、酵素を用いた EIA も構築されています。³⁾ しかしながら、低カルボキシル化した不活性型 (Glu 型) オステオカルシンを Gla 型オステオカルシンと区別して測定している例はほとんどありません。分別定量が可能となれば、オステオカルシンは骨形成と骨吸収という 2 つの相反するマーカーになりうるわけです。

本製品は、ラットオステオカルシン C 末端領域認識特異的抗体を固相プレート上の捕捉抗体とし、検出用抗体にオステオカルシンの 21 および 24 位にまたがる Glu 残基に特異的なモノクローナル抗体を配置したサンドイッチタイプの EIA キットです。従来の Rat Glu-OC Competitive EIA Kit (製品コード MK122; 終売) は、All Glu 型をトラップする競合 ELISA 系の測定キットですが、本製品により微量抗原の高感度測定および安定した再現性の維持が可能になりました。96 ウェルプレートを用いているため、大量にサンプル処理ができます。また、Rat Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK126) と捕捉抗体を共通化しており、Gla/Glu の同時検出において、Gla/Glu 相対的な比較検討をすることができ、骨形成と骨吸収を同時にモニタリングすることが可能です。

I. 測定原理



II. キットの内容

(1) Antibody Coated Microtiterplate 抗 Rat OC モノクローナル抗体コーティングプレート (96 ウェル：8 ウェル× 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) Rat Glu Osteocalcin Full-length Peptide 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℃

V. 使用目的 ラット由来生体サンプル中の Glu 型オステオカルシン量 (Rat GluOC) の測定

VI. 使用方法

1. 検体

- 検体はラット血清・腹水・培養細胞上清および抽出液等を用いる。
- 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。
- ラット血清検体の場合、20 ~ 100 倍希釈して用いるとよい。
- 溶血血清は著しく低値になる傾向にある。

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。
溶解後一週間は安定である。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、凍結は一度までにとどめる。
- Rat Glu-OC 標準液
(3) Standard に蒸留水を 1ml 加えて溶解し、Rat 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、8.0、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 Rat Glu-OC 標準液 (8 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、凍結融解は一度だけにとどめる。
- 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 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℃) で 1 時間反応させる。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を高めるためにも、1 列目と 12 列目に標準液の希釈系列をおくとよい。37℃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 μl ずつ 8 連ピペットで各ウェルに加え、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、(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℃) で 15 分反応させる。(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 Rat Glu-OC 濃度を読み取る。

VII. 性能

1. 標準曲線 (Rat Glu-Osteocalcin High Sensitive 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。

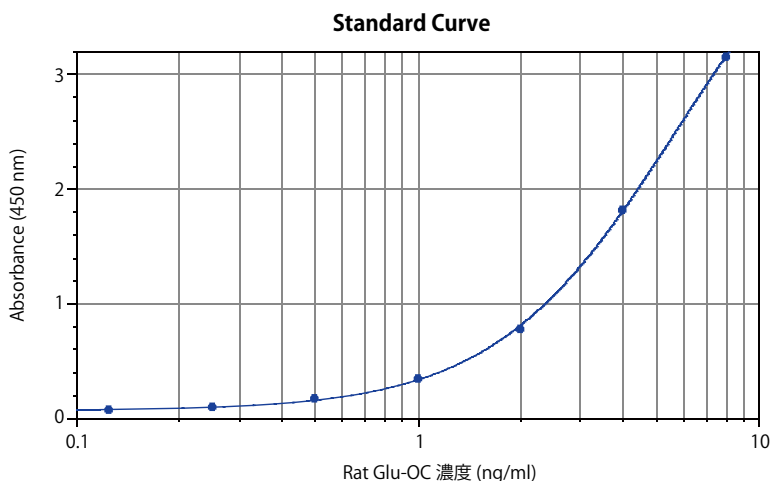
最少検出感度：0.125 ng/ml

Curve Fit：4-Parameter

Corr. Coeff：1.00

$$y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$$

$$A = 0.0656 \quad B = 1.63 \quad C = 5.72 \quad D = 4.94$$



Rat Glu-OC 濃度 (ng/ml)	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5	0.25	0.125	0.0
A ₄₅₀	3.150	1.819	0.782	0.350	0.170	0.094	0.071	0.053

(発色時間：15分)

2. 再現性

<同時再現性試験>

ラッ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=8)	平均値 (ng/ml)	CV (%)
コントロール A	4.418	4.8
コントロール B	1.976	2.6
コントロール C	0.811	4.1

<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行い、再現性試験を実施した。

検体 (n=3)	平均値 (ng/ml)	CV (%)
コントロール A	4.096	6.3
コントロール B	1.867	4.1
コントロール C	0.794	2.4

<添加回収試験>

種々な濃度のサンプルを等量ずつ混合し、予想される理論値と実測値とから回収率を調べた。

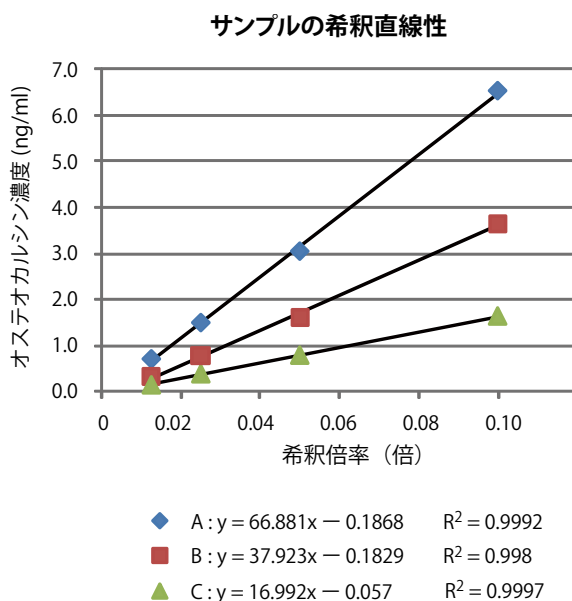
Sample A	Sample B	A+B (理論値)	A+B (実測値)	回収率 (%)
9.153	3.698	6.426	6.721	104.6
9.153	1.742	5.448	5.505	101.1
9.153	0.880	5.017	5.087	101.4
9.153	0.576	4.865	4.984	102.5
9.153	0.315	4.734	4.676	98.8
4.167	3.698	3.933	4.381	111.4
4.167	1.742	2.955	3.172	107.4
4.167	0.880	2.524	2.852	113.0
4.167	0.576	2.372	2.630	110.9
4.167	0.315	2.241	2.483	110.8
2.098	3.698	2.898	3.208	110.7
2.098	1.742	1.920	2.119	110.4
2.098	0.880	1.489	1.938	130.2
2.098	0.576	1.337	1.432	107.1
2.098	0.315	1.207	1.425	118.1
1.058	3.698	2.378	2.496	105.0
1.058	1.742	1.400	1.523	108.8
1.058	0.880	0.969	1.094	112.9
1.058	0.576	0.817	0.844	103.3
1.058	0.315	0.687	0.775	112.9
0.518	3.698	2.108	2.194	104.1
0.518	1.742	1.130	1.231	108.9
0.518	0.880	0.699	0.817	116.9
0.518	0.576	0.547	0.518	94.7
0.518	0.315	0.417	0.475	114.0

回収率平均値：108.8%

単位：ng/ml

3. ラット血清サンプルの希釈直線性

正常ラットの異なる3個体A、B、Cについて、10倍、20倍、40倍、80倍希釈して本キットで定量を行い、希釈直線性について確認した。



VIII. 測定に関する基本資料

1. サンプルの溶血の影響

個体別に採取したラット血液を2等分し、一方はすぐに遠心後、血清採取し、もう一方は数回、注射針を通過させることにより意図的に溶血を起こさせてから遠心後、血清を採取した。すべてのサンプルは同時に定量した。最適希釈倍率を見つけるために、10倍希釈から段階希釈液を作製し(10、20、40、80倍)定量した。またRat Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK126)でも同時測定し、両キットにおける溶血の影響の有無を調べた。

本製品では血清20倍希釈液の測定値、製品コード MK126 では血清40倍希釈液の測定値を示す。

キット	MK146 Rat GluOC		MK126 Rat GlaOC	
測定倍率	20倍希釈サンプル		40倍希釈サンプル	
サンプル条件	正常血清	溶血血清	正常血清	溶血血清
血清濃度換算値 (ng/ml)				
4週ラット1	56.1	15.8	448.9	158.5
4週ラット2	38.4	3.9	247.4	45.0
4週ラット3	40.5	感度以下	331.7	17.0
4週ラット4	79.5	感度以下	549.0	9.8

結果：

Gla型/Glu型両オステオカルシン測定は、すべての個体において、溶血の影響により極端に低値になる傾向が見られた。

溶血血清は測定対象から除外するまたは定量結果について溶血要因を考慮に入れることをお勧めする。

2. 各種動物血清との交差反応

各種動物血清との交差反応性を調査した。

サンプル		希釈倍率			
		x 10	x 50	x 250	x 1,250
ラット	9週 オス	4.000	0.818	0.141	0.067
	リタイア、メス、産後3日目	0.434	0.093	0.058	0.057
	12週 オス	2.713	0.394	0.095	0.061
		1.128	0.196	0.073	0.055
	24日 オス	4.000	1.589	0.244	0.080
牛胎児 (非働化前)		0.054	0.050	0.051	0.054
牛	3年未満	0.055	0.052	0.052	0.051
ヒト (ドナー別)		0.061	0.054	0.051	0.048
ウマ		0.116	0.073	0.060	0.057
イヌ		0.060	0.056	0.055	0.052
ブタ	8ヵ月 オス	0.066	0.058	0.056	0.056
ヒツジ		0.094	0.060	0.056	0.053
ヤギ		0.068	0.058	0.053	0.055
ウサギ	12週 オス	0.082	0.064	0.056	0.055
モルモット	12週 オス	0.068	0.056	0.053	0.052
ウサギ	12週 オス	0.078	0.065	0.056	0.055

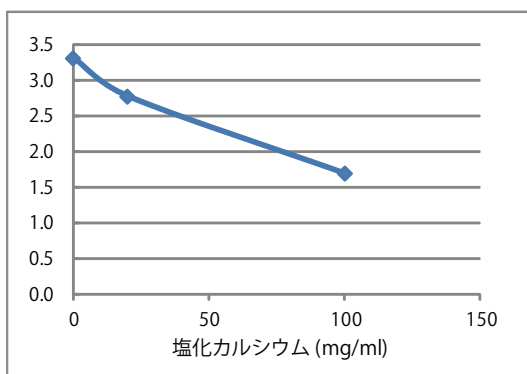
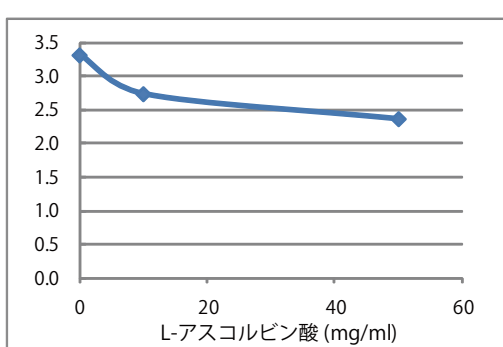
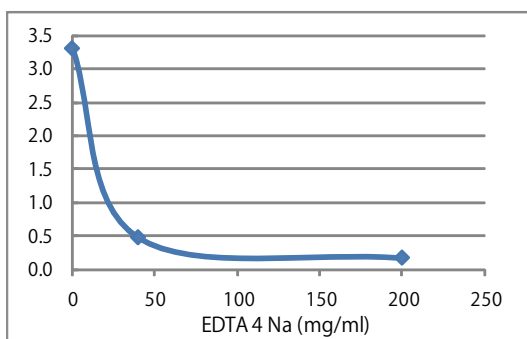
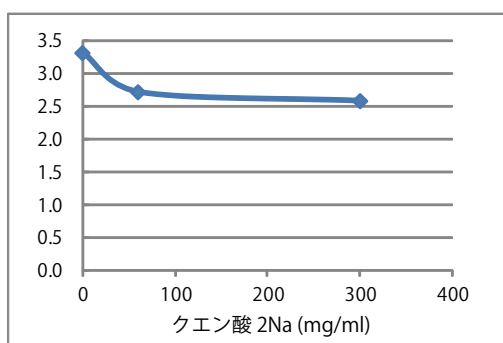
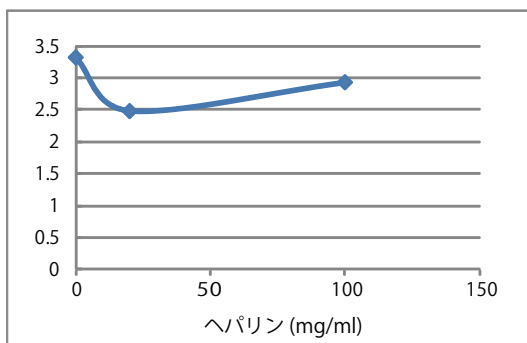
A450測定値

結果：

本キットの測定系はラット特異的であり、ヒトを含めその他の動物への交差反応は見られなかった。幼若ラットで血中濃度が高値の傾向が見られた。

3. 共存物質の影響

オステオカルシン標準液 9 容量に対し供試物質 1 容量 (高・低の 2 濃度設定) を加え、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)



結果：

EDTA 4Na および塩化カルシウムが妨害傾向にあるので、注意が必要である。

4. Rat Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK146) と Rat Glu-OC Competitive EIA Kit (製品コード MK122; 終売) との測定比較

ラット血清サンプル3種を対象に、本製品 (製品コード MK146) と従来品 (製品コード MK122; 終売) の測定比較を行った。

	Sandwich ELISA	Competitive ELISA
	MK146 測定換算値 (ng/ml)	MK122 測定換算値 (ng/ml)
測定時倍率 (換算時には 希釈倍率を積算)	50 倍希釈	2 倍希釈
ラット 個体 A	25.5	414
ラット 個体 B	68.7	403
ラット 個体 C	102.9	241
キット測定領域	0.125 ~ 8.0 ng/ml	9.4 ~ 600 ng/ml
使用抗体のエピトープ から想定する 捕捉分子種	21 ~ 50 位を保有する Glu Type Osteocalcin	All Glu 21/24Type Osteocalcin

結果：

MK146 での測定値が従来品での測定値を下回る傾向にある。キットに使用している抗体のエピトープから想定する捕捉分子種の違いが原因として考えられるが、2 抗体サンドイッチ ELISA 法と 1 抗体競合 ELISA 法とのシステム差および検出感度の違いが影響していると予想される。

5. ラット血清測定例

新生ラットおよび高齢のリタイアラットの個体別血清で Glu (不活性型) および Gla (活性型) 両タイプのオステオカルシンを数週間測定モニタリングを行った。

測定にあたって、血清サンプルの最適希釈倍率を見つけるために、新生ラット血清では 20 倍希釈と 60 倍希釈、リタイアラット血清では 10 倍希釈と 30 倍希釈の 2 濃度で測定を実施した。Glu および Gla 測定換算においては、検量線測定範囲に入る倍率を採用した。表内の数字は、希釈倍率を乗じた換算濃度である。

新生ラット	MK126					MK146				
	Rat Gla-OC EIA kit					Rat Glu-OC EIA kit				
週齢	測定倍率	オス No. 1	オス No. 2	メス No. 1	メス No. 2	測定倍率	オス No. 1	オス No. 2	メス No. 1	メス No. 2
3 週	x 20	12.4	—	231.5	—	x 20	0.9	—	25.1	—
4 週	x 60	275.2	—	1389.2	—	x 20	33.6	—	62.0	—
5 週	x 60	277.6	—	375.3	—	x 20	40.1	—	48.2	—
6 週	x 60	445.0	380.6	143.7	372.5	x 20	71.8	52.2	20.1	43.1
7 週	x 60	235.3	357.0	178.3	494.6	x 20	40.0	52.5	26.0	56.5
8 週	x 60	351.4	356.2	530.1	840.2	x 20	64.5	48.0	61.4	74.5
9 週	x 60	180.5	272.1	301.9	154.0	x 20	28.5	43.4	44.0	23.2

リタイアラット

週齢	測定倍率			メス No. R1	メス No. R2	測定倍率			メス No. R1	メス No. R2
21 週	x 30			199.7	79.8	x 10			10.2	13.3
25 週	x 10			52.3	55.2	x 10			5.3	5.7
29 週	x 10			9.1	29.5	x 10			1.6	3.2
33 週	x 10			80.9	38.8	x 10			7.8	4.0

単位：ng/ml

結果：

新生ラットで採血可能な時期が 3 週目からのため、1～2 週齢のサンプリングは実施していない。新生から 6 週齢ぐらいまでは、著しくオステオカルシン値が Gla/Glu 共に高く、骨代謝回転が盛んに活性化している様子がうかがえる。骨髄において、造血幹細胞からの破骨細胞の分化と間葉系肝細胞から骨芽細胞への分化がともに盛んに進んでいる時期であると予想される。

IX. 関連製品

- Rat Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK126)
- 骨芽細胞分化試薬 OsteoblastInducer Reagent (for animal cell) (製品コード MK430)
- 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)

X. 参考文献

- 1) Price, P. A. *et al.* (1980) *J Biol Chem.* **255** (7), 2938-2942.
- 2) Patterson-Allen, P. *et al.* (1982) *Anal Biochem.* **120**, 1-7.
- 3) J. Y. Fu *et al.* (1999) *Calcif Tissue Int.* **64**, 229-233.
- 4) Koyama, N. (1991) *J Immunol Meth.* **139**, 17-23.
- 5) Vergnaud, P. (1997) *J Clin Endocrinol Metab.* **82** (3), 719-724.

XI. 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使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。

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