

製品コード MK149

研究用

Takara

Pig Glu-Osteocalcin 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) を 2～3 残基含むアミノ酸 49 残基、分子量約 5,900 のビタミン K 依存性カルシウム結合性・非コラーゲン性たんぱく質として知られています。骨芽細胞でのみ産生されていることから、骨芽細胞特異マーカーであり、特に Gla 型オステオカルシンは、骨形成の指標となっています。

<各動物オステオカルシンのアミノ酸一次構造>

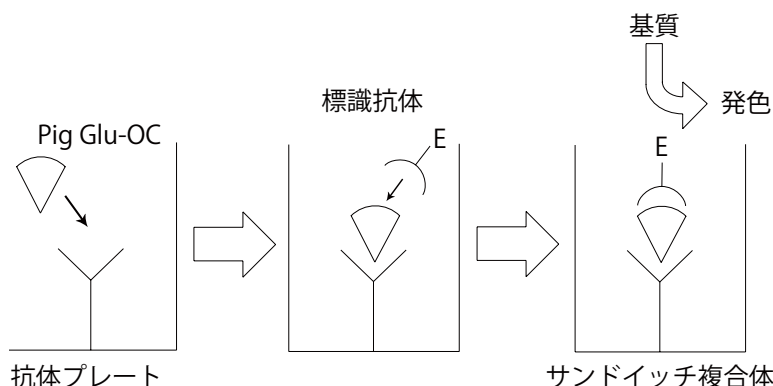
		10	20	30	40	50
Human	1	YLYQWL	GAPV PYPDPLE	PRR EVCELNP	DCD ELADHIG	FQE AYRRFYGP-V
Bovine	1	YLDHWL	GAPA PYPDPLE	PKR EVCELNP	DCD ELADHIG	FQE AYRRFYGP-V
Rat	1	YLNNGL	GAPA PYPDPLE	PHR EVCELNP	NCD ELADHIG	FQD AYKRIYGTTV
Mouse	1	YL----	GASV PSPDPLE	PTR EQCELNP	ACD ELSAQYGL	KT AYKRIYGITI
Chicken	1	YAQDSG	VAGA P-PNPLEA	QR EVCELSP	DCD ELADQIG	FQE AYRRFYGP-V
Monkey	1	YLYQWL	GAPA PYPDPLE	PKR EVCELNP	DCD ELADHIG	FQE AYRRFYGP-V
Pig	1	YLDHGL	GAPA PYPDPLE	PRR EVCELNP	DCD ELADHIG	FQE AYRRFYGI-A

骨格形成において、幼生動物の成長期の動的骨形成は、「モデリング」(新規構築)と呼ばれており、成長期を過ぎた成動物では、見かけ上骨形態変化が見られず、安定な状態を保っているが、ある一定の割合で常に骨の入れかえが行われており、これは「リモデリング」(再構築)と呼ばれています。

骨粗しょう症治療薬の薬効判定においては、モデリング時期とリモデリング時期を対象とした 2 種の動物モデルを設定することが必要とされています。モデリング動物はマウス・ラットといったげっ歯類が一般的であり、リモデリング動物はサルやミニブタが対象動物として使用されることが多く、将来的な治療薬の開発および薬剤効果判定の検討には必須の実験対象です。

本製品は、ブタ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、または骨芽細胞から産生され、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定量キットです。捕捉用抗体 (プレート固定化抗体) として、オステオカルシンの 21 および 24 位 Glu 残基を特異的に認識するモノクローナル抗体をプレートに固相化し、ブタオステオカルシン検出用モノクローナル抗体を標識抗体として組み合わせています。また、Pig Gla-Osteocalcin EIA Kit (製品コード MK139) を用いてブタの活性型 (Gla 型) オステオカルシンを同時に測定し、Gla/Glu 型の相対評価を行うことで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 Glu-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 Pig-OC モノクローナル抗体	11 ml 用
(3) Standard Pig Glu 型オステオカルシン全長合成ペプチド 32 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、ただちに大量の水で洗い流し、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

ブタ由来生体サンプル中の Glu 型オステオカルシン量 (Pig Glu-OC) の測定

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

- 検体はブタ血清・血漿・腹水・尿・細胞培養上清等を用いる。
- 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。
- ブタ血清検体の場合、2～4倍希釈して用いるとよい。
(初回測定の場合は、検体の希釈倍率検討が必要)
- 本製品はウシ抗原とわずかに交差反応することから、ウシ血清含有培地が添加された培養サンプルの場合は、測定が妨害されるため、無血清培地への変換が必要である。
- 本製品はラット抗原とはわずかに交差反応するが、感度が低いため、ラットサンプルの測定には適さない。ラットサンプルの場合は、Rat Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK146) を使用をお勧めする。
- 本製品は、マウス、ウサギ、ヒト抗原には反応しない。

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℃凍結保存し1ヵ月安定である。ただし、凍結融解は一度までにとどめる。
- Pig Glu-OC 標準液
(3) Standard に蒸留水を 1 ml 加えて溶解し、Pig Glu-OC 標準液 (32.0 ng/ml) を調製する。これを(4) Sample Diluent で用時段階希釈して、16.0、8.0、4.0、2.0、1.0、0.5 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 Pig Glu-OC 標準液 (32.0 ng/ml) は4℃保存では1週間安定で、-20℃保存では1ヵ月安定である。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。
- 洗浄液 (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。

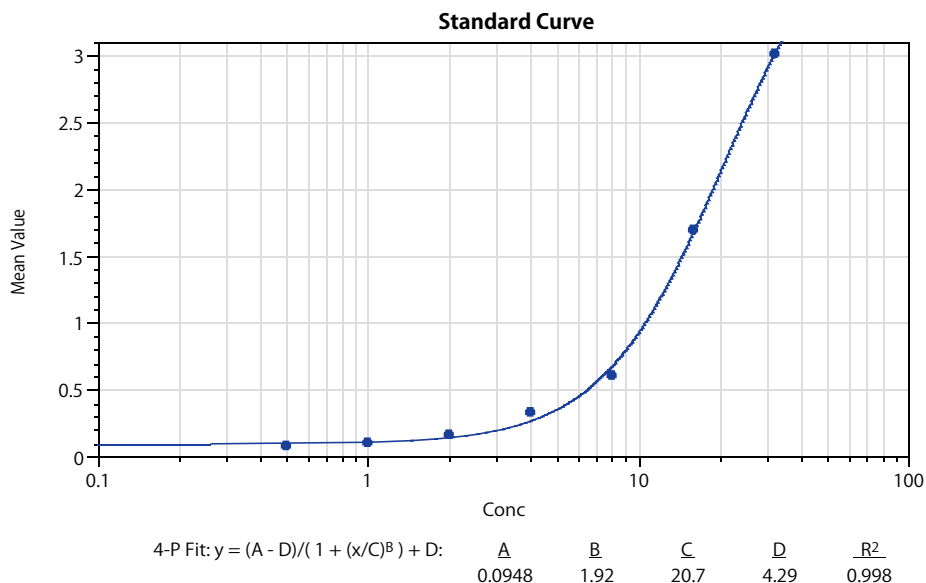
1. 各濃度の Standard および検体を 100 μ l ずつマイクロピペットで各ウェルに 2 連ずつ加え、室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で 1 時間反応させる。サンプルはあらかじめ別の 96 ウェルプレートを利用して用意し、8 連ピペット等ですみやかに (5 分以内) 投入する。プレート内の測定値の信頼を高めるためにも、1 列目と 12 列目とに標準液の希釈系列をおくとよい。37 $^{\circ}$ C の加温は抗原性をそこなう恐れがあるので室温反応にとどめること。(第一反応)
2. 反応液を捨て、0.1% Tween 20 含有 PBS で 3 回洗浄後、標識抗体液を 100 μ l ずつ 8 連ピペットで各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ 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 μ l ずつ 8 連ピペットで各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で 15 分反応させる。(第三反応)
4. 反応停止液を 100 μ 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 Pig Glu-OC 濃度を読み取る。

VII. 性能

1. 標準曲線 (Pig Glu Osteocalcin 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



Pig Glu-OC 濃度 (ng/ml)	32.0	16.0	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5	0.0
A450	3.012	1.701	0.611	0.339	0.172	0.103	0.081	0.057

(発色時間 15 分)

2. 再現性

<同時再現性試験>

ブタ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)	SD	CV (%)
コントロール A	14.9	0.99	6.8
コントロール B	7.6	0.50	6.5
コントロール C	4.2	0.51	12.1

<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	17.3	1.50	8.7
コントロール E	8.5	0.40	4.7
コントロール F	4.4	0.21	4.7

<添加回収>

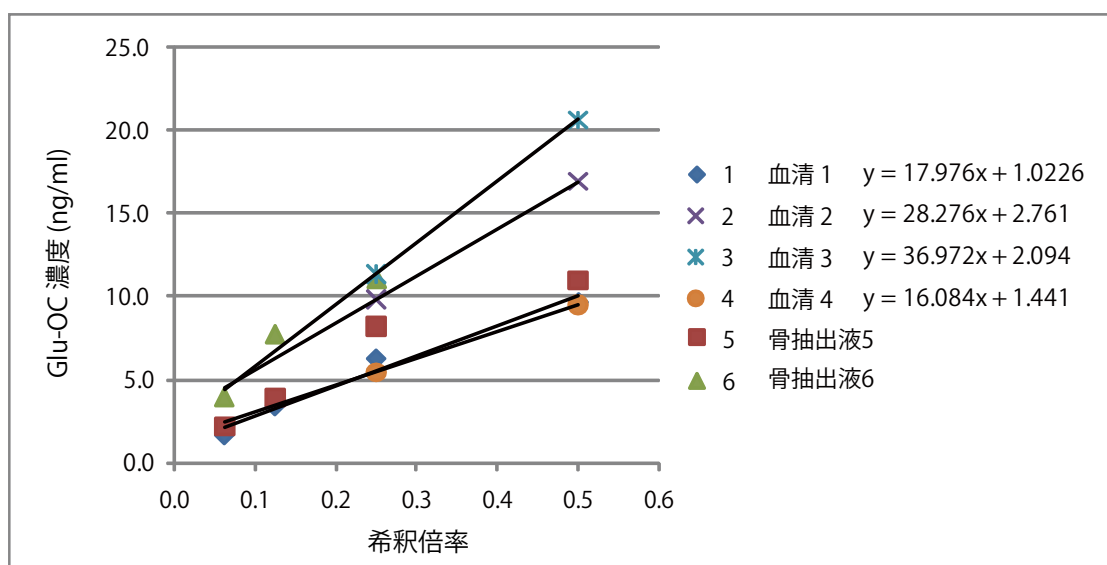
種々の濃度のサンプルを等量ずつ混合し、予想される理論値と実測値から回収率を調べた。平均的な添加回収率は、109.1%であった。

サンプル A	サンプル B	理論値 (A+B)/2	実測値	添加回収率 (%)
26.8	22.0	24.4	25.1	102.8
13.0	22.0	17.5	19.0	108.7
5.2	22.0	13.6	14.8	108.7
2.3	22.0	12.2	12.1	99.5
26.8	8.2	17.5	16.9	96.5
13.0	8.2	10.6	9.7	91.7
5.2	8.2	6.7	7.3	108.6
2.3	8.2	5.3	6.4	121.4
26.8	1.4	14.1	16.0	113.5
13.0	1.4	7.2	8.2	114.4
5.2	1.4	3.3	4.0	120.9
2.3	1.4	1.9	2.4	129.0
26.8	4.9	15.9	15.6	98.2
13.0	4.9	9.0	8.4	93.8
5.2	4.9	5.1	5.7	111.8
2.3	4.9	3.6	4.6	126.1

単位：ng/ml

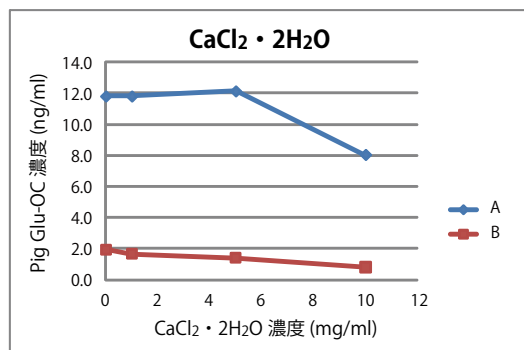
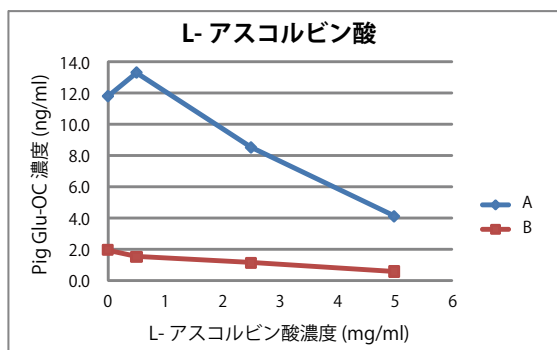
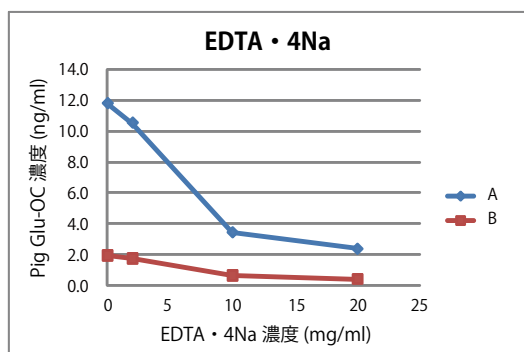
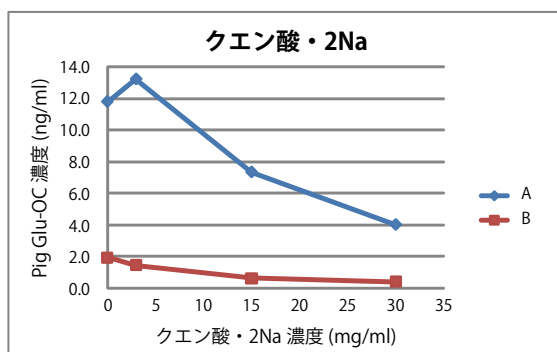
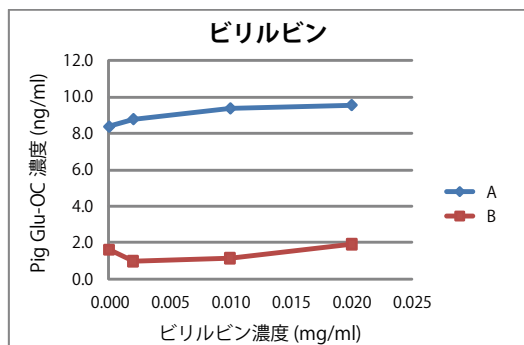
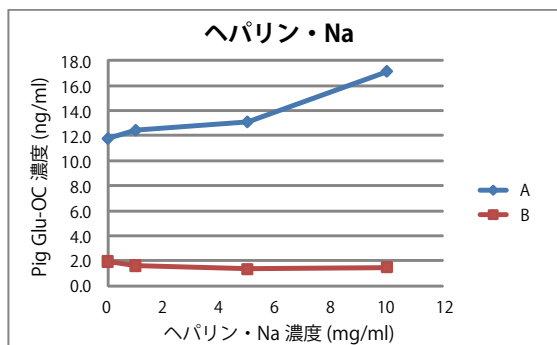
3. ブタ血清サンプルの希釈直線性

8 ヶ月齢のミニブタ血清 (1～4) とブタ骨抽出物 (5、6) の測定例である。検量線の信頼範囲から、血清の場合、2 倍または 4 倍希釈の測定が望ましい。ブタ骨抽出物の場合は、炭酸ナトリウムを含む抽出液 (pH9.5) で抽出したサンプルであり、高 pH で測定の影響を受けるため、直線性が得られるのは 4 倍希釈以上に希釈した場合である。



4. 共存物質の影響

2種類の濃度のオステオカルシン標準液 (A, B) 9容量に対し、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。



VIII. 使用例

1. ミニブタ血清サンプルの測定例

ミニブタ4頭（オス2頭、メス2頭）の個体別血清の生後8～10ヵ月齢間のGlu型オステオカルシン測定値のモニタリングを行った。測定倍率は、2倍希釈と4倍希釈の2濃度で実施した。

ミニブタ		測定倍率	
		2倍希釈	4倍希釈
個体A（メス）	8ヵ月	16.0	10.2
	9ヵ月	19.2	11.4
	10ヵ月	9.9	6.5
個体B（メス）	8ヵ月	9.1	5.4
	9ヵ月	4.2	2.9
	10ヵ月	5.0	3.5
個体C（オス）	8ヵ月	22.1	14.4
	9ヵ月	10.9	6.4
	10ヵ月	9.1	5.8
個体D（オス）	8ヵ月	19.2	12.7
	9ヵ月	12.2	7.8
	10ヵ月	10.9	6.7

<結果>

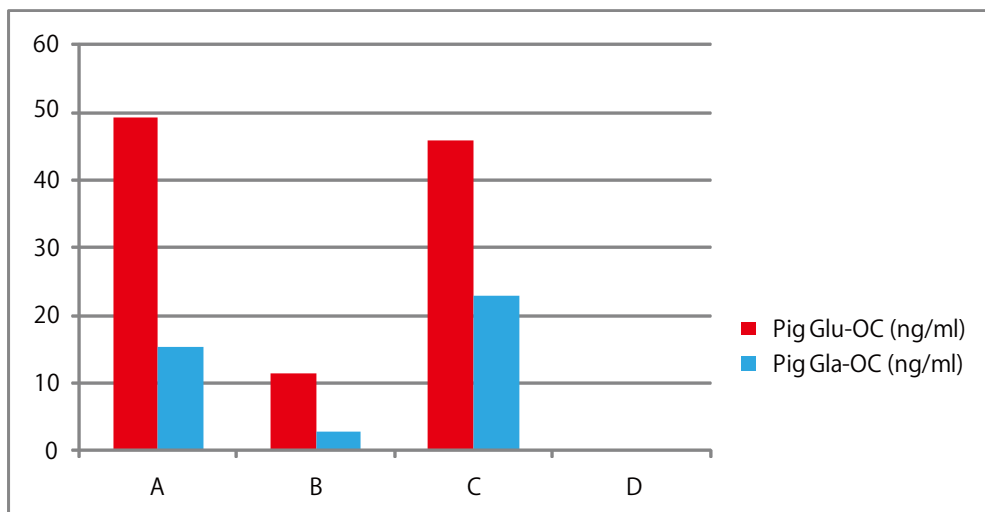
8ヵ月齢、9ヵ月齢、10ヵ月齢においてGlu型オステオカルシンの測定値が緩やかに減少した。成長期をピークとして骨代謝回転が落ち着いていく様子がうかがえる。

2. 加工食品中の豚骨由来成分のモニタリング

加工食品原料中に含まれる豚骨エキス中の Gla 型および Glu 型オステオカルシンのモニタリングを行った。

4 種類の市販インスタント食品 (A ~ D) の粉末スープを調理法に従って溶解した溶液を用いて、Gla 型および Glu 型オステオカルシンを原液で測定した。

製造過程に加熱工程があり、加熱条件によっては Gla 型オステオカルシンが脱炭酸化されていることも予想されたが、A および C の粉末スープでは、Gla 型オステオカルシンが検出感度内で測定することが可能であった。



Gla-OC : Pig Gla-Osteocalcin EIA Kit (製品コード MK139) を用いて測定

Glu-OC : Pig Glu-Osteocalcin EIA Kit (製品コード MK149) を用いて測定

<結果>

加工食品の製造工程における豚骨成分含量の定期モニタリングに本キットが応用できる可能性が示唆された。

IX. 関連製品

Pig Gla-Osteocalcin EIA Kit (製品コード MK139)
Gla-Type Osteocalcin (Gla-OC) EIA Kit (製品コード MK111)
Human Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK128)
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)

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