

ヒアルロン酸測定キット Hyaluronan Quantification Kit

ヒアルロン酸(HA)はグルクロン酸と N-アセチルグルコサミンから構成されるグリコサミノグリカンの一種で、関節液、皮膚、臍帯、硝子体などに多く含まれます。HA は細胞外マトリックス分子として存在し、組織の水分保持や細胞の増殖、移動、分化などに関与しています。いくつかの HA 合成酵素及び HA 分解酵素が知られており、これらの働きにより生体内には種々の分子量の HA が存在します。例えば、関節液中の HA の平均分子量は 400~600 万、血中の分子量は 10~30 万、尿中では 1 万以下であることが報告されています。本キットは、HA と特異的に結合するヒアルロン酸結合タンパク(HABP)を用い、競合法により試料中の HA を定量するキットです。HA の分子量による影響を受けにくく、7.4kDa 以上の血清、血漿、培養上清中の HA 濃度を正確に測定することが可能です。

1. キットの構成

96well プレート	1 枚 (8well x 12)
HA Coating Solution	11mL x 1 本
Wash Buffer (20X)	50mL x 1 本
Sample Buffer (2X) *	50mL x 1 本
Blocking Buffer (2X) *	11mL x 1 本
HA Standard (10 μ g/mL) *	0.1mL x 1 本
Biotin-HABP *	1 本 (10~40 μ L)
HRP-Avidin (100X) *	0.2mL x 1 本
Substrate Solution A	1mL x 1 本
Substrate Solution B	10mL x 1 本
Stop Solution	11mL x 1 本
プレートシール	2 枚

* : 防腐剤として 0.025~0.05% Proclin 300 含有

2. 必要な機器、試薬、消耗品等

- ① 吸光プレートリーダー (測定波長 450nm)
- ② マイクロプレートシェーカー
- ③ 連続分注器
- ④ ピペット及びチップ
- ⑤ ペーパータオル
- ⑥ 容器類 (チューブ、ボトル等)
- ⑦ メスシリンダー (500mL 又は 1000mL)
- ⑧ 精製水

3. 試薬類の調製

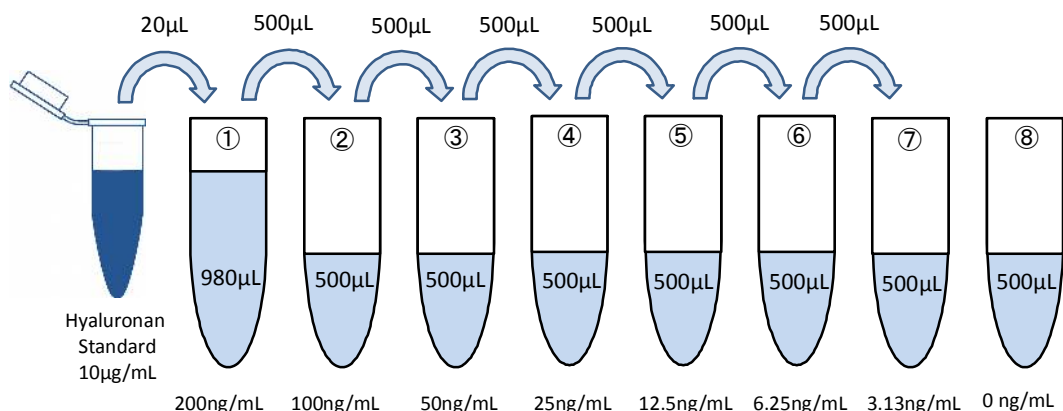
試薬類は、解凍後、よく攪拌してからご使用ください。解凍後の Wash Buffer (20X) は結晶が析出しておりますので、37℃程度に温めて溶解してください。

- 1) 1X Wash Buffer
950mL の精製水に 50mL の Wash Buffer (20X) を加え、1X Wash Buffer を調製する。
- 2) 1X Sample Buffer
50mL の精製水に 50mL の Sample Buffer (2X) を加え、1X Sample Buffer を調製する。
- 3) 1X Blocking Buffer
10mL の精製水に 10mL の Blocking Buffer (2X) を加え、1X Blocking Buffer を調製する。
- 4) 1X Biotin-HABP
6mL の 1X Sample Buffer を容器に採取する。そこから 500 μ L の 1X Sample Buffer を Biotin-HABP チューブ

に添加し、ボルテックスミキサー等でよく攪拌した後、全量を容器に回収し混合する。

5) HA Standard

1.5mL チューブを 8 本 (1 番～8 番) 準備する。1 番のチューブに 980 μ L、2 番～8 番のチューブに 500 μ L の 1X Sample Buffer を加える。1 番のチューブに 20 μ L の HA Standard (10 μ g/mL) を加え混合する。1 番のチューブから 500 μ L を採取し、2 番のチューブへ加え混合する。以下、同様に 7 番のチューブまで 2 倍の段階希釈を行う。



6) 検体の希釈

1X Sample Buffer にて検体を適宜、希釈する。

7) 1X HRP-Avidin

HRP-Avidin (100X) 100 μ L を 9.9mL の 1X Sample Buffer にて希釈し、1X HRP-Avidin を調製する。

8) Substrate Solution

使用前 15 分に 10mL の Substrate Solution B に 1mL の Substrate Solution A を混合する。使用時まで、室温で遮光する。

4. 測定操作

試薬類は、室温 (18°C～25°C) に戻してからご使用ください。

- 1) HA Coating Solution ボトルをボルテックスミキサー等で攪拌した後、96well プレートの各 well に HA Coating Solution を 100 μ L ずつ添加する。プレートシールをした後、室温で 1 時間静置する。
- 2) 1X Wash Buffer で、300 μ L/well、4 回洗浄する。洗浄操作は、プレート中の液をデカントで廃棄した後、速やかにペーパータオル等に叩きつけ、残液を取り除く。
- 3) 1X Blocking Buffer を 200 μ L/well で添加し、プレートシールをした後、室温で 30 分間静置する。
- 4) 1X Wash Buffer で、300 μ L/well、1 回洗浄する。
- 5) スタンダード及び検体を 50 μ L/well (n=2) で添加する。

HA Standard (ng/ml)		Test Samples							
0	0	No.1	No.1						
3.13	3.13	No.2	No.2						
6.25	6.25	No.3	No.3						
12.5	12.5	⋮	⋮						
25	25	⋮	⋮						
50	50	⋮	⋮						
100	100	⋮	⋮						
200	200	⋮	⋮						

- 6) 全ての well に 1X Biotin-HABP を 50 μ L/well で添加する。プレートシールをして、プレートシェーカーで 30 秒間攪拌の後、室温で 1 時間静置する。
- 7) 1X Wash Buffer で、300 μ L/well、4 回洗浄する。
- 8) 全ての well に 1X HRP-Avidin を 100 μ L/well で添加する。プレートシールをして、室温で 1 時間静置する。
- 9) 1X Wash Buffer で、300 μ L/well、4 回洗浄する。
- 10) Substrate Solution を 100 μ L/well で添加する。遮光の上、室温で 20~30 分間静置して発色させる。
- 11) Stop Solution を 100 μ L/well で添加して反応を停止した後、プレートリーダーにて 450nm の吸光度を測定する。
- 12) スタンダードの濃度と吸光度に基づいて検量線を作成し、検体中の HA 濃度を算出する。

5. 注意事項

- 1) 試薬及び検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。
- 2) 試薬は用時調製とし、調製後は冷蔵にて保存し、なるべく 1 週間以内にご使用ください。
- 3) 検体の希釈、又これらを well に注入する場合は検体ごとに新しいチップを用い、検体間の汚染を防止してください。
- 4) 基質反応停止後は、速やかに吸光度の測定を行ってください。
- 5) 標準曲線は必ず測定ごとに作成してください。
- 6) 異なるロットのキットを組合せて使用しないでください。

6. 貯法・使用期限

貯法：-20℃以下、使用期限：外箱及び CoA に記載

7. キットの性能

7-1. 測定範囲

濃度 3.13~200ng/mL の HA を測定できます (図 1)。

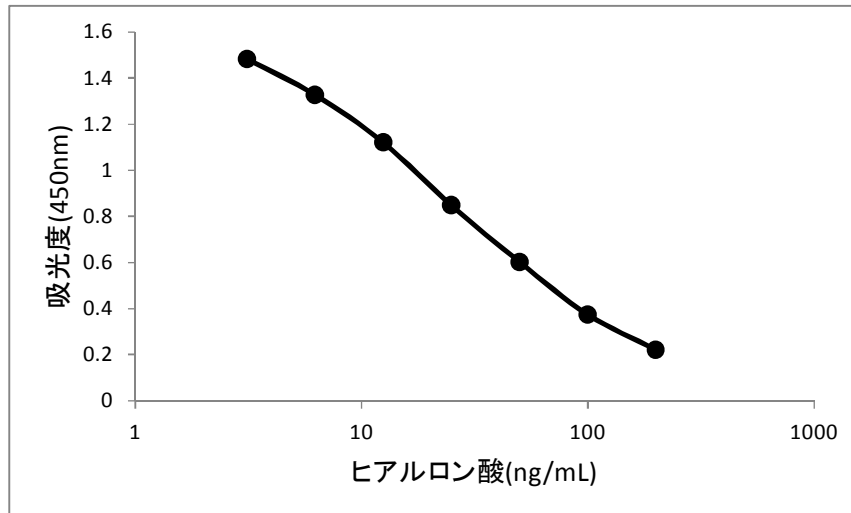


図 1. HA 測定 の 検量線

7-2. 血清、血漿中の HA 測定

正常ヒト血清、正常ヒト血漿、ウサギ血清、ラット血清中の HA の測定例を表 1 に示します。

表 1. 血清、血漿中の HA 濃度

測定試料	検体数	平均濃度 (ng/mL)
ヒト血漿	30	18.1
ヒト血清	3	29.2
ウサギ血清	8	37.1
ラット血清	2	213.3

7-3. 特異性

HA 以外の GAG への交叉反応性について検討した結果を図 2 に示します。本測定キットは、コンドロイチン硫酸 A (CS-A)、CS-C、CS-D、CS-E、ヘパラン硫酸(HS)、ヘパリン(Hep)、ケラタン硫酸(KS)、ケラタンポリ硫酸(KPS)に対し、1000ng/mL までの濃度において交叉反応しませんでした。CS-B (デルマトン硫酸) に対しては弱い反応性を示しました。なお、本測定キットは、7.4~2367kDa の HA において、分子量の影響を受けず測定することが可能です (図 3)。

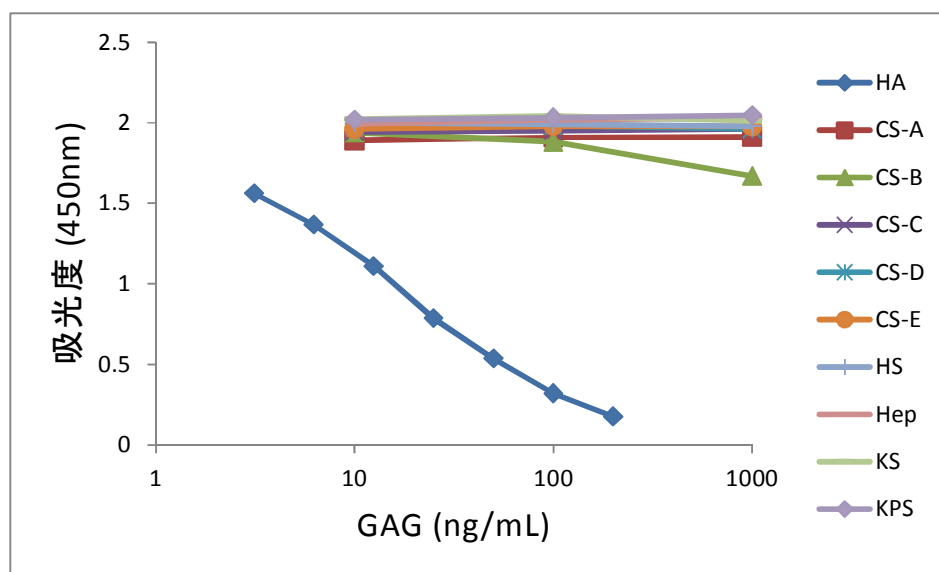


図 2. HA 以外の GAG に対する交叉反応性

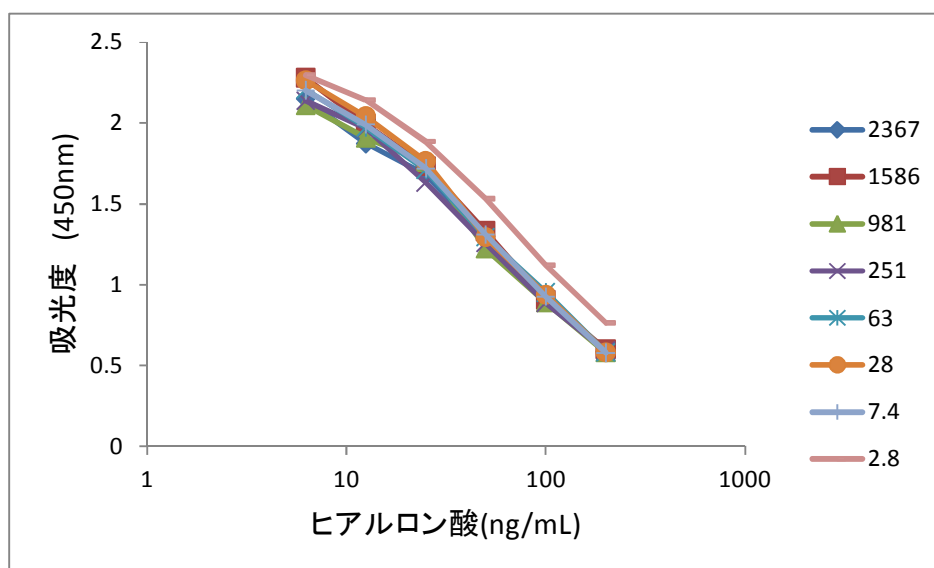


図3. 各種分子量のHAの反応性
(平均分子量2.8~2367KDaのHAを用いて比較した)

7-4. 同時再現性試験

濃度の異なる3種類の管理試料(L, M, H)について、2重測定で同時に8回測定し、同時再現性について検討した結果、CV値は10%以下でした(表2)。

表2. 同時再現性

	平均	標準偏差	CV(%)
管理試料 L	8.9	0.6	7.1
管理試料 M	38.1	0.9	2.3
管理試料 H	149.8	3.6	2.4

単位: ng/mL、CV:変動係数

7-5. 日差再現性試験

同時再現性試験と同一の試料について、異なる日時に4回測定し、日差再現性について検討した結果、CV値は10%以内でした(表3)。

表3. 日差再現性

	測定1	測定2	測定3	測定4	平均	標準偏差	CV(%)
管理試料 L	8.9	8.3	10.4	10.2	9.5	0.9	9.2
管理試料 M	38.1	34.5	41.2	39.7	38.4	2.5	6.5
管理試料 H	149.8	148.7	154.6	151.3	151.1	2.2	1.5

単位: ng/mL、CV:変動係数

7-6. 添加回収試験

異なる3種類の検体(ヒト血清)にHAを添加後、HA濃度を測定して回収率を算出した結果、回収率は98.9~106.9%の範囲でした(表4)。

表 4. 添加回収試験

	添加量	理論値	実測値	回収率%
No.1	0		35.4	
	12.5	47.9	47.4	98.9
	25	60.4	61.9	102.4
	50	85.4	89.6	104.9
No.2	0		17.8	
	12.5	30.3	31.8	104.8
	25	42.8	44.9	104.8
	50	67.8	72.5	106.9
No.3	0		7.5	
	12.5	20.0	21.3	106.0
	25	32.5	34.6	106.2
	50	57.5	60.1	104.4

単位：ng/mL

7-7. 希釈直線性

異なる3種類の検体（ヒト血清）について、2倍～16倍希釈（希釈係数0.0625～0.5）した試料中のHA濃度について測定した結果、良好な希釈直線性を示しました（図4）。

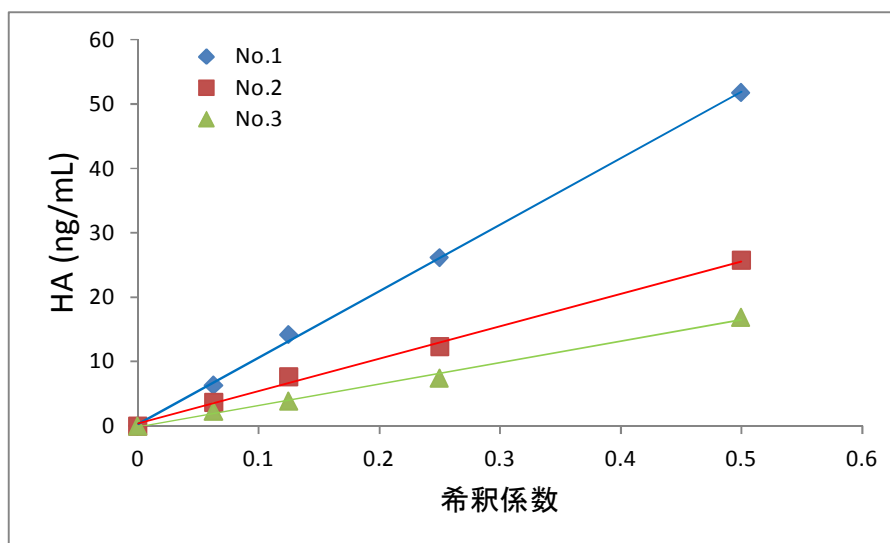


図 4. 希釈直線性

8. 参考文献

- 1) Haserodt S et al., A comparison of the sensitivity, specificity, and molecular weight accuracy of three different commercially available Hyaluronan ELISA-like assays. *Glycobiology*. 21(2):175-183. 2011.
- 2) Maeda H et al., A competitive enzyme-linked immunosorbent assay-like method for the measurement of urinary hyaluronan. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63(5):892-895, 1999.

2015年12月9日