

製品コード MK103

研究用

Takara

Human Vitronectin EIA Kit

説明書

v201905Da

ビトロネクチン (Vitronectin : VN) は、補体結合タンパク質 S- プロテインとしても知られている血中の主要な接着タンパク質で、血中には高濃度に存在しています。ビトロネクチンは、ビトロネクチンレセプターを保有する細胞に対して接着活性を持つほか、コラーゲン、ヘパリンなどの物質、またプラスミノーゲン活性化阻害因子 -1 (PAI-1)、トロンビン、アンチトロンビン III 複合体など多種の血液凝固調節因子と結合し、血管内での免疫系および凝固線溶系に関連していると考えられています。ビトロネクチンは、分子量 75 kDa、アミノ酸 459 個 (前駆体は 478 個) からなる 1 本鎖ポリペプチド構造をしており、細胞結合部に RGD (Arg-Gly-Asp) 配列を持ち、中央配列にはヘモペキシン (Hemopexin) と呼ばれる血中のヘム結合タンパク質と類似配列の繰り返しが見られます。C 末端領域には、特殊構造である【結んで開いて】モデルのヘパリン結合部位があり、尿素等の変性剤存在下でヘパリンカラムに結合させて高純度に単離することができます。C 末端近傍の 398 ~ 399 位は、アミノ酸の変異により切断される場合がありますが、血中では 75 kDa のほかに 398 ~ 399 位の間で切断された分子量 65 kDa の分子も多く存在しますが、この 2 つの構造を持つ意味や生理的機能はわかっていません。

本キットは、血中ビトロネクチンの 2 つの分子 (65 kDa、75 kDa) をいずれも検出できるモノクローナル抗体を使用した定量キットです。血中のみならず、尿中や細胞培養上清中のビトロネクチン検出にも応用できます。測定対象としてヒト、ウサギ由来サンプルを用いることができます。ウシ抗原とは交差反応しませんので、ウシ胎児血清を含む培地で培養した細胞の培養上清をそのまま測定サンプルとして用いることができます。

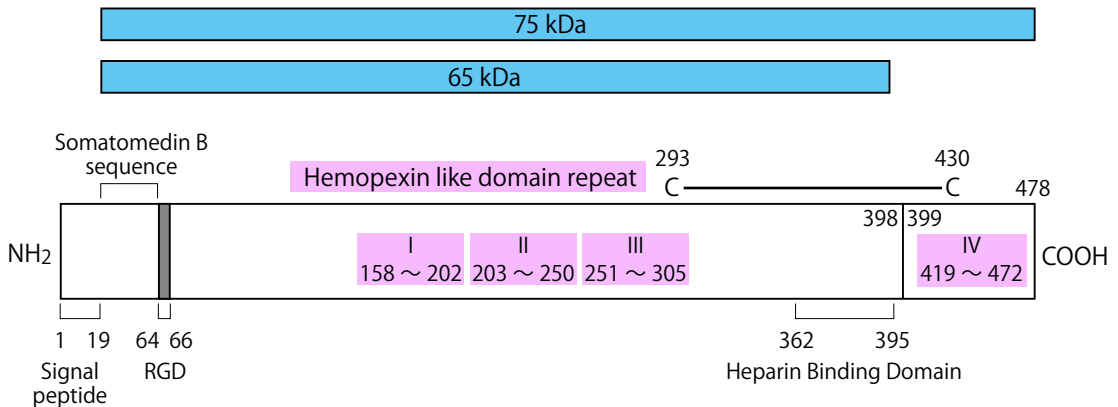


図 1. ビトロネクチンの構造

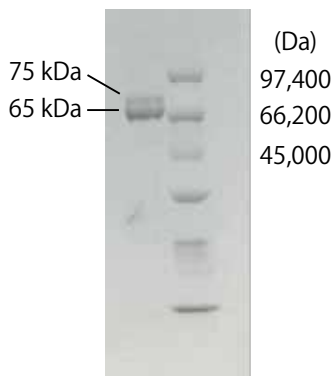
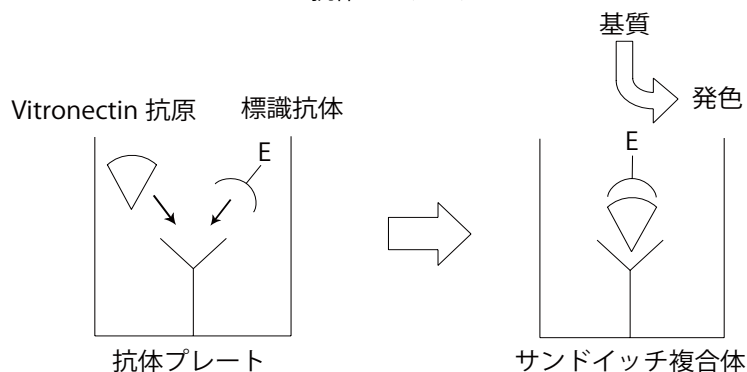


図 2. ビトロネクチン SDS-PAGE

ヒト血漿より 8 M 尿素存在下でヘパリンカラムにより精製したビトロネクチンを還元、熱処理した後、4 ~ 20% グラジエントゲルを用いて SDS-PAGE を行った。

I. 測定原理

2 抗体 1 ステップ ELISA



II. 内容

- | | |
|--|-----------|
| (1) Antibody Coated Microtiterplate
抗ヒト VN 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ヒト VN モノクローナル抗体 | 11 ml 用 |
| (3) Standard Vitronectin (凍結乾燥品)
Recombinant human Vitronectin 320 ng
(HEK293 細胞由来、75 kDa 精製ビトロネクチン) | 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および器具 (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、1 N 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 1 N 硫酸も使用できます。1 N 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)
- 蒸留水

V. 使用目的

ヒトおよびウサギの血漿 (EDTA 血漿、クエン酸血漿)、血清、尿、細胞培養上清中および培養細胞中のビトロネクチンの測定

<注意>

1. ビトロネクチンはヘパリン結合性があるため、抗凝固剤としてヘパリンを使用することはお勧めできません。
2. 保護タンパク質を含まない希薄な水溶液中でビトロネクチンを保管するとガラス容器等の器材に一部吸着されますのでご注意ください。
3. 本キットは研究用です。人や動物の診断目的には使用できません。

VI. 使用方法

1. 検体

- 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してください。
- 検体の希釈はあらかじめ予備検討が必要です。高値が予想される検体を含む場合は (4) Sample Diluent を用いて希釈してください。
- 正常血清検体の場合、標準では 500 ~ 1,000 倍程度希釈して用います。希釈する際は、まず 10 倍希釈液を調製し、その一部をさらに 50 ~ 100 倍希釈するなどの 2 段階希釈をお勧めします。
溶血や乳びが確認できるサンプルは低値が予想されますので使用しないでください。
- 1 ステップ法のため、標識抗体等がサンプル中の成分の影響を受ける恐れがあるので注意が必要です。
- 尿検体はビトロネクチン濃度が低いことが予想されますので、原液で測定することをお勧めします。血尿でないことを確認の上、測定に用いてください。
- アジ化ナトリウムを含むサンプルは標識抗体の POD 活性を阻害しますので検体として使用しないでください。やむを得ず用いる場合は、2-Step 法にて測定することができます。(VIII-5 参照)
- ウシ抗原には交差しないので血清培地成分の影響を受けずに細胞上清を直接測定できます。
- 凍結している検体は測定前に室温で溶かし、ゆるやかに転倒混和してください。
- サンプルの過剰な凍結融解は避けてください。
- 細胞抽出液を調製する場合は、以下の組成を用いることをお勧めします。
1% NP-40、1 mM EDTA、1 mM PMSF (水溶性) を含む中性領域の緩衝液
(例: PBS、pH7.4)

2. 試薬調製

- 抗体プレート [(1) Antibody Coated Microtiter plate]
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 1 週間は 4℃ で安定である。それ以上保存する場合は -20℃ 凍結する。この状態で 1 か月安定である。ただし、凍結融解は一度までにとどめる。

-
- Human Vitronectin 標準液
(3) Standard Vitronectin に蒸留水を 1 ml 加えて溶解し、Human Vitronectin 標準液 (320 ng/ml) を調製する。これを (4) Sample Diluent で用時段階希釈して、160、80、40、20、10、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 Vitronectin 標準液 (320 ng/ml) は、4℃保存で 1 週間、-20℃保存では 1 か月安定である。ただし、凍結融解は 1 回にとどめる。
 - 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 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 を蒸留水で 10 倍希釈し、さらに Tween 20 を 0.1% になるように添加する。
本キットで 96 ウェル分の反応を行う場合、300 ml 程度の洗浄液が必要である。

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. 標識抗体液を 100 μ l ずつマイクロピペットで抗体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 Vitronectin 標準液および検体を 50 μ l ずつマイクロピペットで 2 連ずつ各ウェルに加え、5 秒間プレートミキサーで混合する。溶液の蒸発を防止するためにフィルムで包み、室温 (20 ~ 30℃) で 1 時間反応させる。(第一反応)
※ 標準液および検体の投入は、あらかじめ別の 96 穴プレート等を利用して用意し、8 連ピペットなどで速やかに (5 分以内に) 抗体プレートに投入する。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、反応は室温 (20 ~ 30℃) で行う。
2. 反応液を捨て、洗浄用 0.1% Tween 20/PBS で各ウェルを 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℃) で 15 分間を目途に反応させる。(第二反応)
3. 反応停止液 (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。
* : 反応停止液 (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充分混合してください。
4. 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。
5. グラフ用紙の横軸に各標準液の濃度を、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 Vitronectin 濃度を読み取る。

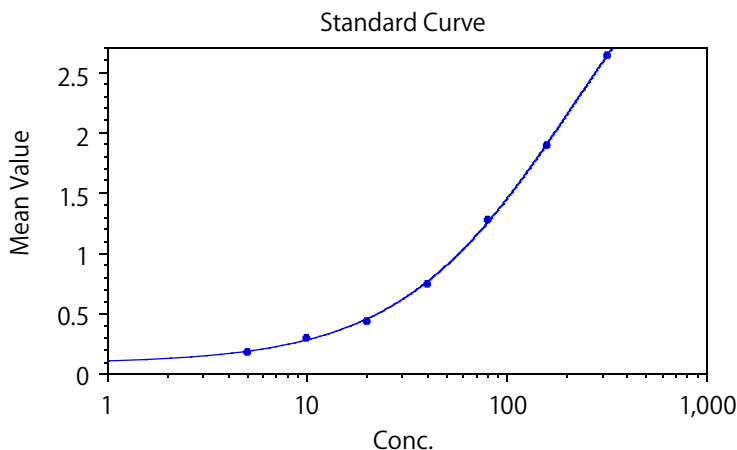
VII. 性能

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：5 ng/ml

Curve Fit：4-Parameter



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

A	B	C	D	R ²
0.0851	0.991	217	4.37	1

Vitronectin 濃度 (ng/ml)	320	160	80	40	20	10	5	0
A ₄₅₀	2.640	1.896	1.273	0.747	0.438	0.302	0.182	0.082

(発色時間：15分)

2. 再現性

<同時再現性試験 (n=8) >

3種類の濃度の Vitronectin 溶液をコントロールサンプルとして用いて再現性試験を実施した。

検体	平均値 (ng/ml)	標準偏差 (ng/ml)	CV (%)
コントロール A	148.4	7.027	4.7
コントロール B	33.5	1.430	4.3
コントロール C	12.4	0.530	4.3

<日差再現性試験 (n=3) >

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、日差再現性試験を実施した。

検体	平均値 (ng/ml)	標準偏差 (ng/ml)	CV (%)
コントロール A	155.4	9.18	5.9
コントロール B	35.3	1.62	4.6
コントロール C	12.7	0.95	7.5

3. 添加回収試験

様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から回収率を調べた。

サンプル A	サンプル B	理論値 (A+B)/2	実測値	添加回収率 (%)
320.0	160.0	240.0	229.1	95.5
320.0	80.0	200.0	165.7	82.9
160.0	80.0	120.0	107.1	89.3
80.0	40.0	60.0	67.5	112.5
80.0	20.0	50.0	43.6	87.2
29.0	11.1	20.1	20.9	104.2
118.4	11.1	64.8	55.4	85.6
118.4	5.0	61.7	55.8	90.4
29.0	5.0	17.0	16.2	95.3
11.1	5.0	8.1	8.5	105.6

(単位：ng/ml)

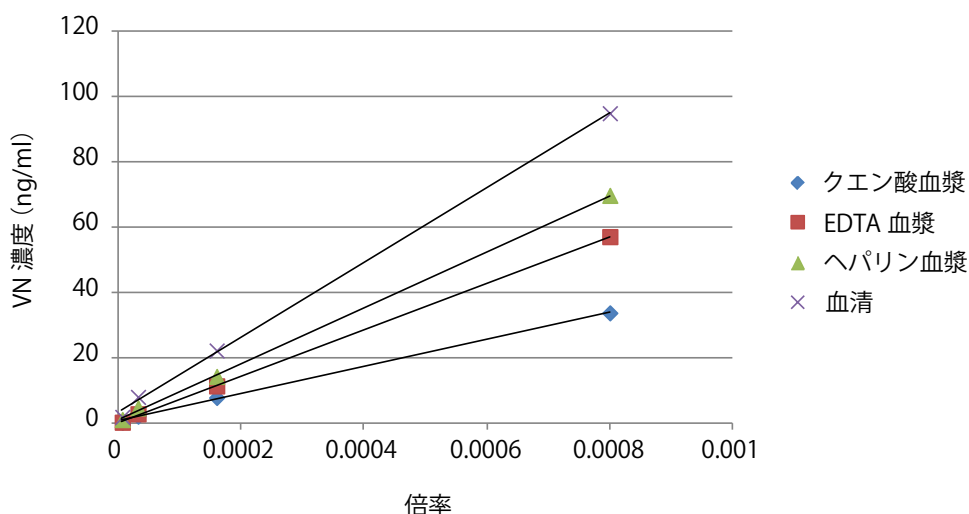
結果：上記のとおり回収率は 82.9 ~ 112.5% でした。

VIII. 測定に関する基本資料

1. 採血条件の影響

交差反応性を利用して、抗凝固剤を含む採血条件による測定値の差がどの程度みられるのかをウサギを対象に調査した。1 個体から 3 種類の抗凝固剤を使用してほぼ同時に血液を採取し、血漿を調製した。また、何も加えず血液を採取して血清とした場合とあわせて、4 つの採血方法での測定比較を行った。

倍率		ウサギ VN 濃度 (ng/ml)			
		クエン酸血漿	EDTA 血漿	ヘパリン血漿	血清
×1,250	(0.0008)	33.9	57.3	69.9	95.1
×6,250	(0.00016)	8.0	11.5	14.5	22.4
×31,250	(0.000032)	2.3	3.0	4.8	8.2
×156,250	(0.0000064)	0.4	0.4	1.2	2.1



<結果>

抗凝固剤により測定値にかなり変動がみられることから、採血条件は一定にする必要がある。

2. サンプルの凍結融解の影響

Vitronectin 標準液を用いて凍結融解に対する影響を調べた。

検量線の測定範囲内に VN 濃度が入るよう調整したサンプル A および B を -80°C ~ 37°C の凍結融解を連続して 7 回繰り返し、最初のサンプルと凍結融解途中にサンプリングしたものと、最終 7 回凍結融解を経たものとを同時に定量した。

	融解初回	凍結融解 3 回後	凍結融解 7 回後
サンプル A	149.3	134.0	143.3
サンプル B	34.9	29.9	25.0

(単位：ng/ml)

<結果>

7 回の凍結融解では大きな反応性劣化はみられなかったが、低濃度の抗原に関しては低値になる傾向がみられた。

3. 器材コーティングにおけるビトロネクチンのモニタリング例

培養前処理として、ビトロネクチンを器材コーティングする際の固相化効率を比較した。

対象ビトロネクチン

- ・ *E. coli* 由来組換え VN (20-398) (WAKO code.220-02041)
- ・ ヒト血漿由来天然型ビトロネクチン (65 kDa + 75 kDa) 自家調製品

<方法>

対象のビトロネクチン溶液濃度を本キットを用いて測定した。

それぞれの Dish 器材に対して 1 ml の対象のビトロネクチン溶液を投入し、器材面に均一に広げた。一定時間固相化した後、Dish を傾けてビトロネクチン溶液を回収し、原液および 2 倍希釈での残留ビトロネクチン濃度の測定を行った。

固相化 37°C 3 時間の場合と 4°C 一晚 (16 時間) の場合で、残留ビトロネクチン量の比較を行った。

<結果>

37°C 3 時間のコーティングで仕込みの 99% のビトロネクチン成分が固相化できた。さらに 4°C 一晚 (16 時間) では固相化率としてはほぼ 100% であった。市販の培養 Dish の器材の特性に従い、固相化効率の変動する傾向がはっきりとみられた。細胞培養用に処理されている Dish への固相化効率は無処理 Dish に比べて明らかに良好であることが示された。固相化するビトロネクチンの濃度による固相化率もこの手法で調べることができると予想される。

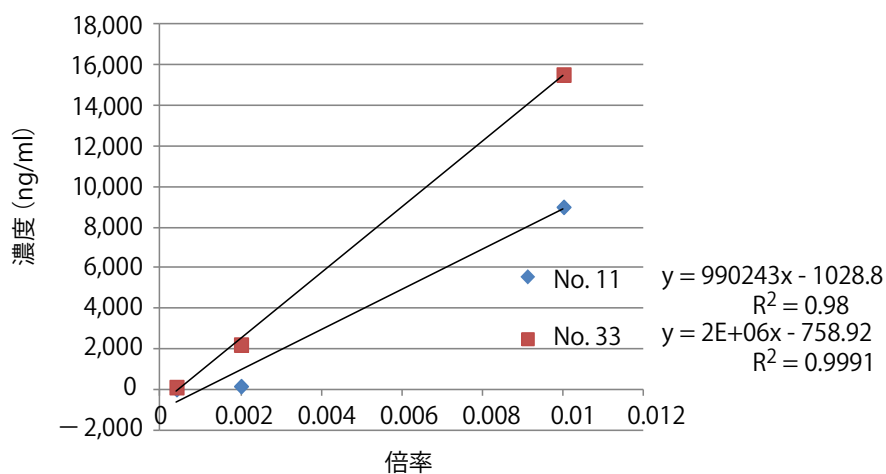
固相化溶液 1 ml/Dish	<i>E. coli</i> 由来組換え VN (MK103 での定量：5,752 ng/ml)			ヒト血漿由来 VN (MK103 での定量：562 ng/ml)		
	37°C、3 hr	4°C、16 hr	測定倍率	37°C、3 hr	4°C、16 hr	測定倍率
φ 60 mm Dish						
Dish 器材 (メーカーコード)	コーティング後回収液の残留 VN 濃度 (ng/ml)					
BD/PRIMARIA (code. 3082)	13.4	1.1	× 1	1.8	0.0	× 1
	9.0	0.7	× 2	1.2	0.0	× 2
BD/for Cell Culture (code. 3002)	32.0	2.5	× 1	1.3	0.9	× 1
	17.3	1.6	× 2	0.7	1.2	× 2
IWAKI/non-Coat (code. 1010-060)	46.8	41.6	× 1	5.0	3.6	× 1
	21.2	20.5	× 2	3.0	1.0	× 2
IWAKI/for Cell Culture (code. 3010-060)	23.3	0.0	× 1	0.8	0.0	× 1
	11.1	0.0	× 2	0.0	0.0	× 2

4. 各種血液サンプルの測定例

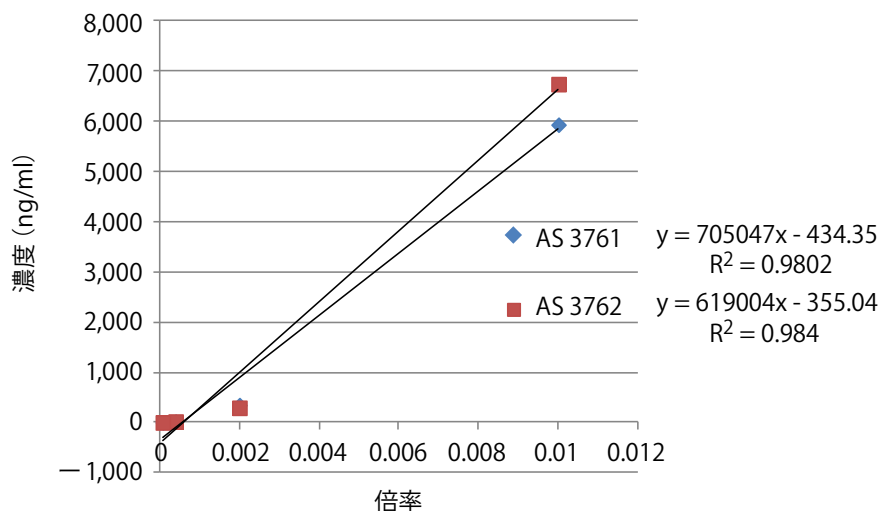
		ウサギ (ng/ml)		ヒト (ng/ml)	
		血漿	血清	血漿	血清
倍率		AS 3761	AS 3762	No.11	No.33
× 100	(0.01)	5934.2	6742.3	9004.2	15525.5
× 500	(0.002)	349.3	295.0	168.1	2214.5
× 2,500	(0.0004)	19.0	21.3	20.3	119.2
× 12,500	(0.00008)	2.5	3.0	2.8	23.9

血液サンプルの希釈倍率は、× 500～× 2,500 の範囲で測定するとよい。

ヒト血液サンプル



ウサギ血液サンプル



5. 2-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 2-Step 法への応用が可能です。検出した
い抗原がかなり少ない時や、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ている場合などに有効な手法です。

【方法】

- 1) (3) Standard Vitronectin (320 ng) を (4) Sample Diluent で希釈して 80 ng/ml の濃
度に調製し、これを最高濃度として希釈段階により標準液を調製する。

2-Step Vitronectin 濃度 (ng/ml)	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0
----------------------------------	----	----	----	----	---	-----	------	---

- 2) 各濃度の VN 標準液および検体を 100 μ l ずつ抗体プレートに加え、20 ~ 30°C で 1 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。
- 3) 反応液を捨てた後、0.1% Tween 20/PBS で 3 回洗浄する。
- 4) (2) Antibody-POD Conjugate を 100 μ l ずつ各 well に加え、20 ~ 30°C で 1 時間反応
させる。
- 5) 反応液を捨てた後、0.1% Tween 20/PBS で 4 回洗浄する。
- 6) (5) Substrate Solution (TMBZ) を 100 μ l ずつ各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30°C) で
10 ~ 15 分間発色反応させる。
- 7) 反応停止液を 100 μ l ずつ、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。
- 8) 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。
- 9) グラフ用紙の横軸に各 VN 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 VN 濃度を読み取る。

IX. 参考文献

- 1) Katayama, M. *et al.* (1990) 臨床検査 **34**(13): 1739-1743.
- 2) Hayashi, M. *et al.* (1985) *J Biochem.* **98**: 1135-1138.
- 3) Suzuki, S. *et al.* (1985) *EMBO J.* **4**(10): 2519-2524.

X. 関連製品

Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)
Anti Human Vitronectin, Monoclonal (Clone : VN58-1) (製品コード M017)
Vitronectin, rHuman (製品コード C-69201)

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あてないでください。
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) および Stop Solution は手や粘膜につかないようにご注意ください。
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

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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等は、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

テクニカルサポートライン

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

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社