

製品コード MK128

研究用

Takara

**Human Gla-Osteocalcin
High Sensitive EIA Kit**

説明書

v201606Da

オステオカルシンは、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・非コラーゲン性タンパク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。

骨芽細胞が産生するオステオカルシンは、成熟骨芽細胞では恒常的に産生されますが、その細胞上清に産生される濃度は、数 ng/ml 程度という微量なことから測定には高い感度が要求されます。また、培養細胞の多くは、培養用培地に牛胎児血清 (Fetal Calf Serum : FCS) を添加因子として使用することから、FCS 中に含まれるウシ由来オステオカルシンとの判別が困難でした。

動物種間のオステオカルシン・アミノ酸配列比較を図 1 に示します。ウシとヒトの両者を厳密に区別するため、明確な違いがみられる N 末端 3 位・4 位の 2 つのアミノ酸の違いを認識するヒトオステオカルシン特異的モノクローナル抗体を取得し、本キットのプレート用捕捉抗体としました。これにより、ヒトとウシのオステオカルシンの判別測定を可能にしました。

本キットにより、従来の Gla-Type Osteocalcin (Gla-OC) EIA Kit (製品コード MK111) では測定が困難であったウシ血清含有培地で培養した骨芽細胞や、骨髄・間葉系幹細胞からの骨芽系分化細胞の培養上清中のオステオカルシンを直接測定することができます。

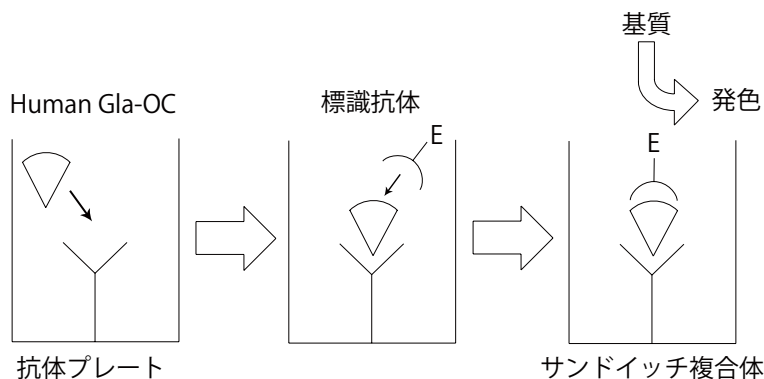
また、本キットの検出用抗体には、17 位 γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) を特異的に認識する抗体を使用しているため、骨基質 (主としてヒドロキシアパタイト) 結合性のある Gla 型 (活性型) オステオカルシンを優先的に測定します。

また、ヒト血液中のオステオカルシンも従来のキット (製品コード MK111) 同様に測定可能です。従来のキットはウシ抗原で樹立したモノクローナル抗体を使用していましたが、本キットの捕捉用モノクローナル抗体はヒト抗原特異的抗体であり、ヒト血液サンプルでの希釈直線性が向上しました。

< 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	YLYQWLGAPV	PYPDPLEPRR	EVCELNPDCD	ELADHIGFQE	AYRRFYGP-V
Bovine	YLDHWLGAPA	PYPDPLEPKR	EVCELNPDCD	ELADHIGFQE	AYRRFYGP-V
Rat	YLNGLGAPA	PYPDPLEPHR	EVCELNPDCD	ELADHIGFQD	AYKRIYGTTV
Mouse	YL----GASV	PSPDPLEPTR	EQCELNPACD	ELSDQYGLKT	AYKRIYGITI
Chicken	YAQDSGVAGA	P-PNPLEAQR	EVCELSPDCD	ELADQIGFQE	AYRRFYGP-V
Monkey	YLYQWLGAPA	PYPDPLEPKR	EVCELNPDCD	ELADHIGFQE	AYRRFYGP-V
Pig	YLDHGLGAPA	PYPDPLEPRR	EVCELNPDCD	ELADHIGFQE	AYRRFYGI-A

I. 測定原理



II. キットの内容

(1) Antibody Coated Microtiter plate 抗 Human Specific OC モノクローナル抗体 (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 Gla-OC モノクローナル抗体	11 ml 用
(3) Standard (凍結乾燥品) Human Osteocalcin synthetic Peptide 12 ng	1 ml 用
(4) Sample Diluent 25%ブロックエース含有 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

ヒト培養細胞上清中の微量な Gla 型オステオカルシン量の測定
ヒト由来生体サンプル中の Gla 型オステオカルシン量の測定

VI. 使用方法

1. 検体

- 検体は培養細胞上清および抽出液・ヒト血清・腹水等を用いる。
- 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。
- 血液サンプルの場合は、血清の使用をお勧めする。
- EDTA 血漿の使用は避けてください。
- ヒト血清検体の場合、2～10 倍希釈して用いるとよい。

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 4℃で 1 週間は安定である。それ以上保存する場合には -20℃凍結し 1 ヶ月安定である。ただし、凍結は一度までにとどめる。
- Human Gla-OC 標準液
(3) Standard に蒸留水を 1 ml 加えて溶解し、Human Gla-OC 標準液 (12.0 ng/ml) を調製する。これを (4) Sample Diluent で用時段階希釈して、12.0、6.0、3.0、1.5、0.75、0.375、0.1875 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。
Human Gla-OC 標準液 (12.0 ng/ml) は 4℃保存では 1 週間安定で、-20℃保存では 1 ヶ月安定である。ただし、凍結は一度までにとどめる。
- 基質液
(5) Substrate Solution (TMBZ) は、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。

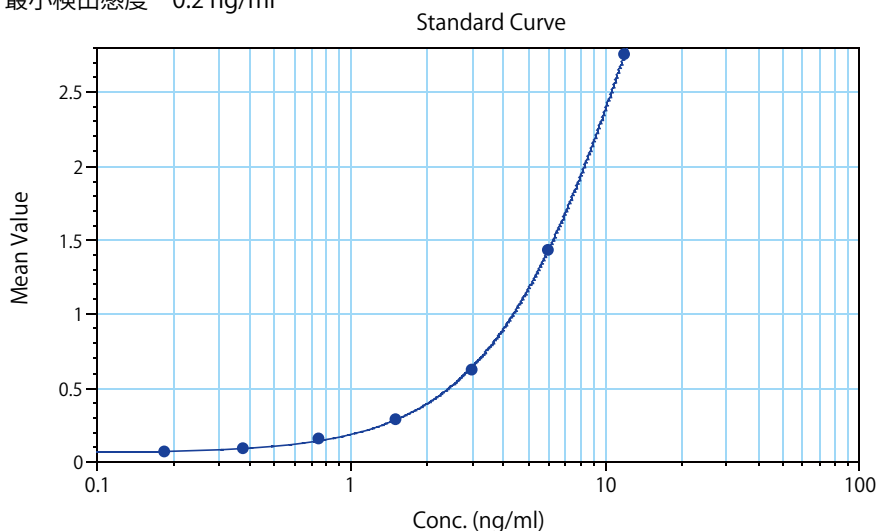
1. 各濃度の標準液およびサンプルをあらかじめ別の 96 穴プレートに用意し、8 連ピペット等ですみやかに (5 分以内) 100 μ l ずつ (1) Antibody Coated Microtiterplate の各ウェルに 2 連ずつ加え、室温 (20 ~ 30°C) * で 2 時間反応させる。プレート内の測定値の信頼性を高めるために、1 列目と 12 列目を標準液の希釈系列にするとよい。(第一反応)
* : 37°C の反応は抗原性を損なう恐れがあるため、反応は必ず室温 (20 ~ 30°C) で行う。
2. 反応液を捨て、0.1% Tween 20 含有 PBS で 3 回洗浄後、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°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°C) で 10 ~ 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 Human Gla-OC 濃度を読み取る。

VII. 性能

1. 標準曲線 (Human Gla-OC 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。

最小検出感度 0.2 ng/ml



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

$\frac{A}{0.0546}$	$\frac{B}{1.47}$	$\frac{C}{13.7}$	$\frac{D}{6.04}$	$\frac{R^2}{1}$
--------------------	------------------	------------------	------------------	-----------------

Human Gla-OC 濃度 (ng/ml)	12.0	6.0	3.0	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0
A450	2.759	1.433	0.621	0.282	0.151	0.089	0.067	0.040

(発色時間：15分)

2. 再現性

<同時再現性試験>

ヒト血漿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)	CV (%)
コントロール A	7.786	2.0
コントロール B	4.454	2.4
コントロール C	2.308	3.4

<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	7.282	6.2
コントロール B	4.344	4.7
コントロール C	2.417	4.2

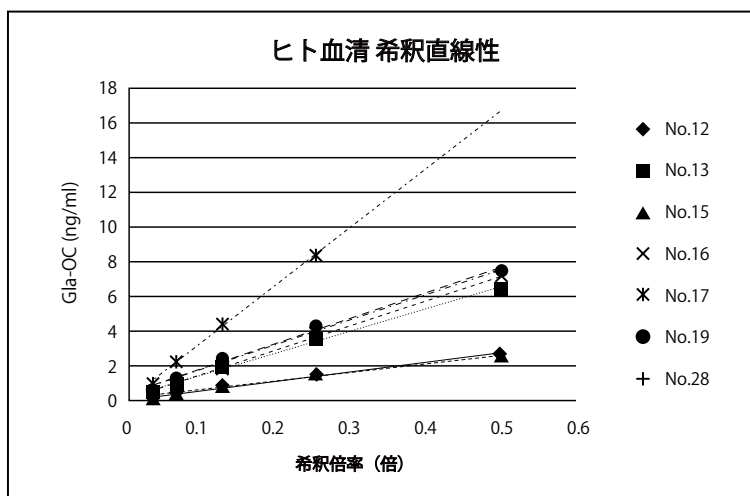
3. 添加回収

さまざま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。

サンプル A	サンプル B	A + B (実測値)	A + B (理論値)	回収率 (%)
6.297	3.767	5.151	5.032	102.36
6.297	2.626	4.512	4.462	101.13
6.297	2.041	4.380	4.169	105.06
6.297	1.556	4.269	3.927	108.72
6.297	0.800	4.133	3.549	116.47
3.767	2.626	3.208	3.197	100.36
3.767	2.041	2.914	2.904	100.34
3.767	1.556	2.669	2.662	100.28
2.626	1.556	2.104	2.091	100.62
2.041	2.626	2.295	2.334	98.35
2.041	1.556	1.795	1.799	99.81
2.041	0.800	1.511	1.421	106.37
1.556	0.800	1.179	1.178	100.08

(n = 13 単位 : ng/ml)

4. 市販ヒト血清の希釈直線性



No.12 $y = 5.4002x + 0.1109$ $r^2 = 0.9945$

No.13 $y = 12.597x + 0.2739$ $r^2 = 0.9959$

No.15 $y = 5.0061x + 0.1529$ $r^2 = 0.9835$

No.16 $y = 13.974x + 0.1739$ $r^2 = 0.9998$

No.17 $y = 33.067x + 0.1665$ $r^2 = 0.9983$

No.19 $y = 14.349x + 0.4821$ $r^2 = 0.9932$

No.28 $y = 14.307x + 0.463$ $r^2 = 0.9961$

5. サンプルの凍結融解の影響

凍結融解の Human OC 濃度に対する影響を調べた。ヒト血清を用いて凍結融解を繰り返したサンプルと初めて融解したサンプルを同時に定量した。

ヒト血清	凍結融解後	初回測定
No.15 2倍希釈	2.552	2.404
No.17 4倍希釈	7.289	7.360
No.19 2倍希釈	6.429	6.633
No.28 2倍希釈	6.145	6.354

(n = 2 単位 : ng/ml)

結果：凍結融解によりわずかに低値となる傾向がみられる。

6. 各種動物血清との交差反応

	ガチョウ	ハト	ニワトリ	シチメンチョウ
2倍希釈	ND	ND	ND	ND
4倍希釈	ND	ND	ND	ND

	ウシ	モルモット	ラット	ブタ
2倍希釈	ND	ND	ND	ND
4倍希釈	ND	ND	ND	ND

ND：検出限界以下

	カニクイザル		アカゲザル	
	血清 No.1 (2歳、オス)	血清 No.2 (2歳、オス)	血清 No.1 (3歳、メス)	血清 No.2 (3歳、メス)
2倍希釈	4.071	4.000	4.062	4.045
4倍希釈	3.838	3.970	3.831	3.850

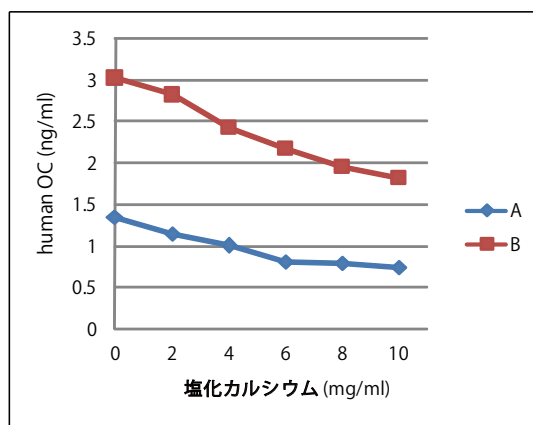
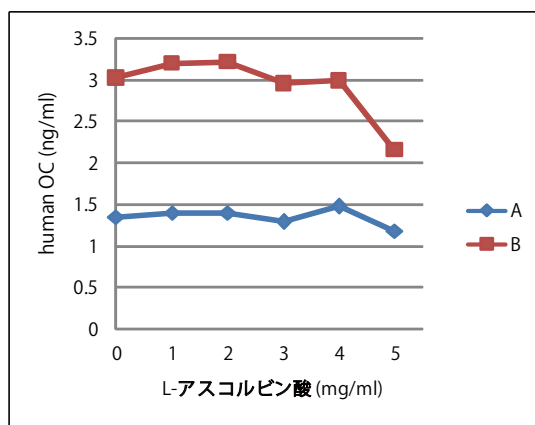
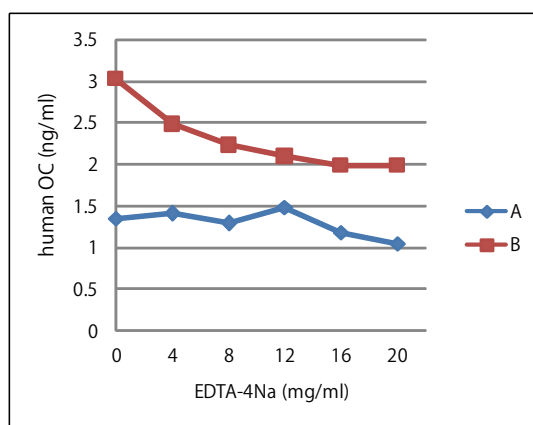
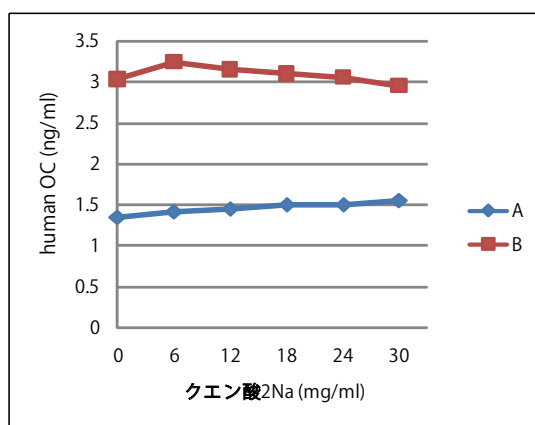
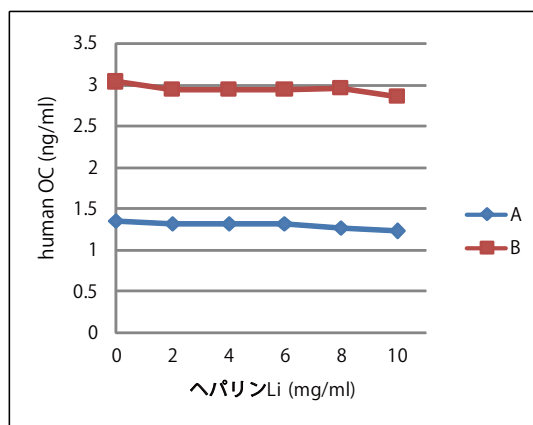
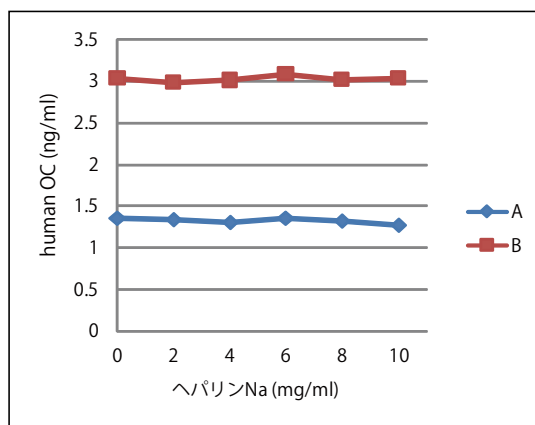
単位：A450

ND：検出限界以下

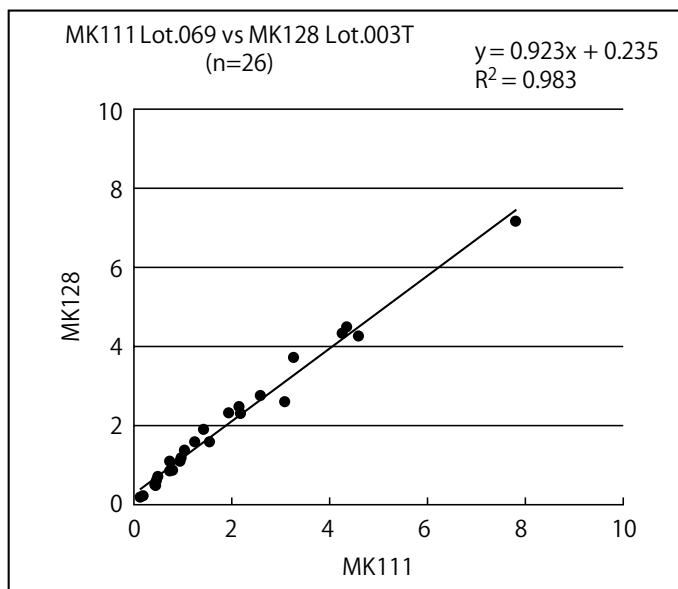
結果：ヒト以外にサル血清も測定可能と考えられる。

7. 共存物質の影響

サンプル9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わされている。



8. Gla-Type Osteocalcin (Gla-OC) EIA Kit (製品コード MK111) との相関



結果：MK111 とほぼ同等の測定値が得られる。

9. Gla 型オステオカルシンを測定する時のキットの使い分け

本キットと、従来のキット (製品コード MK111) のそれぞれの動物検体に対する交差反応性と性能から、下表のように測定サンプルにより使い分けをお勧めする。

製品コード	測定範囲	血液検体			尿検体*	ヒト培養細胞上清	
製品コード MK128 Human Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit	0.2 ~ 12 ng/ml	ヒト	サル	ウシ、ウサギ、 イヌ、ヒツジ、 ヤギ	×	ウシ血清を含む 培養サンプル	無血清培養 サンプル
		◎	○	×		◎	○
製品コード MK111 Gla-Type Osteocalcin EIA Kit	0.5 ~ 16 ng/ml	ヒト	サル	ウシ、ウサギ、 イヌ、ヒツジ、 ヤギ	×	ウシ血清を含む 培養サンプル	無血清培養 サンプル
		○	○	○		×	○

◎：推奨 ○：使用可能 ×：使用不可

*：2 抗体の認識部位が離れているため、尿中のフラグメント化された Gla-OC は検出できない。

VIII. 使用例

ヒト骨肉腫細胞のオステオカルシン産生誘導

ヒト骨肉腫細胞株 MG63 を 10%ウシ血清を含む RPMI1640 培地で培養し、骨芽細胞誘導試薬 Osteoblast-Inducer Reagent (for animal cell) (製品コード MK430) を加えて分化誘導した。経時的に培養上清を採取し、培養上清中に含まれる Gla 型 OC を本キットにより測定した。また、対照として骨芽細胞誘導試薬を添加しなかった細胞の培養上清も同時に測定した。

培養日数 (day)	誘導試薬添加	対照
1	0.055	0.049
2	0.050	0.049
3	0.050	0.049
7	0.063	0.062
10	0.146	0.101
15	0.307	0.118

A450 測定値

結果：表に示すようにウシ血清を含む培地による培養上清でも、Gla 型 OC を特異的に測定することができた。

従来の Gla-Type Osteocalcin (Gla-OC) EIA Kit (製品コード MK111) で測定した場合、ウシ由来オステオカルシンも測定するため、本実験で使用した培地 (10%ウシ血清を含む) の場合、培地のみで測定した場合でも 1 ~ 5 ng/ml の値になり、微量のヒト由来オステオカルシンの測定が困難であったが、本製品を使用した場合、微量のオステオカルシンの測定が可能になり、骨芽細胞への誘導を容易にモニタリングすることが可能である。

IX. 関連製品

Gla-Type Osteocalcin (Gla-OC) EIA Kit (製品コード MK111)

Pig Glu-Osteocalcin EIA Kit (製品コード MK149)

Pig Gla-Osteocalcin EIA Kit (製品コード MK139)

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)

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)

X. 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) 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) 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