製品コード MK115

研究用

TaKaRa

Fibronectin EIA Kit

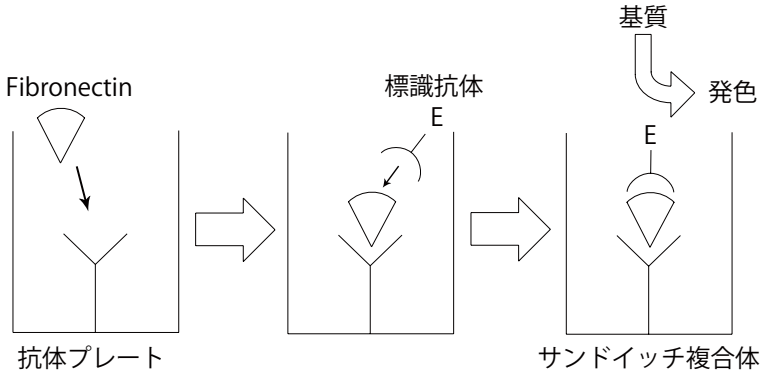
説明書

v201606Da

Fibronectin（FN）は分子量 440,000 の糖蛋白質で細胞表面や細胞外マトリックス、血中に存在する接着因子です。さまざまの細胞からも産生分泌されており、細胞表面の特異的レセプター（インテグリン）により認識されて細胞の接着や運動を制御しています。FN は特に血液中に大量に存在し、癌との関連で、癌患者の血中 FN についての測定調査は多くなされています。近年、癌患者の尿中に検出される FN（UrinaryFN：UFN）についても報告されています。（文献 1)、2)、3)）それによると尿中にはさまざまな大きさの FN フラグメントが存在していてその多くが細胞接着ドメインを含んだ断片です。従来の native FN に対するウサギポリクローナル抗体ではそれらの断片を認識できなかったために充分な定量ができませんでした。細胞接着ドメインに対する 2 つのモノクローナル抗体が得られたことによりこの尿中にあるフラグメント化した FN をもはじめて定量できるようになりました。
本キットは、ヒト Fibronectin の細胞接着ドメインに対するモノクローナル抗体を用いた ELISA キットであり、ヒト血中に限らず尿中やヒト培養細胞上清中の微量の Fibronectin やその分解物の定量に有用です。固相に固定化した抗体はヒト FN にのみ特異的に反応し、ウシ FN とは交差反応しないため、牛胎児血清を含む培地で培養したヒト細胞の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。

I. 測定原理

抗 Fibronectin 抗体で検体中の Fibronectin をとらえた後、もう一つの POD 標識した抗 Fibronectin 抗体で検体中の Fibronectin フラグメントを検出します。



II. キットの内容

(1) Antibody Coated Microtiterplate　1 plate
　抗ヒト Fibronectin 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）

(2) Antibody-POD Conjugate（凍結乾燥品）　11 ml 用
　ペルオキシダーゼ標識抗 Fibronectin 抗体

(3) Standard（凍結乾燥品）　1 ml 用
　ヒト Fibronectin 細胞接着ドメインフラグメント　800 ng

(4) Sample Diluent　11 ml × 2
　25%ブロックエース含有 PBS 含防腐剤

(5) Substrate Solution（TMBZ）　12 ml
　3,3',5,5'- テトラメチルベンジジン溶液

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セ反応停止液です。

・ 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

ヒトの培養細胞および血液に含まれる Fibronectin およびそのフラグメントの測定

VI. 使用方法

1. 検体の調製方法

検体は測定時に調製するようにする。12 時間を過ぎて測定する場合は凍結保存する。
ヒト血清および血漿検体の場合では、検体を 100 ～ 250 倍希釈して用いるのが適当である。
ヒト尿検体の場合は異常高値を除いては、原液で測定できる。ただし、クレアチニン補正が必要となる。
検体の希釈には（4）Sample Diluent を使用する。

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。

・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。それ以上保存する場合は－ 20℃で凍結する。この場合、1 ヶ月安定であるが、凍結融解は 1 回が限度である。

・ Fibronectin 標準液
(3) Standard に蒸留水 1 ml を加えて溶解し、Fibronectin 標準液（800 ng/ml）を調製する。これを (4) Sample Diluent で段階希釈して 400、200、100、50、25、12.5 ng/ml の各濃度の標準液を調製する。0 濃度は (4) Sample Diluent を用いる。希釈した標準液はその日のうちに使用する。希釈前の標準液は－ 80℃保存で 2 週間安定であるが、凍結融解は 1 回が限度である。

・基質液（(5) Substrate Solution（TMBZ））
反応に用いる前に室温に戻し、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ことを確認する。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に注意する。数回に分けて使用する場合は、あらかじめ必要量を分注しておくようにする。

・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充分に撹拌してください。

・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。充分に混合後、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 2 連で行う。
・キット中の各試薬ならびに検体は使用前に室温に戻し、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 Fibronectin 標準液および検体をマイクロピペットで 96 穴抗体プレートの各ウェルに 100 μl ずつ 2 連で加え、37℃で 1 時間反応する。この場合、サンプルをあらかじめ別の 96 穴プレートに用意しておき、8 連ピペット等で速やか（5 分以内）に抗体プレートに移すようにする。プレート内の測定値の信頼性を高めるためにも、1 列目と 12 列目の両方に標準液の希釈系列をおくとよい。（第一反応）
2. 反応液を捨て、0.1% Tween 20 含有 PBS で 3 回洗浄する。8 連ピペットを用いて標識抗体液を各ウェルに 100 μl ずつ加え、37℃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 回洗浄する。8 連ピペットを用いて (5) Substrate Solution（TMBZ）を各ウェルに 100 μl ずつ加え、室温（20 ～ 30℃）で 10 ～ 15 分間反応させる。（第三反応）
4. Substrate Solution（TMBZ）を加えた順番で Stop Solution を各ウェルに 100 μl ずつ加え、反応を止めた後よく混合する。
5. マイクロプレートリーダーを用いて波長 450 nm の吸光度を測定する。この際、蒸留水を対照としてゼロ調節を行う。発色は反応停止後 1 時間まで安定である。
6. グラフ用紙の横軸にそれぞれの Fibronectin 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 Fibronectin の濃度を読み取る。

VII. 性能

1. 標準曲線（Fibronectin EIA Kit）

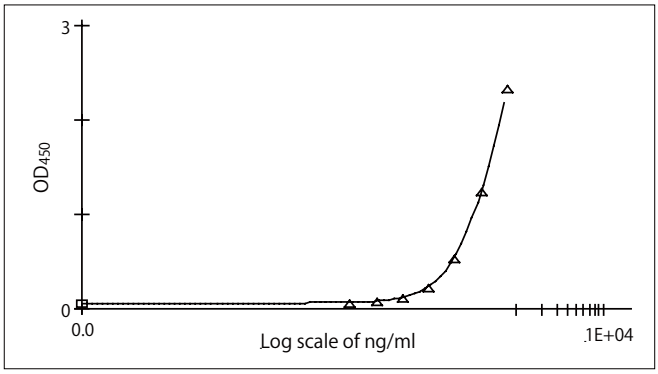
下記の標準曲線は代表的な一例である。正確な結果を得るためには、測定ごとに標準曲線を作成してください。

最小検出感度：12.5 ng/ml

Curve Fit : 4-Parameter　　Corr. Coeff : − 1.00

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

A = 0.0536　　B = 1.61　　C = 7070.　　D = 4.21



Fibronectin 濃度 (ng/ml)	800	400	200	100	50	25	12.5	0
A_{450}	2.336	1.242	0.530	0.226	0.115	0.079	0.058	0.046

（発色時間：15 分）

2. 再現性

＜同時再現性＞

3 種類のヒト血清希釈検体について、同時再現性試験を実施した。

検体（n = 16）	平均値（ng/ml）	標準偏差（ng/ml）	CV 値（%）
コントロール A	244.4	9.49	3.9
コントロール B	61.4	2.87	4.7
コントロール C	22.7	1.61	7.1

＜日差再現性＞

3 種類のヒト血清希釈検体について、3 日間にわたり Fibronectin の量を測定し、日差再現性試験を実施した。

検体（n = 3）	平均値（ng/ml）	標準偏差（ng/ml）	CV 値（%）
コントロール A	412.9	12 .91	3.1
コントロール B	124.0	7.43	6.0
コントロール C	51.3	1.87	3.6

3. 添加回収試験

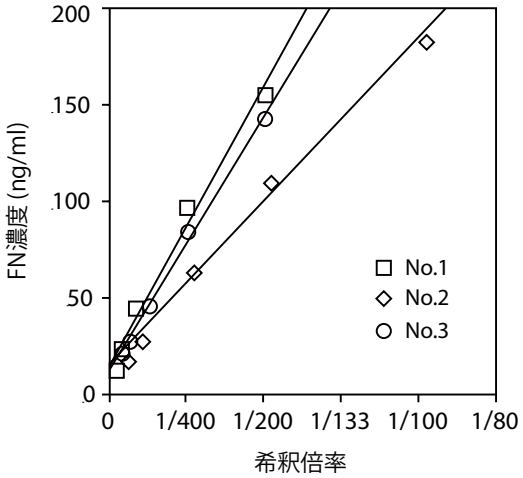
2 種類の異なる濃度の検体を等量に混合して期待される濃度と実際の測定値から添加回収率を算出した。

サンプル A	サンプル B	A ＋ B 測定値	A ＋ B 計算値	回収率%
589.0	589.0	600.4	589.0	101.9
589.0	316.7	445.4	452.9	98.4
589.0	161.8	395.2	375.4	105.3
589.0	85.6	338.8	337.3	100.4
589.0	39.5	331.3	314.2	105.4
589.0	0.0	255.1	294.5	86.6
316.7	316.7	309.2	316.7	97.6
316.7	161.8	244.5	239.3	102.2
316.7	85.6	200.2	201.2	99.5
316.7	39.5	175.0	178.1	98.3
316.7	0.0	151.0	158.4	95.4
161.8	161.8	151.7	161.8	93.8
161.8	85.6	119.8	123.7	96.8
161.8	39.5	109.0	100.6	108.3
161.8	0.0	80.2	80.9	99.1
85.6	85.6	76.4	85.6	89.3
85.6	39.5	58.6	62.5	93.7
85.6	0.0	37.7	42.8	88.0
39.5	39.5	38.6	39.5	97.7
39.5	0.0	19.8	19.7	100.5

注） 1. 単位：回収率を除くすべての数値の単位は ng/ml である。
2. 回収率＝（A ＋ B 測定値）÷（A ＋ B 計算値）× 100

4. 希釈直線性

3 種類の血清検体を用いて希釈曲線を描いた。血清は 100 倍希釈（希釈倍率 0.01）から倍々に段階希釈を実施している。一般に検体測定を実施する場合は血清、血しょうを 100 倍から 250 倍すると測定範囲内に入ると思われます。

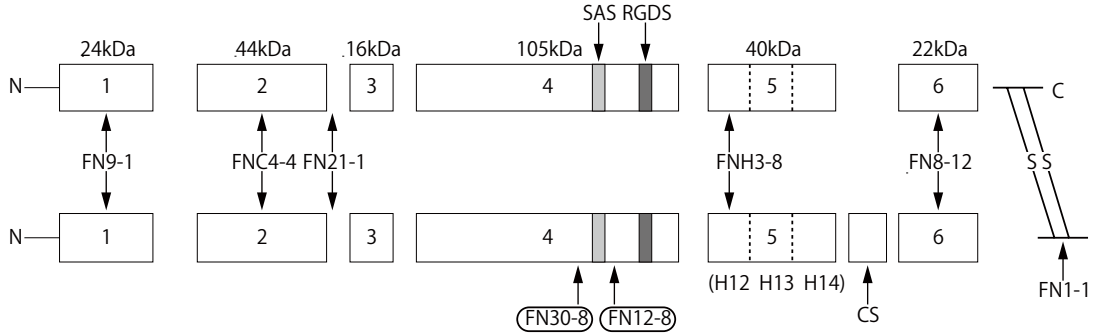


No.1：$y = 2.91 \times 10^4 x + 14.2$　　$r = 0.992$
No.2：$y = 1.71 \times 10^4 x + 14.8$　　$r = 0.996$
No.3：$y = 2.65 \times 10^4 x + 11.8$　　$r = 0.998$

VIII. 測定に関する基本資料

1. 測定に使用している抗体の認識部位

固相抗体　FN30-8；製品コード M010
標識抗体　FN12-8；製品コード M002



ドメイン構造
1：フィブリン＆ヘパリン結合ドメイン
2：コラーゲン結合ドメイン
3：ヘパリン結合ドメイン
4：細胞結合ドメイン
5：ヘパリン結合ドメイン
6：フィブリン結合ドメイン

SAS：Synergistic adhesion site
RGDS：Arg-Gly-Asp-Ser
CS：Connecting segment

≪サーモリシンによる Fibronectin の限定分解断片と各モノクローナル抗体認識ドメイン≫

クローン番号	ドメイン特異性（上図参照）	Fibronectin に対する細胞の接着への影響	ウシ抗原への交差反応性	ブタ抗原への交差反応性	ウサギ抗原への交差反応性	ラット抗原への交差反応性
FN12-8	細胞結合ドメイン	阻害効果あり	有	無	無	無
FN30-8	細胞結合ドメイン	阻害効果あり	無	無	無	無

2. 個人の尿中 Fibronectin およびその他の尿中蛋白質の日差変動

・ Fibronectin（UFN）、ラミニン（ULN）測定には、尿の原液を使用している。
・ E- カドヘリン（UEcad）測定には、尿を 9 倍希釈で使用している。
・ 採尿時間は昼間の随時尿。
・ 従来キット（MK015、MK007、MK017；終売）使用。さらに、クレアチニン（Cr）も同時測定。

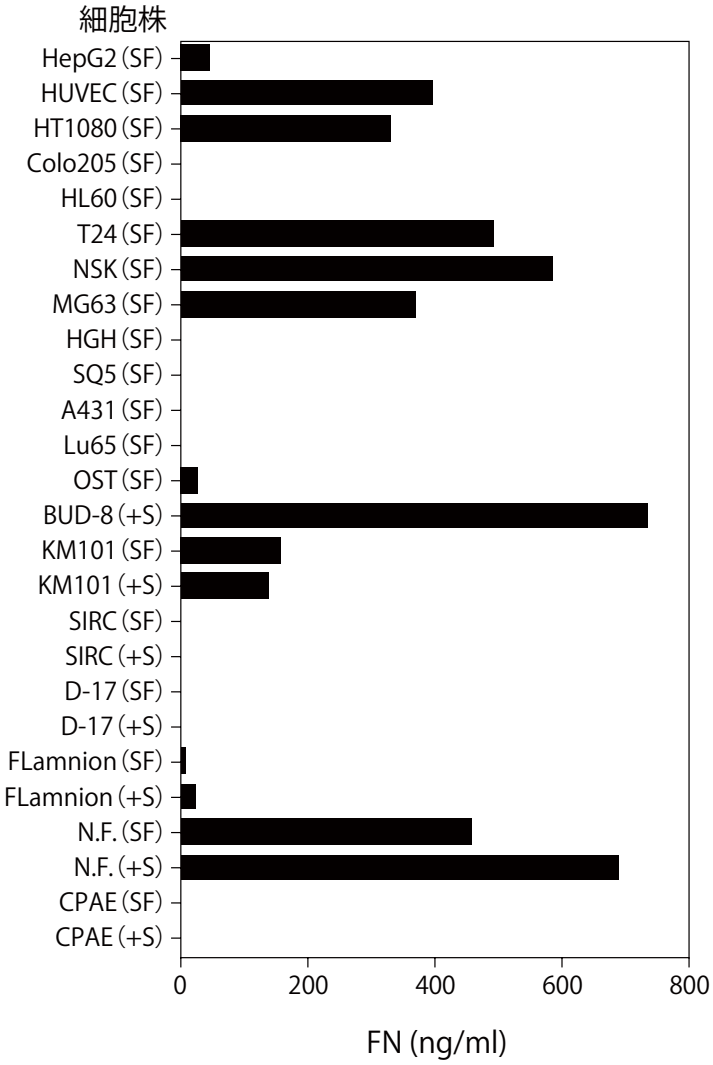
		FN (ng/ml)	Cr (g/l)	UFN(FN/Cr) (μg/g.Cr)	ULN(LN/Cr) (μg/g.Cr)	UEcad(/Cr) (mg/g.Cr)
1. female	day 1	97.1	1.264	76.8	59.8	2.82
	day 2	66.5	1.004	66.2	42.3	3.66
	day 3	45.6	0.605	75.4	59.7	4.33
	day 4	203.5	1.514	134.4	62.6	2.69
	day 5	135.0	2.346	57.5	34.8	3.42
	day 6	93.7	1.915	48.9	48.6	4.20
	day 7	131.1	1.313	99.8	66.5	3.89
	day 8	51.5	0.483	106.6	127.2	6.08
2. female	day 1	23.3	1.182	19.7	34.7	1.11
	day 2	35.9	2.045	17.6	31.4	0.59
	day 3	17.0	1.594	10.7	19.0	0.49
	day 4	33.5	1.565	21.4	42.7	0.20
	day 5	16.5	1.814	9.1	26.7	0.40
	day 6	51.5	2.562	20.1	24.8	0.22
	day 7	15.1	2.031	7.4	27.4	0.23
	day 8	23.3	1.579	14.8	38.5	0.33
3. male	day 1	69.9	1.195	58.5	45.4	0.73
	day 2	0.0	0.403	0.0	23.9	0.17
	day 3	57.3	1.016	56.4	60.5	0.86
	day 4	110.2	1.397	78.9	45.8	0.93
	day 5	2.4	0.422	5.7	39.9	1.37
	day 6	10.2	0.561	18.2	77.2	0.14
	day 7	31.6	1.466	21.6	36.4	1.17
	day 8	27.7	0.645	42.9	81.4	1.61

3. 個人の 1 日の尿中 Fibronectin およびその他の尿中蛋白質の総排泄量

	(ml) 尿量	FN (ng/ml)	Cr (g/l)	UFN(FN/Cr) (μg/g.Cr)	ULN(LN/Cr) (μg/g.Cr)	UEcad(/Cr) (mg/g.Cr)
4. male	270	199.6	1.760	113.4	65.2	0.40
	525	189.9	1.100	172.6	49.3	0.26
	70	66.5	1.489	44.7	68.3	1.04
	570	11.2	0.897	12.5	40.1	0.47
5. female	80	17.5	1.331	13.1	62.6	0.94
	100	40.3	1.441	28.0	93.7	0.80
	180	22.3	1.478	15.1	40.4	0.58
	200	45.6	0.974	46.8	54.2	1.52
	180	38.4	1.466	26.2	53.1	0.63
6. female	350	23.8	0.584	40.8	38.7	0.85
	470	11.7	0.481	24.3	24.6	1.32
	370	12.1	0.676	17.9	41.0	0.53
	180	76.7	1.548	49.5	40.4	0.50
	130	30.1	1.890	15.9	41.9	0.31
7. male	250	60.7	1.718	35.3	55.1	1.04
	150	148.6	2.759	53.9	42.7	1.47
	160	114.6	1.579	72.6	56.5	2.43
	175	141.8	2.400	59.1	68.3	1.43
	175	95.2	1.844	51.6	64.3	1.33

4. 培養細胞上清中の細胞性 Fibronectin の定量例

各種細胞株を血清培地で培養後、無血清培地に交換し、あるいは血清培地のままで本キットを用いて細胞性 Fibronectin を測定した。本キットは牛胎児血清の存在下でも測定は妨害されない。

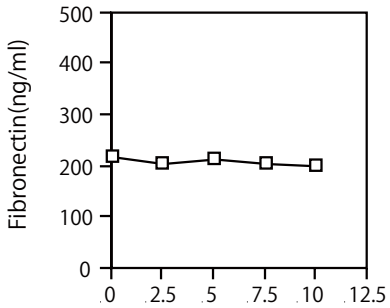


＋ S：10% FCS/RPMI1640
SF：血清培養後無血清培地変換し 2 日

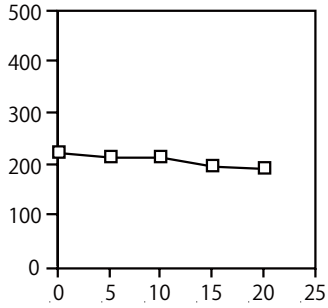
HepG2	：	ヒト肝癌細胞	A431	：	ヒト扁平上皮細胞
HUVEC	：	ヒト臍帯血管内皮細胞	Lu65	：	ヒト肺癌細胞
HT1080	：	ヒト繊維肉腫細胞	OST	：	ヒト骨肉腫細胞
Colo205	：	ヒト結腸癌細胞	KM101	：	ヒト骨髄ストローマ細胞
HL60	：	ヒト前骨髄性白血病細胞	SIRC	：	ウサギ角膜細胞
T24	：	ヒト膀胱癌細胞	D-17	：	イヌ骨肉腫細胞
NSK	：	ヒト正常皮膚細胞	FLamnion	：	ヒト羊膜細胞
MG63	：	ヒト骨肉腫細胞	N.K.	：	ヒト正常繊維芽細胞
HGH	：	ヒト心臓細胞	CPAE	：	ウシ血管内皮細胞
SQ5	：	ヒト肺癌細胞			

5. 共存物質の影響

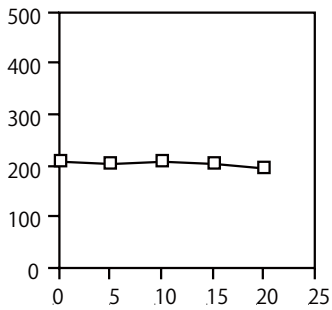
サンプル 4 容量に対して供試物質 1 容量を加え、測定系に与える影響をみた。グラフ内の供試物質濃度は終濃度で表わされている。



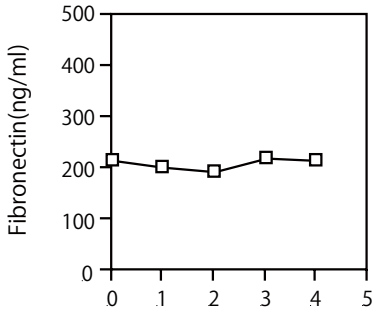
ヘパリン（mg/ml）



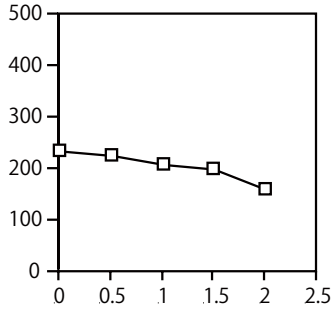
EDTA.4Na（mg/ml）



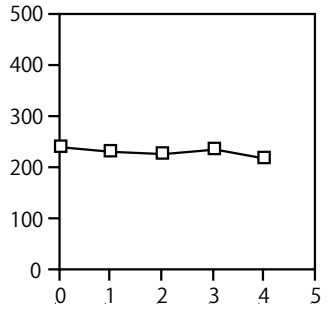
クエン酸.2Na（mg/ml）



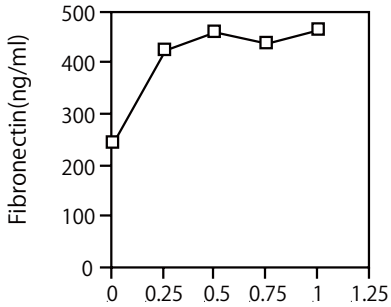
ヒトIgG（mg/ml）



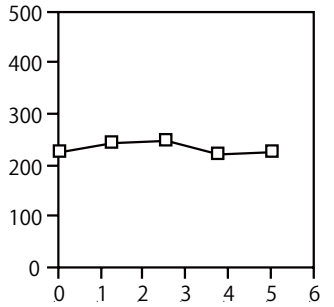
ビリルビン（mg/ml）



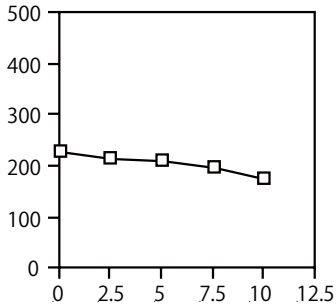
ヒトアルブミン（mg/ml）



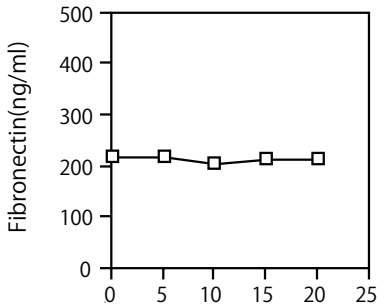
フィブリノーゲン（mg/ml）



L-アスコルビン酸（mg/ml）



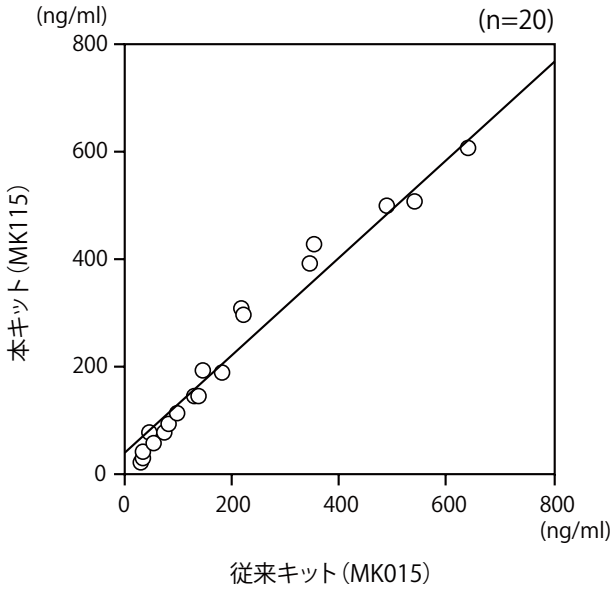
塩化カルシウム（mg/ml）



ヒトヘモグロビン（mg/ml）

6. 従来キットとの相関

従来の用時調製タイプのキット（製品コード MK015；終売）と本キット（製品コード MK115）を用いて血清検体 20 例を測定した。いずれも血清検体を 100 倍希釈して測定した値である。



y ＝ 0.909x + 35.0　　r ＝ 0.983

IX. 参考文献

1） Katayama, M. *et al.* (1989) *Exp Cell Res*. **185**, 229.
2） Katayama, M. *et al.* (1991) *Clin Chem*. **37**, 466.
3） Katayama, M. *et al.* (1993) *Clin Chem Acta*. **217**, 115.

X. 関連製品

Anti-Human Fibronectin, Monoclonal (Clone FN12-8)（製品コード MK002）
Anti-Human Fibronectin, Monoclonal (Clone FN30-8)（製品コード MK010）

XI. 使用上の注意

1. ロット番号の異なるキットや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、金属が使用されていないものを使用してください。
4. （5）Substrate Solution（TMBZ）や Stop Solution は皮膚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. 各反応は時間と温度の影響を受けますので、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

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

v201606Da