

CD147 ELISA Kit, Human

ヒト CD147 ELISA キット

【I】キットについて

【I-1】背景と測定原理

CD147 は腫瘍細胞表面に高発現している膜貫通糖タンパク質で、線維芽細胞を刺激して多数のマトリックスメタロプロテアーゼを産生させ、腫瘍の浸潤・転移および腫瘍誘発性血管新生を促進します。¹⁾

CD147 発現が腫瘍の進行と予後に影響を与えることは、蓄積されたエビデンスによって実証されており、がん診断と予後における重要な腫瘍バイオマーカーとして、また、がんの有望な治療標的としての可能性を示唆しています。²⁾

本製品は、この CD147 の細胞外ドメインに対する高性能な 2 種のモノクローナル抗体を利用し、CD147 分子を定量的に検出する 2 ステップサンドイッチ ELISA キットです。

【I-2】キットの特長

- ・ヒト血清サンプルや細胞培養上清などに含まれる CD147 を直接定量できます。
- ・特殊な装置は不要で、通常のプレートリーダーがあれば測定できます(波長 450nm)。
- ・固相化した CD147 抗体と HRP 標識した CD147 抗体を用いて、2 ステップサンドイッチ法でヒト CD147 を検出します。

【I-3】キットの原理

この ELISA キットは 2 ステップサンドイッチ法を原理としています。

キットの ELISA プレートは抗 CD147 抗体が予め固相されています。

最初に、サンプルをプレートのウェルに加えて反応させます。洗浄後、HRP 標識抗 CD147 抗体をプレートウェルに加えて反応させます。次に、洗浄後、プレートにトラップされたサンプル中の CD147 と HRP 標識抗 CD147 抗体の結合物に基質を添加します。最後に、HRP による発色をプレートリーダーで読み取り、サンプル中の CD147 を定量します。

【I-4】 構成品

保存温度：冷蔵（2～8℃）

	内容	容量	数量	危険表記および取扱上の注意
1	抗 CD147 抗体 固相化プレート	96well (8well x 12 strips)	1 枚	成分は労働安全衛生法に非該当ですが、取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体への接触を避けるよう十分に配慮してください。
2	標準 CD147 (15ng/mL)	200μL	1 本* ¹	
3	アッセイバッファー	25mL	1 本	
4	洗浄バッファー (10 倍濃縮)* ²	25mL	1 本	
5	HRP 標識抗 CD147 抗体 (500 倍濃縮)* ³	20μL	1 本	
6	基質液	12mL	1 本	
7	停止液(2N H ₂ SO ₄)	6mL	1 本	(成分として硫酸を 9.8%含む) 労働安全衛生法 第 57 条および 第 57 条の 2 に該当 危険  ・吸入すると有害（気体、蒸気、ミスト） ・重篤な皮膚の薬傷及び目の損傷 ・重篤な眼の損傷 ・呼吸器系の障害のおそれ ・長期にわたる、又は反復ばく露による呼吸器系の障害のおそれ
8	プレートシール		2 枚	

*¹ n=2 として、検量線 4 回分

*² 洗浄バッファー(10 倍濃縮)は、冷蔵保管中に結晶が析出する場合がありますので、45℃で加温して溶解後に使用してください。

*³ 本キットを速やかに使用しない場合は、標識抗体をキットから取り出して-20℃に保管してください。

ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- ・マイクロピペッター(10~1000μL)
- ・マルチチャンネルピペッター
- ・リザーバー
- ・プレートシェーカー
- ・プレートリーダー（波長 450nm が測定可能なもの）
- ・プレートウォッシャー

【Ⅱ】 試薬、サンプルの調製方法

【Ⅱ-1】 洗浄バッファーの調製

洗浄バッファー(10 倍濃縮)を精製水で 10 倍希釈します。

例) プレート 1 枚分：洗浄バッファー(10 倍濃縮)25mL に精製水 225mL を加え、混合します。

【Ⅱ-2】 標準 CD147 の希釈調製（アッセイ毎に 2 ウェル分ずつ調製）

	濃度(pg/mL)	標準 CD147	アッセイ バッファー	希釈率
A	15000			
B	1500	50μL of A	450μL	10
C	750	250μL of B	250μL	2
D	375	250μL of C	250μL	2
E	187.5	250μL of D	250μL	2
F	93.75	250μL of E	250μL	2
G	46.875	250μL of F	250μL	2
H	23.437	250μL of G	250μL	2

本品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。

本マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。

キットに入っている標準 CD147（上表の A）50 μ L にアッセイバッファー450 μ L を加え（10 倍希釈）、よく混合した溶液を B とします。この B 溶液 250 μ L にアッセイバッファー250 μ L を加え（2 倍希釈）、よく混合した溶液を C とします。以下、同様に 2 倍希釈した溶液を調製し、100 μ L ずつ測定して下さい。各濃度 $n=2$ では、100 μ L \times 2 = 200 μ L 使用します。

希釈調製した標準タンパク質(23.437~1500pg/mL)は、必要量を用時調製してください

【Ⅱ-3】抗体の調製

HRP 標識抗 CD147 抗体(500 倍濃縮)をアッセイバッファーで 500 倍希釈します。

例) プレート 1 枚分：アッセイバッファー10mL に HRP 標識抗 CD147 抗体(500 倍濃縮)を 20 μ L を加え、転倒混和します。希釈調製した HRP 標識抗 CD147 抗体は、必要量を用時調製してください。

【Ⅱ-4】サンプル調製

血清はアッセイバッファーを用いて 4 倍に希釈し、これをサンプルとして測定します。

細胞培養液は、2,000 \times g で 10 分間遠心して、デブリを取り除きます。その上清液をサンプルとして測定します。

測定範囲上限(1500pg/mL)を越えたサンプルは、アッセイバッファーを用いて更に適宜希釈して測定することにより、その濃度を求めることができます。

【Ⅱ-5】サンプルの保存

サンプル調製後測定までは 2~8 $^{\circ}$ C で保存して下さい。

【Ⅲ】測定方法

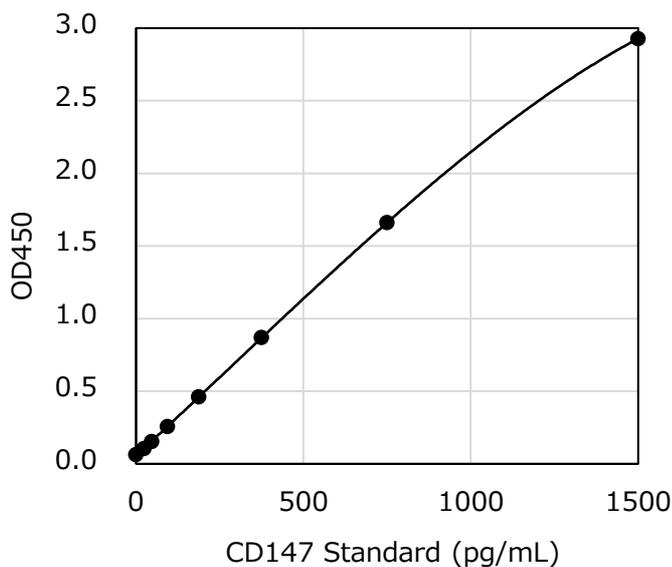
1. 抗 CD147 抗体固相化プレートと試薬を室温に戻します。
2. 標準 CD147 を希釈調製します（【Ⅱ-2】）。
3. 2 で希釈調製した標準 CD147 溶液(23.437~1500pg/mL)もしくはサンプル溶液を 1 ウェルあたり 100 μ L ずつプレートへ加えます。
4. プレートにシールし、室温で 1 時間プレートシェーカーを用いて攪拌(800rpm)します。
5. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 μ L の洗浄バッファー（【Ⅱ-1】）を加え、洗浄します。この操作を 3 回行って下さい。
6. 希釈調製した HRP 標識抗 CD147 抗体（【Ⅱ-3】）を各ウェルに 100 μ L ずつ加えます。
7. プレートにシールし、室温で 1 時間プレートシェーカーを用いて攪拌(800rpm)します。

8. 抗体溶液を完全に除去し、各ウェルに 300 μ L の洗浄バッファーを加え、洗浄します。この操作を 3 回行って下さい。
9. 基質液を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、室温で遮光して 20 分間静置反応します。
10. 発色の濃度を確認後、各ウェルに 50 μ L ずつ停止液を加えます。
11. プレートリーダーにて各ウェルの吸光度を測定します（測定波長：450nm）。
12. 横軸に標準 CD147 濃度、縦軸に吸光度を取り、標準曲線を描きます。
13. サンプル溶液から得られた吸光度を標準曲線に対応させて CD147 濃度(pg/mL)を算出し、希釈倍数を乗じます。

【IV】 測定例

【IV-1】 標準曲線

一例として、標準タンパク質 (pg/mL) に対する吸光度(OD450)をグラフに描くと図 1 のようになります。ただし、標準曲線は、アッセイ毎に新たに描いてください。



標準タンパク質 (pg/mL)	吸光度(450nm)		平均吸光度
	1	2	
0	0.062	0.062	0.062
23.437	0.103	0.105	0.104
46.875	0.154	0.154	0.154
93.75	0.257	0.257	0.257

本品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。
本マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。

187.5	0.460	0.460	0.460
375	0.866	0.873	0.870
750	1.649	1.672	1.661
1500	2.922	2.934	2.928

図1 標準タンパク質による標準曲線

【V】キットの有効期限及び貯法

有効期限：箱ラベルに表示

貯法：冷蔵（2～8℃）

【参考文献】

- 1) S. Yang, et al.: *Oncol Lett.*, **13**, 898 (2017).
- 2) L. Alexandra, et al.: *Cancers.*, **11**, 1803 (2019).

CD147 ELISA Kit, Human

【 I 】 About this kit

【 I – 1】 Background and Measurement Principal

Cluster of differentiation (CD) 147 is a transmembrane glycoprotein that is highly expressed at the tumor cell surface, which stimulates fibroblasts to produce a large number of matrix metalloproteinases and promotes tumor invasion and metastasis and tumor-induced angiogenesis.¹⁾

Accumulating evidence has demonstrated the role of CD147 expression in tumor progression and prognosis, suggesting it as a relevant tumor biomarker for cancer diagnosis and prognosis, as well as validating its potential as a promising therapeutic target in cancers.²⁾

This product is a two-step sandwich ELISA kit to detect CD147 protein using a couple of highly specific monoclonal antibodies against the extracellular domain of human CD147.

【 I – 2】 Features

- Directly quantitate CD147 in human serum samples or cell culture supernatant.
- No special equipment is required. Standard microplate reader capable of reading at 450nm will do the job.
- Detect human CD147 by two-step sandwich method using immobilized anti-CD147 antibody and HRP conjugated anti-CD147 antibody.

【 I – 3】 Kit Principle

This ELISA kit uses two-step sandwich ELISA principle. The ELISA plate provided in this kit has been pre-coated with an anti-CD147 antibody.

First, the sample is added into the wells of the ELISA plate and allowed to react. Next after washing, HRP conjugated anti CD147 antibody is added to react.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

After washing, substrate is added to the HRP conjugated anti CD147 antibody reacted with CD147. Finally, HRP color development is read with a plate reader to quantify Human CD147 in the sample.

【 I – 4】 Kit Component

Storage temperature : 2 ~ 8 °C

	Reagent	Volume	Quantity
1	Anti CD147 Antibody Immobilized Plate	96well (8well x 12 strips)	1 plate
2	CD147 Standard (15ng/mL)	200µL	1tube* ¹
3	Assay Buffer	25mL	1vial
4	Washing Buffer (10X)* ²	25mL	1vial
5	HRP Conjugated Anti CD147 Antibody (500X)* ³	20µL	1tube
6	Substrate Solution	12mL	1vial
7	Stop Solution (2N H ₂ SO ₄)	6mL	1vial
8	Plate Seals		2sheets

*¹ Sufficient to create 4 standard curves with n=2.

*² Crystals may precipitate in the Washing Buffer (10x) during refrigerated storage. Warm the buffer to dissolve it at 45°C before use.

*³ If the kit is not going to be used immediately, remove the labeled antibody from the kit and store it at -20°C.

Required Materials Not Included in the Kit

- Micropipettes (10 ~ 1000 µL)
- Multichannel micropipette
- Multichannel micropipette Reservoir
- Plate shaker
- Microplate reader (enable to measure at wavelength 450nm)
- Plate washer

【II】 Preparation of Reagents and Samples

【II – 1】 Preparation of Washing Buffer

- Dilute Washing Buffer (10×) to 10 folds with purified water.
e.g. For 1 plate, add 225 mL of purified water to 25mL of Washing Buffer (10 x) and mix well.

【II – 2】 Preparation of Standard Protein solution

	Concentration (pg/mL)	CD147 Standard	Assay Buffer	Dilution factor
A	15000			
B	1500	50μL of A	450μL	10
C	750	250μL of B	250μL	2
D	375	250μL of C	250μL	2
E	187.5	250μL of D	250μL	2
F	93.75	250μL of E	250μL	2
G	46.875	250μL of F	250μL	2
H	23.437	250μL of G	250μL	2

- To prepare Solution B, add 450μL of Assay Buffer into 50μL of Human Standard Protein (Solution A), and then mix well (10 times dilution). To prepare Solution C, add 250μL of Assay Buffer into 250μL of Solution B, and then mix well (2 times dilution). Similarly, 2 times dilution series for Solution D through H should be prepared.
- Use 100μL for measurement, using 2 wells for each solution (n=2).
- Diluted Human CD147 Standard Solution(23.437~1500pg/mL) should be freshly prepared at each time before use.

【II – 3】 Preparation of antibody solution

- Dilute HRP conjugated anti-Human CD147 antibody (500x) to 500 folds using Assay Buffer.

e.g. For 1 plate, add 20 μ L of antibody (500x) into 10mL of Assay Buffer. Mix by inverting the tube.

* Diluted antibody solution should be freshly prepared at each time before use.

【II –4】 Preparation of Samples

Serum is measured as a sample diluted 4-fold with Assay Buffer.

Centrifuge cell culture media at 2,000 x g for 10 minutes to remove debris.

Collect supernatants and assay.

Samples generating absorbance values greater than that of the highest standard should be further diluted using Assay Buffer and reanalyzed.

【II –5】 Sample Storage

After sample preparation, store at 2-8°C until measurement.

【III】 Sample measurement procedure

1. Bring anti CD147 antibody solid phased plate and the reagents to the room temperature.
2. Prepare Human CD147 Standard solution by serial dilution. (from step 【II – 2】)
3. Add 100 μ L each of serial diluted CD147 Standard solution (23.437~1500pg/mL) or Sample solution into the well.
4. Seal the microplate with Plate Seals.
5. Incubate at room temperature for 1 hour on a plate shaker set to 800 rpm.
6. Discard all the reaction solution, and then rinse each well with 300 μ L of Washing Buffer (from step 【II-1】). Repeat this step for 3 times.
7. Add 100 μ L each of diluted HRP conjugated anti CD147 antibody (from step 【II-3】) to the well.
8. Seal the microplate with Plate Seals.
9. Incubate at room temperature for 1 hour on a plate shaker set to 800 rpm.
10. Discard the reaction solution, and then rinse each well with 300 μ L of Washing Buffer(from step 【II-1】). Repeat this step for 3 times.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

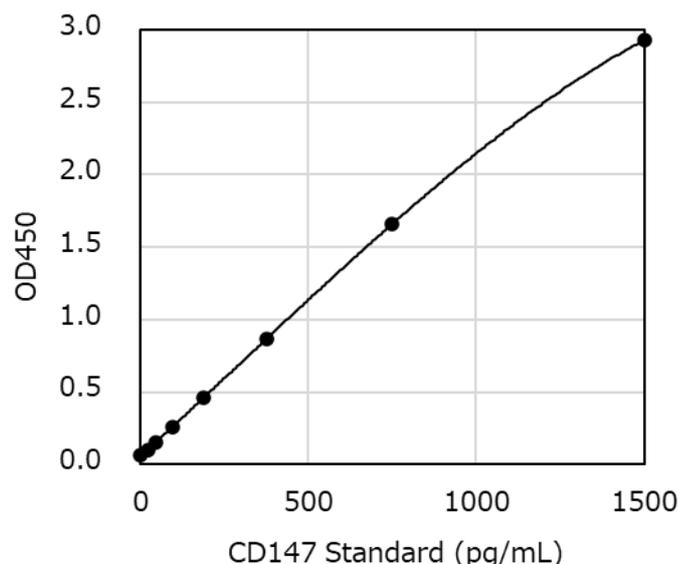
11. Add 100 μ L of Substrate Solution into each well, and then incubate at room temperature protected from light for 20min for static reaction.
12. Visually confirm the coloring, and then add 50 μ L each of Stop Solution.
13. Place into the Plate-reader, and read the absorbance of each well on a spectrophotometer at the wavelength of 450nm.
14. Create a standard curve by plotting the absorbance value (y axis) against the Standard Protein concentration (x axis).
15. Calculate the concentration by comparing the absorbance obtained from the sample solution to the standard curve. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, to obtain the concentration of CD147 in the sample.

【IV】 Measurement example

【IV- 1】 Standard curve

As an example, the graph of absorbance (OD450) against Human Standard Protein concentration is drawn as shown in Figure 1.

However, draw a new standard curve for each assay to calculate the concentration in the sample.



CD147 Standard solution (pg/mL)	Absorbance (450nm)		mean
	1	2	
0	0.062	0.062	0.062
23.437	0.103	0.105	0.104
46.875	0.154	0.154	0.154
93.75	0.257	0.257	0.257
187.5	0.460	0.460	0.460
375	0.866	0.873	0.870
750	1.649	1.672	1.661
1500	2.922	2.934	2.928

Fig.1 Standard curve and measured values

[V] Kit expiry date and storage

Expiry date : indicated on the kit box

Storage : Refrigeration (2-8°C)

[Reference]

- 1) S. Yang, et al.: *Oncol Lett.*, **13**, 898 (2017).
- 2) L. Alexandra, et al.: *Cancers.*, **11**, 1803 (2019).