

製品コード MK101

研究用

Takara

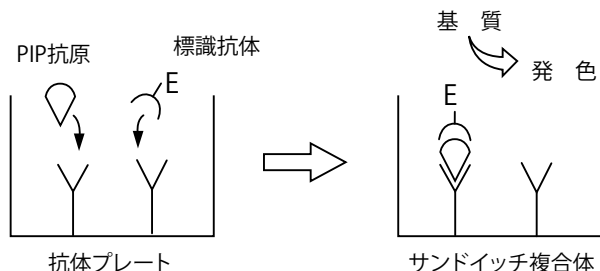
**Procollagen type I C-peptide (PIP) EIA Kit
(Precoated)**

説明書

v201605Da

I型コラーゲンは、線維芽細胞、象牙細胞、骨芽細胞より分泌されるタンパク質であり、骨組織の基質有機成分の90%以上を占めると考えられています。その前駆体タンパク質であるI型プロコラーゲンは、細胞内で合成された後、細胞外に分泌される際にエンドペプチダーゼによりその両末端プロペプチドが切断され、本体のI型コラーゲンは集合し繊維形成して細胞外マトリックスを構成します。遊離したプロペプチドは可溶性であり、生体内のコラーゲン合成量を反映する生化学的指標として注目されています。本キットはI型プロコラーゲンC末端プロペプチド(略してPIP)に特異的なモノクローナル抗体を用いた定量キットです。

I. 測定原理



II. キットの内容

- | | |
|---|-----------|
| (1) Antibody Coated Microtiterplate
抗 PIP モノクローナル抗体プレート (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 PIP モノクローナル抗体 | 11 ml 用 |
| (3) Standard (凍結乾燥品)
ヒト培養細胞由来プロコラーゲン 640 ng | 1 ml 用 |
| (4) Sample Diluent
1% ウシ血清アルブミン含有 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. 保存 4℃

IV. 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。
- 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)

V. 使用目的

ヒト、ウシ、イヌ、ウマ，サル培養細胞中およびその培養上清中、血液中のプロコラーゲンC末端ペプチドの測定に有用です。

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

・ 検体は無血清培養細胞抽出液、無血清培養上清*および血清（ヒト血清の場合5～10倍希釈）等を用いる。

*：牛胎児血清、馬血清など動物血清が添加された培養上清液は、高いバックグラウンドが生じ測定が妨害されることがあります。なるべく無血清培養条件下での実験実施をおすすめいたします。やむをえず血清含有培地を使用される場合は **VIII. 測定に関する基本資料 6. 培養細胞上清の測定例3** をご参照ください。

・ 検体は2～10℃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。

・ 検体の希釈は後述する希釈曲線を参考に、高値が予想される検体を含む測定の場合、(4) Sample Diluent を用いてすべての検体を3ないし4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。

・ PIP 標準液

(3) Standard に蒸留水 1 ml を加え溶解し、PIP 標準液 (640 ng/ml) を調製する。
これを (4) Sample Diluent で用時段階希釈して、320、160、80、40、20、10 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。
PIP 標準液 (640 ng/ml) は - 20℃ 保存で 1 ヶ月安定である。

・ 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。1 ヶ月にわたる保存は - 20℃ とする。

・ 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。
本品は硫酸を含まないペルオキシダーゼ反応停止液である。

注：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充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、充分に混合後、洗浄用 PBS として使用する。

注：本キットでは、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

- ・測定は二連測定で行う。
 - ・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. 標識抗体液を 100 μ l ずつプレートの各ウェルに加えた後、あらかじめ調製した各濃度の PIP 標準液及び検体を 20 μ l ずつマイクロピペットで 2 連ずつ各ウェルに加え、37°C で 3 時間反応する。サンプルの投入はすみやかに (5 分以内) 行う (第一反応)。可能ならば PIP 標準液の希釈系列を 1 列と 12 列とに取りその平均値で検量線を作成し、2 列から 11 列の検体を定量することが望ましい。
 2. 反応液を捨て、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°C) で 15 分間反応させる (第二反応)。
 3. Stop Solution* 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。
* : Stop Solution は粘度の高い溶液であるため、添加後プレートミキサー等で十分混合してください。
 4. 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。
 5. グラフ用紙の横軸に各 PIP 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 PIP 濃度を読み取る。

<ご注意>

本キットを用いて EIA アッセイを行う場合、「3. 操作法」のステップ 1 で、各ウェルに標識抗体液および PIP 標準液あるいは検体を投入した時点ではミキシングにより試薬を混合することをお勧めしますが、その後の 3 時間の反応は、静置状態で行ってください。また、加温および室温反応中は、溶液の蒸発を防ぐためにフィルムなどでプレートを覆ってください。

VII. 性能

1. 標準曲線

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。

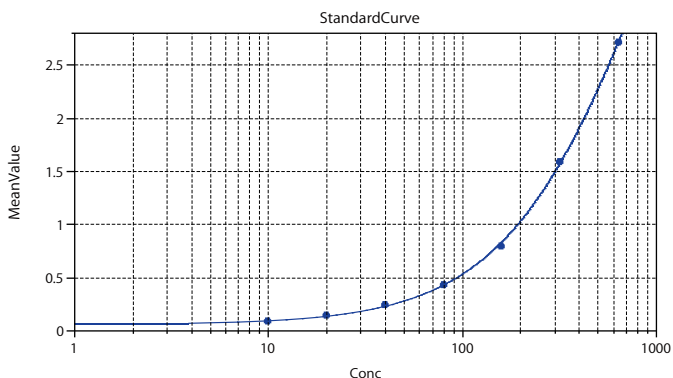
最少検出感度は 10 ng/ml

Curve Fit : 4-Parameter

Corr. Coeff : - 1.00

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

A = 0.0491 B = 0.933 C = 542. D = 4.34



PIP (ng/ml)	640	320	160	80	40	20	10	0
A ₄₅₀	2.709	1.593	0.797	0.435	0.240	0.141	0.087	0.040

2. 再現性

同時再現性

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。
(n = 16)

PIP EIA 同時再現性 (n = 16)

	平均値 (ng/ml)	標準偏差 (ng/ml)	CV 値 (%)
コントロール A	484.8	35.64	7.4
コントロール B	87.3	6.282	7.2
コントロール C	31.7	1.411	4.5

日差再現性

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。

PIP EIA 日差再現性 (n = 3)

	平均値 (ng/ml)	標準偏差 (ng/ml)	CV 値 (%)
コントロール A	466.1	20.25	4.3
コントロール B	90.7	4.349	4.8
コントロール C	29.6	1.873	6.3

3. 添加回収試験

様々な濃度の検体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。

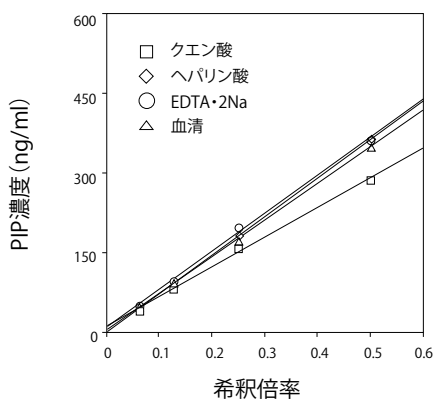
単位：ng/ml

サンプル A	サンプル B	A + B 実測値	A + B 理論値	回収率 (%)
390.8	0.0	217.3	195.4	111
390.8	390.8	410.0	390.8	105
390.8	219.8	328.7	305.3	108
390.8	110.8	272.8	250.8	109
390.8	55.9	245.7	223.3	110
390.8	31.4	238.8	211.1	113
219.8	0.0	118.1	109.9	107
219.8	219.8	272.5	219.8	124
219.8	110.8	179.6	165.3	109
219.8	55.9	145.0	137.8	105
219.8	31.4	126.2	125.6	100
110.8	0.0	57.5	55.4	104
110.8	110.8	111.6	110.8	101
110.8	55.9	99.5	83.3	119
110.8	31.4	83.7	71.1	118
55.9	0.0	25.6	27.9	92
55.9	55.9	56.6	55.9	101
55.9	31.4	41.4	43.6	95
31.4	0.0	14.3	15.7	91
31.4	31.4	30.4	31.4	97

VIII. 測定に関する基本資料

1. 健康人の血漿および血清検体の希釈曲線

同一人から同時に異なる採血条件（抗凝固剤）で採取したサンプルを用いて希釈曲線をかいている。



抗凝固剤の影響によるPIP濃度の変化

$$y = 562.087x + 10.361$$

$$r = 0.998$$

クエン酸・Na

$$y = 737.475x - 1.196$$

$$r = 1.000$$

ヘパリン酸・Na

$$y = 715.951x + 8.274$$

$$r = 0.998$$

EDTA・2Na

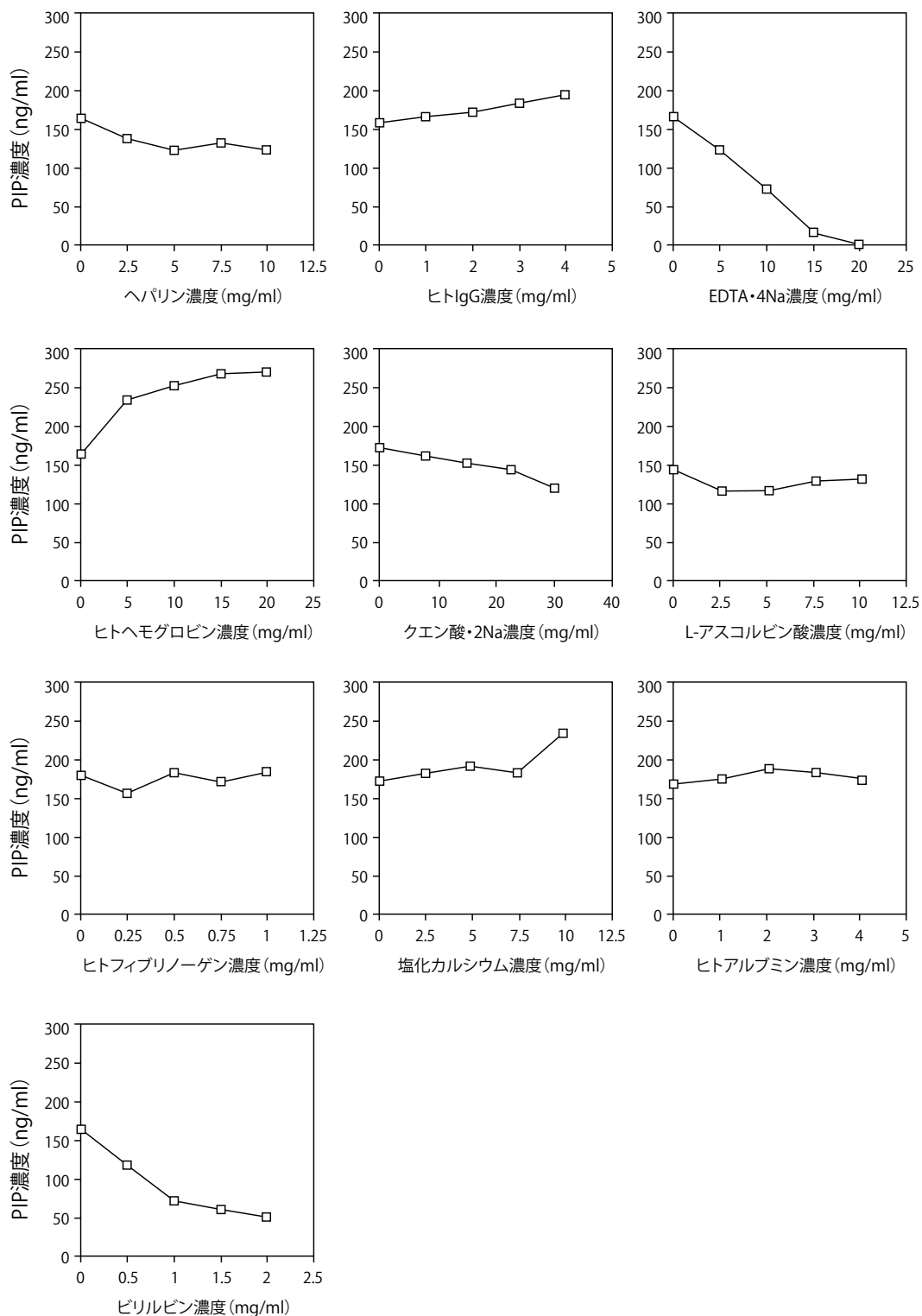
$$y = 692.856x + 4.487$$

$$r = 1.000$$

血清

2. 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。



3. Two-step 法への応用による高感度化

キットに含まれる構成試薬をそのまま用いて Two-step 法への応用が可能です。検出した抗原がかなり少ないと予想されたり、また検体中にアジ化ナトリウムのような (2) Antibody-POD Conjugate を阻害するおそれのある物質が含まれる場合などに有効です。

方法

- (3) Standard (640 ng) を (4) Sample Diluent により希釈して、160 ng/ml を調製しこれを最高濃度として段階希釈により標準液を調製する。
- 各濃度の (3) Standard および検体を 100 μ l ずつ抗体プレートに加え、37°C で 2 時間反応させる。サンプルの投入は 5 分以内に行うことが望ましい。
- 反応液を捨てた後、PBS で 3 回洗浄する。
- (2) Antibody-POD Conjugate を 100 μ l ずつ各ウェルに加え、37°C で 1 時間反応させる。
- 反応液を捨てた後、PBS で 4 回洗浄する。
- (5) Substrate Solution (TMBZ) を 100 μ l ずつ各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30°C) で 15 分間発色反応させる。
- Stop Solution 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。
- 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。
- グラフ用紙の横軸に各 PIP 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 PIP 濃度を読み取る。

4. 培養細胞上清の測定例 1：ヒト間葉系幹細胞：hMSC の骨芽細胞誘導モニタリング

ヒト間葉系幹細胞 (Lonza 社 Cat. PT-2501) を骨芽細胞へ誘導させる実験において、培養上清中のI型プロコラーゲン産生能を本キットで経時的に測定した。サンプルの希釈倍率の決定には、事前にコントロール細胞と分化細胞での培養上清の希釈系列をとる予備検討を実施し、最終的に3の6乗(729)倍希釈と3の7乗(2,187)倍希釈での倍率での測定を実施した。表中のMSCGM 培地 (B) は、ヒト間葉系幹細胞専用培地 (Lonza 社 Cat. PT-3001) のみの測定値を表している。

間葉系幹細胞 骨芽誘導モニタリング

単位：ng/ml

サンプル名	測定倍率	実測換算値		(A) - (B)
		サンプル (A)	MSCGM 培地 (B)	
hMSC 3 day Control	× 3 ⁶	16.67	2.72	13.95
	× 3 ⁷	4.73	0.00	4.73
hMSC 3 day 骨芽誘導	× 3 ⁶	19.24	2.72	16.52
	× 3 ⁷	8.56	0.00	8.56
培地交換				
hMSC 7 day 骨芽誘導	× 3 ⁶	82.18	2.72	79.46
	× 3 ⁷	35.57	0.00	35.57
hMSC 10 day 骨芽誘導	× 3 ⁶	63.67	2.72	60.95
	× 3 ⁷	31.74	0.00	31.74
培地交換				
hMSC 14 day 骨芽誘導	× 3 ⁶	111.50	2.72	108.78
	× 3 ⁷	54.51	0.00	54.51
培地交換				
hMSC 21 day 骨芽誘導	× 3 ⁶	161.10	2.72	158.38
	× 3 ⁷	74.44	0.00	74.44

<結果>

分化誘導とともに、生産されるプロコラーゲン量が極めて多くなる様子が観察された。

5. 培養細胞上清の測定例 2：ヒト骨芽細胞 (NHOst) 培養上清中の I 型プロコラーゲン産生量の測定

正常ヒト骨芽細胞 (Lonza 社 Cat. CC-2538) を 10% ウシ胎児血清 (FCS) を含む専用培地 (OGM 培地) で培養し、上清中のコラーゲン量の変化を調べた。培地交換は、1 週間に 1 度の割合で行った。

NHOst 培養上清

単位：ng/ml

サンプル名	測定倍率	実測換算値		(A) - (B)
		サンプル (A)	OGM 培地 (B)	
NHOst day 10	× 20	111.50	41.66	69.84
	× 40	74.88	20.76	54.12
NHOst day 14	× 20	181.80	41.66	140.14
	× 40	108.10	20.76	87.34
NHOst day 35	× 20	393.40	41.66	351.74
	× 40	201.60	20.76	180.84

<結果>

サンプル測定の希釈倍率は、予備検討により、20 倍と 40 倍希釈が適当だと判断された。培地中の FCS 由来ウシ抗原の影響は、この希釈倍率においては軽減されている。細胞の成長にあわせて培養上清中のプロコラーゲン濃度が上昇していく様子がわかる。

6. 培養細胞上清の測定例 3：ウシ胎児血清 (FCS) に含まれるウシ抗原の影響

本キットで培養上清中のサンプルを測定する際には、培地に添加されるウシ胎児血清由来・ウシ PIP 抗原によるバックグラウンドの影響を考慮する必要がある。ウシ胎児血清のロット差を含めてどれくらいの測定値が予想されるかを調査した。いずれも RPMI1640 培地に 10% になるように添加したものを測定した。また、10% 血清培地で培養した細胞上清についても、同時測定した。

10% FCS/RPMI1640 培地のみ測定

単位：ng/ml

10% FCS/RPMI1640 培地で培養した細胞培養上清

単位：ng/ml

FCS	希釈倍率	実測換算値	サンプル名	希釈倍率	実測換算値
1. A 社	× 3 ³	69.61	培地のみ	× 3 ³	70.93
	× 3 ⁴	21.14		× 3 ⁴	25.49
2. B 社	× 3 ³	88.04	MES.SA ヒト子宮肉腫	× 3 ³	143.60
	× 3 ⁴	29.67		× 3 ⁴	73.92
3. C 社	× 3 ³	73.39			
	× 3 ⁴	29.04			
4. D 社	× 3 ³	109.40			
	× 3 ⁴	50.50			

<結果>

プロコラーゲン産生量の多い細胞の場合には、3 の 3 乗倍希釈で測定し、培地単独での測定値を差し引くことで血清含有培地の培養上清でも測定が可能だと思われる。また、ウシ胎児血清のロットが異なる場合でも、10% 含有培地では、大きな濃度差がなく、上記の倍率以上に希釈することでウシ抗原によるバックグラウンドの影響を抑えることができる。

IX. 使用上の注意

1. ロット番号の異なるキットおよ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 に用いるピペットは金属が使われていないものを使用してください。
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。

X. 関連製品

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

[間葉系幹細胞]

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC-BM) (製品コード C-12974)
ヒト臍帯マトリックス由来間葉系幹細胞 (hMSC-UC) (製品コード C-12971)
ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (hMSC-AT) (製品コード C-12977)

間葉系幹細胞増殖培地 (Ready-to-use) (製品コード C-28009)
間葉系幹細胞増殖培地 DXF(Ready-to-use) (製品コード C-28019)

[骨芽細胞]

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)

[皮膚線維芽細胞]

正常ヒト皮膚線維芽細胞 (小児) (NHDF), juvenile foreskin (製品コード C-12300)
線維芽細胞増殖培地キット (製品コード C-23110)
線維芽細胞増殖培地 (Ready-to-use) (製品コード C-23010)

正常ヒト皮膚線維芽細胞 (成人) (NHDF), adult donor (製品コード C-12302)
線維芽細胞増殖培地 2 キット (製品コード C-23120)
線維芽細胞増殖培地 2(Ready-to-use) (製品コード C-23020)

XI. 参考文献

- 1) 中塚喜義ほか (1992) 日本骨代謝学会誌 第 10 巻 2 号 p173-180
- 2) Kanayama,N., and Terao,T. (1992) *Gynecol Obstet Invest.* **34**, 24-26.
- 3) 芳賀俊介ほか (1990) 医学と薬学 24 巻 p1047-1053
- 4) 浜副隆一ほか (1992) 日本癌治療学会誌 27 巻 p1-7

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