

EphA2 ELISA Kit, Human

ヒト EphA2 ELISA キット

【I】キットについて

エリスロポエチン産生肝細胞性 A2 (EphA2) は、Eph チロシンキナーゼ受容体ファミリーの一員であり、様々な生物学的プロセスとの関連が指摘されています。腫瘍において、EphA2 の過剰発現は、非標準的な経路の活性化、腫瘍の進行、そして予後不良と関連しており、悪性腫瘍のマーカーとしての重要性が示唆されています。¹⁾

【I-1】キットの特長

- ・ヒト EphA2 タンパク質の細胞外ドメインに対する 2 種類のモノクローナル抗体による ELISA です。
- ・抗 EphA2 抗体を固相化したプレートと HRP 標識した抗 EphA2 抗体を用いたサンドイッチ法により高感度に EphA2 を検出します。
- ・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)。

【I-2】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。このキットの ELISA プレートは抗 EphA2 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攪拌反応させます。洗浄後、HRP 標識抗 EphA2 抗体をプレートのウェルに加えて攪拌反応させます。

次に、洗浄後、プレートにトラップされたサンプル中の EphA2 と HRP 標識抗 EphA2 抗体の結合体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 EphA2 を定量します。

【I-3】 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 EphA2 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 EphA2 ^{*1} (30ng/mL) | 200μL | 1 本 ^{*2} | |
| 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) ^{*3} | 25mL | 1 本 | |
| 5 | HRP 標識抗 EphA2 抗体 (500 倍濃縮) ^{*4} | 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） ・重篤な皮膚の葉傷及び目の損傷 ・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} ヒト EphA2 (Gln25~Asn534) の精製組換えタンパク質

^{*2} n=2 として、検量線 4 回分

^{*3} 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。

*4 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】 洗浄バッファの調製

洗浄バッファ(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(10 倍濃縮)25mL に精製水 225mL を加え、混合します。

【Ⅱ-2】 標準 EphA2 の希釈調製（アッセイ毎に 2 ウェル分ずつ調製）

| | EphA2 濃度 (pg/mL) | 標準 EphA2 | アッセイ バッファ | 希釈率 |
|---|---------------------|------------|--------------|-----|
| A | 30000 | | | |
| B | 3000 | 50μL of A | 450μL | 10 |
| C | 1500 | 250μL of B | 250μL | 2 |
| D | 750 | 250μL of C | 250μL | 2 |
| E | 375 | 250μL of D | 250μL | 2 |
| F | 187.5 | 250μL of E | 250μL | 2 |
| G | 93.75 | 250μL of F | 250μL | 2 |
| H | 46.875 | 250μL of G | 250μL | 2 |

キットに入っている標準 EphA2（上表の A）50μL にアッセイバッファ450μL 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 250μL にアッセイバッファ250μL を加え（2 倍

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。

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 EphA2(46.875~3000pg/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 EphA2 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 EphA2 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 EphA2 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

バッファー中に溶解された EphA2 蛋白を測定する場合は、アッセイバッファーで適宜希釈して測定して下さい。また、尿サンプルを測定する場合には、アッセイバッファーを用いて 10 倍に希釈してサンプル溶液として測定して下さい。

測定範囲上限(3000pg/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

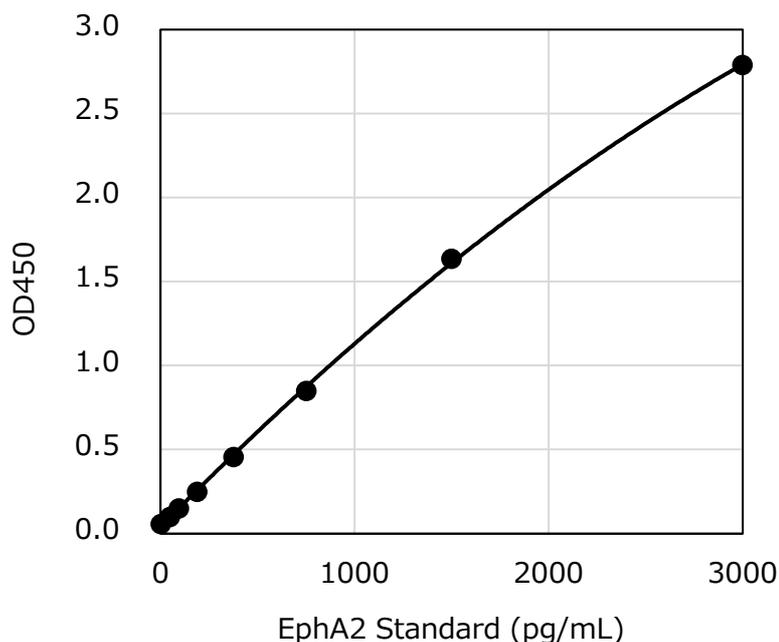
1. 抗 EphA2 抗体固相化プレートと試薬を室温に戻します。
2. 標準 EphA2 を希釈調製します (【Ⅱ-2】)。
3. 2 で希釈調製した標準 EphA2(46.875~3000pg/mL)もしくはサンプル溶液を 1 ウェルあたり 100 μ L ずつプレートへ加えます。
4. プレートにシールし、室温で 1 時間プレートシェーカーを用いて攪拌(800rpm)します。
5. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 μ L の洗浄バッファー (【Ⅱ-1】) を加え、洗浄します。この操作を 3 回行って下さい。
6. 希釈調製した HRP 標識抗 EphA2 抗体 (【Ⅱ-3】) を各ウェルに 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 EphA2 濃度、縦軸に吸光度を取り、標準曲線を描きます。

【IV】 測定例

【IV-1】 標準曲線

一例として、標準 EphA2 (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。サンプル溶液の吸光度を標準曲線に対応させて EphA2(pg/mL)を算出し、更に希釈倍数を乗じて尿中などの EphA2(pg/mL)を求めてください。



| 標準 EphA2 (pg/mL) | 吸光度(450nm) | | 平均吸光度 |
|---------------------|------------|-------|-------|
| | 1 | 2 | |
| 0 | 0.050 | 0.061 | 0.056 |
| 46.875 | 0.095 | 0.099 | 0.097 |
| 93.75 | 0.146 | 0.149 | 0.148 |
| 187.5 | 0.243 | 0.251 | 0.247 |

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。

| | | | |
|------|-------|-------|-------|
| 375 | 0.465 | 0.445 | 0.455 |
| 750 | 0.853 | 0.842 | 0.848 |
| 1500 | 1.605 | 1.664 | 1.634 |
| 3000 | 2.839 | 2.737 | 2.788 |

図1 標準 EphA2 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) L. Toracchio, et al.: *Int J Mol Sci.*, **25**, 12191 (2024).

EphA2 ELISA Kit, Human

【 I 】 About this kit

Erythropoietin-producing hepatocellular A2 (EphA2) is a member of the Eph tyrosine kinase receptor family that has been linked to various biological processes. In tumors, EphA2 overexpression is associated with noncanonical pathway activation, tumor progression, and a poor prognosis, which has emphasized its importance as a marker of malignancy.¹⁾

【 I – 1】 Features

- Consists of two monoclonal antibodies against extracellular domain of human EphA2 protein.
- Detects with high sensitivity Human EphA2 by sandwich method using a solid-phased anti-EphA2 antibody and an HRP-conjugated anti EphA2 antibody.
- No special equipment is required. Standard microplate reader capable of reading at 450nm will do the job.

【 I – 2】 Kit Principle

This ELISA kit uses a two-step Sandwich ELISA principle. The ELISA plate provided in this kit has been pre-coated with an anti EphA2 antibody.

First, the sample is added into the wells of the ELISA plate and allowed to react.

Next after washing, HRP conjugated anti EphA2 antibody is added to react. After washing, substrate is added to the HRP conjugated anti EphA2 antibody reacted with EphA2.

Finally, HRP color development is read with a plate reader to quantify Human EphA2 in the sample.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

【 I – 3】 Kit Component

Storage temperature : 2 ~ 8 °C

| | Reagent | Volume | Quantity |
|---|---|-------------------------------|---------------------|
| 1 | Anti EphA2 Antibody Immobilized Plate | 96well (8well x 12 strips) | 1 plate |
| 2 | EphA2 Standard* ¹ | 200μL | 1tube* ² |
| 3 | Assay Buffer | 25mL | 1vial |
| 4 | Washing Buffer (10X)* ³ | 25mL | 1vial |
| 5 | HRP Conjugated Anti EphA2 Antibody (500X)* ⁴ | 20μL | 1tube |
| 6 | Substrate Solution | 12mL | 1vial |
| 7 | Stop Solution (2N H ₂ SO ₄) | 6mL | 1vial |
| 8 | Plate Seals | | 1sheets |

*¹ Purified recombinant human EphA2 (Gln25~Asn534) protein

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

*³ Crystals may precipitate in the Washing Buffer (10x) during refrigerated storage. Warm the buffer to dissolve it at 45°C before use.

*⁴ 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.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

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) | EphA2 Standard | Assay Buffer | Dilution factor |
|---|--------------------------|----------------|--------------|--------------------|
| A | 30000 | | | |
| B | 3000 | 50μL of A | 450μL | 10 |
| C | 1500 | 250μL of B | 250μL | 2 |
| D | 750 | 250μL of C | 250μL | 2 |
| E | 375 | 250μL of D | 250μL | 2 |
| F | 187.5 | 250μL of E | 250μL | 2 |
| G | 93.75 | 250μL of F | 250μL | 2 |
| H | 46.875 | 250μL of G | 250μL | 2 |

- To prepare Solution B, add 450μL of Assay Buffer into 50μL of Human EphA2 Standard (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 EphA2 Standard Solution(46.875~3000ng/mL) should be freshly prepared at each time before use.

【II – 3】 Preparation of antibody solution

- Dilute HRP conjugated anti-Human EphA2 antibody (500x) to 500 folds using Assay Buffer.

e.g. For 1 plate, add 20μL 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

In order to measure EphA2 protein dissolved in some buffers, the sample can be diluted with assay buffer appropriately. In case that EphA2 level in urine is analyzed, dilute the urine 10-fold with assay buffer and use as samples.

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-EphA2 antibody solid phased plate and the reagents to the room temperature.
2. Prepare Human EphA2 Standard solution by serial dilution. (from step 【II-2】)
3. Add 100µL each of serial diluted EphA2 Standard solution (46.875~3000pg/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 300µL of Washing Buffer (from step 【II-1】). Repeat this step for 3 times.
7. Add 100µL each of diluted HRP conjugated anti EPHA2 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 300µL of Washing Buffer(from step 【II-1】). Repeat this step for 3 times.
11. Add 100µL 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 50µL 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.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

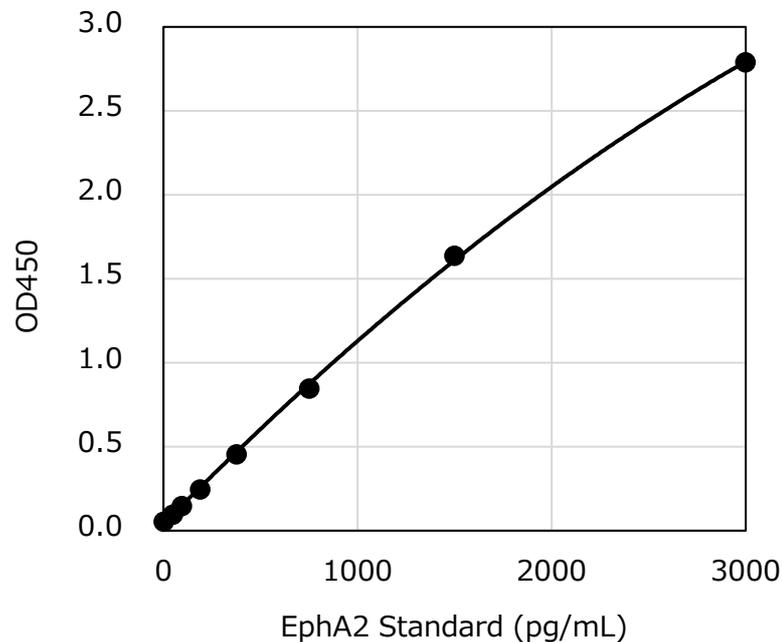
14. Create a standard curve by plotting the absorbance value (y axis) for each EphA2 Standard concentration against the EphA2 Standard concentration (x axis).
15. Determine the concentration of the target protein in the sample by interpolating absorbance values against the standard curve. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, if used, to obtain the concentration of EPHA2 in the sample.

【IV】 Measurement example

【IV- 1】 Standard curve

As an example, the graph of absorbance (OD450) against Human Standard EphA2 concentration is drawn as shown in Figure 1.

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



| EphA2 (pg/mL) | absorbance(450nm) | | mean |
|------------------|-------------------|-------|-------|
| | 1 | 2 | |
| 0 | 0.050 | 0.061 | 0.056 |
| 46.875 | 0.095 | 0.099 | 0.097 |
| 93.75 | 0.146 | 0.149 | 0.148 |

| | | | |
|-------|-------|-------|-------|
| 187.5 | 0.243 | 0.251 | 0.247 |
| 375 | 0.465 | 0.445 | 0.455 |
| 750 | 0.853 | 0.842 | 0.848 |
| 1500 | 1.605 | 1.664 | 1.634 |
| 3000 | 2.839 | 2.737 | 2.788 |

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) L. Toracchio, et al.: *Int J Mol Sci.*, **25**, 12191 (2024).