

商品コード：EC1-E205

# ACEL **ECM 試薬シリーズ**

## ヒトコラーゲン タイプ1 ELISA

### 使用説明書

Ver.3.0

For Research Use Only



Adjusted Cell Experiment Laboratory Inc.



## 目 次

ページ

---

1.	はじめに.....	2
2.	キットの特長.....	2
3.	測定原理（競合EIA法）.....	2
4.	キットの内容.....	3
5.	準備の必要な器具、試薬.....	3
6.	測定試料調製法.....	3
(1)	培養細胞：培養上清中のコラーゲン濃度測定.....	4
(2)	培養細胞：細胞外マトリックスとして沈着したコラーゲン濃度測定.....	4
7.	アッセイ方法.....	5
(1)	標準液の調製.....	5
(2)	測定液（標準液または測定試料とビオチン標識コラーゲン抗体溶液の混合液）の調製.....	5
(3)	HRP標識アビジン溶液の調製.....	6
(4)	Wash bufferの調製.....	6
(5)	測定操作手順.....	6
8.	測定値の算出法.....	7
(1)	算出例.....	7
9.	システムの性能.....	8
(1)	交差反応性.....	8
(2)	測定限界.....	8
10.	キット使用上の注意.....	8
11.	お問い合わせの前に.....	9
(1)	吸光度が低すぎる.....	9
(2)	吸光度が高すぎる/zero standard値が高すぎる.....	9
(3)	測定の精度、再現性が良くない.....	9

## 1. はじめに

1型コラーゲンは、ほとんどすべての結合組織に存在し、腱、真皮および骨に特に多く存在します。本キットでは、サンプルをペプシン処理したアテロコラーゲン（テロペプチドを分解したコラーゲン）を定量します。そのため、培養細胞および組織等、あらゆる原料中のコラーゲン濃度を測定することが可能です。

## 2. キットの特長

- ・ 予めプレートにコラーゲンを固定化してありますので、短時間（反応時間 2 時間 15 分）でコラーゲンの定量が可能です。
- ・ 96 穴マイクロタイタープレートを利用しているため、多数のサンプルの同時測定が可能です。
- ・ 1 キットで最大 40 検体までアッセイできます（2 重測定の場合）。
- ・ アイソトープを利用しないため、特殊な装置、設備は不要です。
- ・ プレートはストリップタイプ（8 wells/strip）となっていますので、分割使用が可能です。

## 3. 測定原理(競合 EIA 法)

ヒト I 型アテロコラーゲンに対して特異的に反応するポリクローナル抗体を用いた競合 EIA 法です。

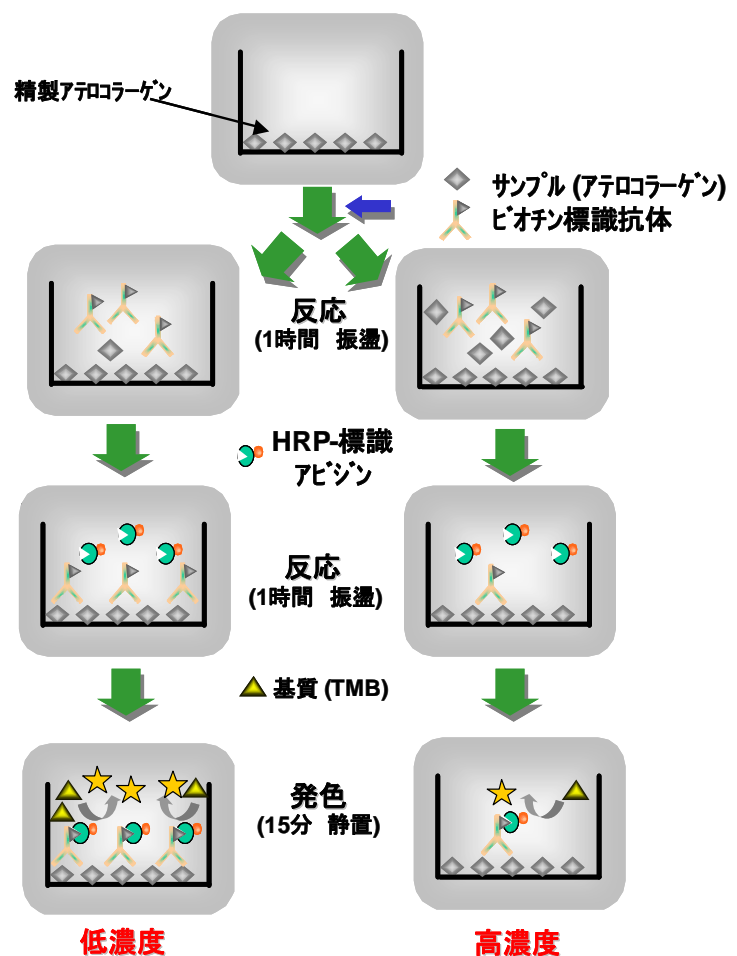
精製アテロコラーゲンを固相化してある 96 穴マイクロタイタープレートのウェルに、アテロコラーゲン含有試料とビオチン標識抗アテロコラーゲン抗体の混合液を添加します。

洗浄後、ペルオキシダーゼ（HRP）標識アビジンを加え、プレート上のアテロコラーゲンに反応したビオチン標識抗体と反応させます。

洗浄後、HRP の基質であるテトラメチルベンジジン（TMB）を加え酵素反応を行い、反応液の吸光度を 450nm で測定します。

この際、試料中のコラーゲン濃度が高くなるにつれ、ビオチン標識抗体および HRP 標識アビジンが少なくなるため、発色量が減少していきます。

反対に、試料中のコラーゲン濃度が低くなるにつれ、ビオチン標識抗体および HRP 標識アビジンが多くなり、発色量が増加するため、標準曲線は、右下がりのグラフとなります。





#### 4. キットの内容

No.	品名	容量
①	<b>Collagen coated microtiter plate</b> (Collagen 固相化マイクロタイタープレート) アッセイに必要な数のストリップ (8 wells/strip) を取り出して使用してください。残りのストリップは添付の plate seal で密封し、袋内に戻して 2~8°C にて保存してください。開封後は 30 日以内に使用してください。	96 well, 12 strip
②	<b>Collagen standard (コラーゲン標準品)</b> コラーゲン標準品の濃度は、3,000 $\mu$ g/mL です。希釈系列を作製し、検量線用標準液を調製します。希釈系列の調製法は、標準液の調製の項目 (p.5) を参照してください。 ※十分に遠心してからご使用下さい。	20 $\mu$ L
③	<b>Biotinylated anti-collagen antibody concentrate</b> (ビオチン標識コラーゲン抗体溶液) そのまま使用します。 ※十分に遠心してからご使用下さい。	0.8mL
④	<b>Avidin-HRP conjugate concentrate</b> (HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)標識アビジン濃縮液) 使用前に diluent B (HRP 標識体希釈液) で 100 倍希釈して使用します。希釈法は溶液の調製の項目 (p.6) を参照してください。 ※十分に遠心してからご使用下さい。	0.07mL
⑤	<b>Diluent A (標準品/サンプル希釈液)</b> コラーゲン標準品およびサンプルの希釈に使用します。	10mL
⑥	<b>Diluent B (HRP 標識体希釈液)</b> HRP 標識アビジン溶液の希釈に使用します。	10mL
⑦	<b>Wash buffer concentrate (10 倍濃縮洗浄原液)</b> 蒸留水あるいは脱イオン水にて希釈して使用します。希釈法は溶液の調製の項目 (p.6) を参照してください。	50mL
⑧	<b>TMB substrate (TMB 基質)</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine。そのまま使用します。	7mL
⑨	<b>Stop solution (反応停止液)</b> 1 N 硫酸。そのまま使用します。	7mL
⑩	<b>Plate seal (プレートシール)</b> 必要に応じて、適宜切り取って使用します。	2 枚
⑪	<b>Pepsin (ペプシン)</b> 50mM の酢酸に溶かして使用します。	500mg

#### 5. 準備の必要な器具、試薬

- ・ マイクロピペットおよびチップ (10~100  $\mu$  L、100~500  $\mu$  L)
- ・ 1.5mL チューブ
- ・ メスシリンダー (500mL)
- ・ 蒸留水あるいは脱イオン水
- ・ マイクロプレート用振とう器
- ・ 450nm が測定可能なプレートリーダー
- ・ 50mM 酢酸溶液 (細胞外マトリックス中のコラーゲン測定試料調整用)
- ・ 中和液 (200mM Tris, 150mM NaCl) ※pH を調製する必要はありません。

## 6. 測定試料調製法

### (1) 培養細胞:培養上清中のコラーゲン濃度測定

コラーゲン産生細胞（線維芽細胞等）の培養を行った場合、培養上清中のコラーゲンは、プロコラーゲンおよびトロポコラーゲンとして存在します。これらのコラーゲンはそのまま培養上清中のコラーゲン濃度として測定することができます（ペプシン処理は必要ありません）。培養上清をそのまま原液のまま測る事も出来ます。ただ、濃度が濃い場合には Diluent A もしくは PBS、TBS で希釈をして下さい。

### (2) 培養細胞:細胞外マトリックスとして沈着したコラーゲン濃度測定

シャーレ上でコラーゲン産生細胞（線維芽細胞等）の培養を行った場合、培養上清に放出されたコラーゲンは細胞外マトリックスとして沈着します。以下の方法により、沈着したコラーゲン濃度を測定することができます。

- ① 必要量のペプシン溶液を調製します（50mM 酢酸溶液に 0.1mg/mL となるようにペプシンを溶解します）。
- ② シャーレから培養液を除き、葉さじの反対側のヘラ部分等で細胞を剥がします。
- ③ 培養液の 1/5 量（例：細胞がコンフルエントに増殖した場合、24 穴プレート：0.1mL、6cm シャーレ：1mL）のペプシン溶液をシャーレに加えます。
- ④ 4℃で一晩振盪します（ペプシン溶液が蒸発しないようにパラフィルムシール等を貼って下さい）。
- ⑤ ④のペプシン溶液をマイクロチューブなどに移し、10,000 g、10 分の遠心を行い、上清を回収します。
- ⑥ 加えたペプシン溶液の 3 分の 1 の量の中和溶液（200mM Tris, 150mM NaCl）を加え転倒混和により十分攪拌し、測定用試料とします。

## 7. アッセイ方法

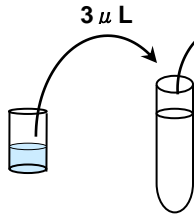
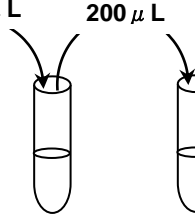
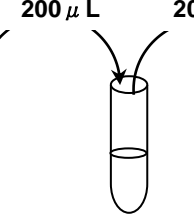
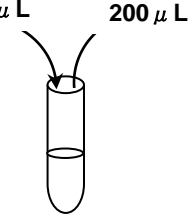
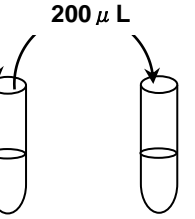

アッセイを始める前に必ずお読みください。

### (1) 標準液の調製

コラーゲン標準品の調製は、以後の測定に大きく影響します。下記手順に従い、間違えの無いよう調製を行ってください。

- ① コラーゲン標準品の濃度は  $3,000 \mu\text{g/mL}$  です。
- ② 上記コラーゲン標準品を Diluent A (コラーゲン標準品/サンプル希釈液) で、下図を参照し 2 倍希釈系列を作製してください。但し、STD-1 の調整時のみ、コラーゲン標準品  $3 \mu\text{L}$  に対し Diluent A  $897 \mu\text{L}$  で希釈 (300 倍希釈) して下さい。
- ③ 調製した希釈系列は、希釈系列毎にチューブを軽く叩くことにより十分攪拌してください (vortex はしないこと)。
- ④ 希釈系列の調製は、測定毎に行ってください。

標準液調製例

希釈系列	STD-1	STD-2	STD-3	STD-4	STD-5	STD-6	STD-7
	3 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
							
Diluent A 量	897 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
最終量	700 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$

### (2) 測定液 (標準液または測定試料とビオチン標識コラーゲン抗体溶液の混合液) の調製

「6. 測定試料調製法の(1) / (2)」で調製した測定試料、または、「7. アッセイ方法の(1)」で調製した標準液とビオチン標識コラーゲン抗体溶液とを 9:1 の割合 (2 重測定の場合は、測定試料及び標準液  $126 \mu\text{L}$  とビオチン標識コラーゲン抗体溶液  $14 \mu\text{L}$ ) で混合し、よく攪拌します。

\* 混合液を調製後は、なるべく速やかにプレートへの分注を行ってください。長時間放置しておくと測定結果に影響を与える可能性がありますので、調製後は 1 時間以内に使用してください。

### (3) HRP 標識アビジン溶液の調製

注意：溶液を攪拌する際は、激しく攪拌しすぎて泡化しないよう注意してください。

Diluent B (HRP 標識体希釈液) 6mL に Avidin-HRP conjugate concentrate を 60  $\mu$  L 添加し、よく攪拌します。プレートのスプリットを分割使用する場合は、使用量に応じて各試薬量を調製してください (例：4 スプリットを使用する場合、2m L の Diluent B (HRP 標識体希釈液) に 20  $\mu$  L の Avidin-HRP conjugate concentrate を添加)。

### (4) Wash buffer の調製

- ① Wash buffer concentrate (10 倍濃縮洗浄原液) の全量を 500mL のメスシリンダーに移し、蒸留水あるいは脱イオン水を加えて最終容量を 500mL に調製してください。
- ② メスシリンダーにパラフィルム等で蓋をし、転倒混和等でよく攪拌してください。
- ③ 調製後は 2~8°C で保存し、30 日以内にご使用ください。

### (5) 測定操作手順

各試薬等は使用直前に室温に戻してから使用してください。

- ① 標準液 (「(1) 標準液の調製」参照) および測定液 (「(2) 測定液の調製」参照) の調製を行ってください
- ② 測定用試料および標準液の測定に必要な数の strip (8wells/strip) を用意します。各測定は 2 重以上で行ってください。
- ③ (4)にて調製した Wash buffer を 200  $\mu$  L/ウェルで加え、全てのウェルを 3 回洗浄します。
- ④ (2)にて調製した標準液および測定試料とビオチン標識コラーゲン抗体溶液との混合液をそれぞれのウェルに 50  $\mu$  l ずつ加えます。
- ⑤ プレートをシールで覆い、プレート振とう器を用いて、サンプル溶液が飛散してシールにつかない程度に緩やかに振とうしながら、室温 (20~28°C) で 1 時間反応させます。
- ⑥ 反応後、(4)にて調製した Wash buffer を 200  $\mu$  L/ウェルで加え、全てのウェルを 3 回洗浄します。
- ⑦ (3)にて調製した HRP 標識アビジン溶液をそれぞれのウェルに 50  $\mu$  l ずつ加えます。
- ⑧ プレートをシールで覆い、プレート振とう器を用いて、サンプル溶液が飛散してシールにつかない程度に緩やかに振とうしながら、室温 (20~28°C) で 1 時間反応させます。
- ⑨ 反応後、(4)にて調製した Wash buffer で全てのウェルを 3 回洗浄します。
- ⑩ 全てのウェルに 50  $\mu$  L の TMB substrate を加えます。
- ⑪ 室温(20~28°C)で正確に 15 分間静置します。振とうしないでください。サンプル数が多い場合は、各サンプルの反応時間が一定になるようにご注意ください。
- ⑫ 全てのウェルに 50  $\mu$  L の Stop solution を加えます。
- ⑬ プレートをプレート振とう器を用いて、サンプル溶液が飛散しない程度に緩やかに振とうしながら、室温 (20~28°C) で 1 分攪拌します。
- ⑭ 10 分以内に 450nm の吸光度を測定します。



## 8. 測定値の算出法

標準曲線を元に、試料中のコラーゲン濃度を算出します。

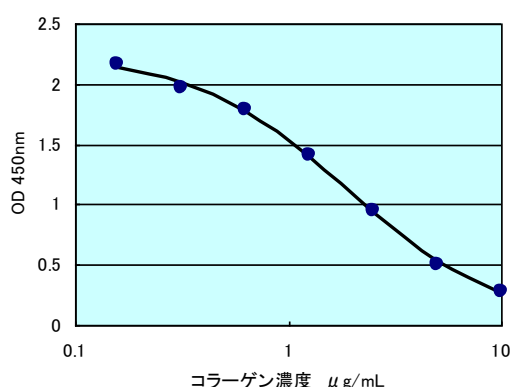
注意 1：標準曲線は、測定ごとに作成してください。

注意 2：定量範囲を越えた高濃度の試料は、測定範囲内に入るように Diluent A（コラーゲン標準品／サンプル希釈液）にて適宜希釈して再度測定しなおしてください。

### (1) 算出例

① 標準曲線を 4 parameter logistic model にて回帰した例を示します。

標準曲線例



$$Y = ((A - D) / (1 + (X/C)^B)) + D$$

X: サンプル中のコラーゲン濃度

Y: サンプルの吸光度 (OD<sub>450</sub>)

A: X 軸最小値の漸近線に対する Y 軸値

B: 曲線中心部の漸近線からの変化の大きさを表す値

C: A と D の中点に対応する X 軸値

D: X 軸最大値の漸近線に対する Y 軸値

\* SOFTmax (Molecular Devices Corp.) にて解析

② サンプルの測定値を回帰式に代入して得られる濃度に、希釈倍率、濃縮倍率を掛け合わせるにより、試料中のコラーゲン濃度を算出します。

<算出例>

- 標準曲線の回帰式を次のように変形します。

$$X = C \times ((A - Y) / (Y - D))^{(1/B)}$$

- サンプルの吸光度 Y (OD<sub>450</sub>) を回帰式に代入し、サンプルのコラーゲン濃度を算出します。

例： サンプルの吸光度 = 1.0

A = 2.244, B = 1.190, C = 1.938, D = 0.019 とした場合

$$X = 1.938 \times (2.244 - 1.0) / (1.0 - 0.019)^{(1/1.190)} = 2.4 \mu\text{g/mL}$$

- 得られた値を、サンプルを希釈した倍数で掛ける。

例： ペプシン処理及び中和処理によりサンプルが 2 倍に希釈された場合

$$X = 2.0 \times 2 = 4.0 \mu\text{g/mL}$$



## 9. システムの性能

### (1) 交差反応性

他種および他のタイプに対する交差反応性を、ヒトコラーゲン タイプ1に対する反応性 (100%) と比較しました。

Table 1 交差反応性

サンプル	交差反応性 (%)
ウシコラーゲン タイプ1	0.0
ヒトコラーゲン タイプ2	5.6
ヒトコラーゲン タイプ3	10.0

### (2) 測定限界

下限 : 0.02  $\mu$ g/mL

上限 : 40  $\mu$ g/mL

吸光度の平均値と SD 値から限界濃度を算出しました。

## 10. キット使用上の注意

- ・ 本製品は、試験研究用に製造されたものです。人、動物の診断目的での使用は絶対にしないでください。また、人体への投与は絶対にしないでください。
- ・ 実験中は適切な保護服を常に着用し、試薬が皮膚や目等に直接接触したり体内に入ることのないよう注意深く取り扱ってください。万一、そのようなことが起きた場合には直ちに大量の水で洗浄するなどし、医師の指示を受けてください。
- ・ 活性剤が含まれているものもありますので、激しい攪拌による過剰な泡化は避けてください。
- ・ 全操作を通じて、プレートの底面や各ウェルの上部には触れないようにしてください。プレート底面の汚れやコンタミネーションにより測定誤差の原因になります。
- ・ スタANDARDおよびサンプルは必ず2重以上で測定してください。
- ・ アッセイ毎に検量線を作成してください。
- ・ 洗浄操作は特に重要ですので、必ず完全に、かつ各ウェルとも同じ様に洗浄してください。プレートウォッシャーを使用する際は、使用前にノズルの動きをチェックしてから始めてください。御使用になるプレートウォッシャーの機種によっては、洗浄が不十分になることもありますので、その時は洗浄回数を増やしてください。
- ・ 異なったロットのキット間での試薬の使い回しはしないでください。
- ・ 使用期限を越えた試薬は使用しないでください。



## 11. お問い合わせの前に

### (1) 吸光度が低すぎる

- ① 吸光度計の測定波長が 450nm になっていることを確認してください。
- ② インキュベーション時間と温度を確認してください。
- ③ 使用前に試薬が室温に戻っていることを確認してください。
- ④ 試薬の調製法を確認してください。
- ⑤ 試薬の保存法を確認してください。
- ⑥ 試薬の使用期限が切れていないか確認してください。

### (2) 吸光度が高すぎる/zero standard 値が高すぎる

- ① 洗浄の各ステップでウェルが洗浄液で満たされた後、完全に除かれていることを確認してください。
- ② 洗浄操作後プレートを紙タオルに打ちつける等洗浄液が完全に除かれていることを確認してください。
- ③ インキュベーション時間と温度を確認してください。
- ④ 試薬の調製法を確認してください。
- ⑤ 試薬の使用期限が切れていないか確認してください。

### (3) 測定の精度、再現性が良くない

- ① マイクロピペットの容量がきちんと補正されていることを確認してください。
- ② 標準溶液の調製法を確認してください。
- ③ 試薬毎にチップおよび分注用容器をかえ、各溶液が混ざらないようにしてください。
- ④ 洗浄が十分であるか確認してください。
- ⑤ 振とう機に問題がないか確認してください。

製造元

**株式会社エーセル**

〒252-0131 神奈川県相模原市緑区西橋本 5-4-30 SIC-2 2506 号室

Tel:042-770-9482 FAX:042-770-9483

Home Page URL : <http://www.a-cel.co.jp>

Email address : [info@a-cel.co.jp](mailto:info@a-cel.co.jp)