

Hyaluronan Quantification Kit

Cat. No. HA-96KIT

Updated on Jan. 6th, 2017

www.cosmobio.com

【1-1】 Background

Hyaluronan (HA) is an unbranched glycosaminoglycan composed of repeating disaccharide units of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine. HA is abundant in synovial fluid, skin, umbilical cord, and vitreous bodies. HA is a prominent component of the extracellular matrix and contributes to tissue water retention and to cellular growth, differentiation, and migration. HA exists in the body in a wide range of molecular weights (MW) derived from several distinct HA synthases and degradation enzymes. For example, the average molecular weights of HA in synovial fluid, blood and urine are 4-6 MDa, 100-300 kDa and less 10 kDa, respectively.

This product is a competitive ELISA-like kit using an HA binding protein optimized to quantify HA polymers of average molecular weight greater than 7.4 kDa in samples such as serum, plasma and culture supernatant.

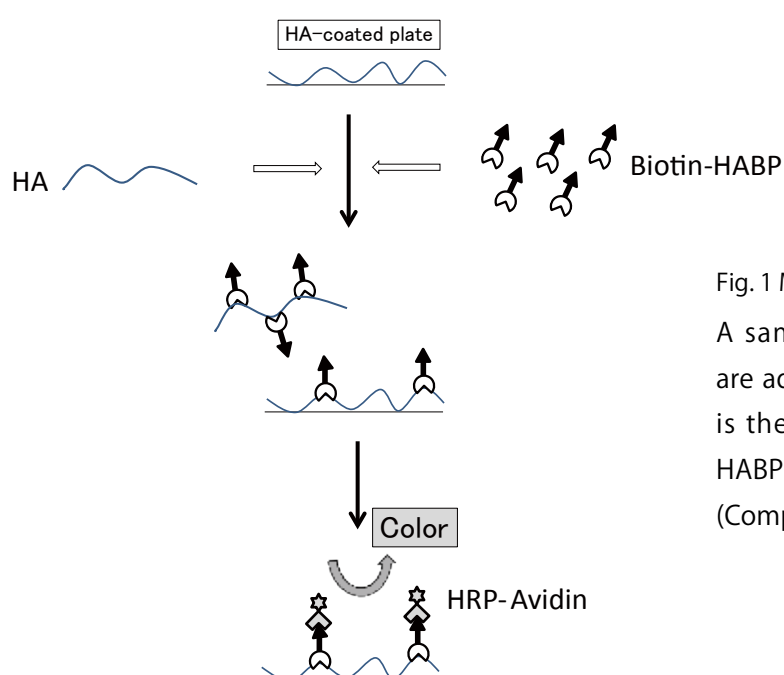


Fig. 1 Measurement principle

A sample containing HA and Biotin-HABP are added to an HA-coated plate. HRP-Avidin is then added, and the HA binding Biotin-HABP is detected by chromophoric substrate (Competition Method).

【1-2】 Features

- Hardly getting affected by the molecular size of HA.
- Measurable the HA concentrations accurately in blood serum, plazma and supernatant of which the molecular weight is above 7.4 kDa.
- Measuring range of HA concentration is between 3.13 ~ 200 ng/mL.

【1-3】 Kit Component

Materials Provided

Description	Volume	Quantity
96 well plate	8 x 12 wells	1
HA Coating Solution	11 mL	1
Wash Buffer (20X)	50 mL	1
Sample Buffer (2X) *	50 mL	1
Blocking Buffer (2X) *	11 mL	1
HA Standard (10µg/mL) *	0.1 mL	1
Biotin-HABP *	10 ~ 40 µL	1
HRP-Avidin (100X) *	0.2 mL	1
Substrate Solution A	1 mL	1
Substrate Solution B	10 mL	1
Stop Solution	11 mL	1
Plate Seals	5 mL	2

* : containing 0.025 ~ 0.05% Proclin 300

Storage: ≤ - 20°C

Expiration Date: labeled on the box

Materials Required But Not Provided

1. Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm
2. Horizontal orbital microplate shaker
3. Multichannel pipettes
4. Pipettes and pipette tips
5. Paper towels
6. Bottles and test tubes
7. Graduated cylinder (500 mL or 1000 mL)
8. Deionized or distilled water

[2] Reagent Preparation

Reagents should be mixed well before use.

1. 1X Wash Buffer

Add 50 mL of Wash Buffer (20X) to 950 mL of deionized or distilled water to prepare 1000 mL of 1X Wash Buffer. If crystals have formed in Wash Buffer (20X), warm to around 37°C and dissolve completely.

2. 1X Sample Buffer

Add 50 mL of Sample Buffer (2X) to 50 mL of deionized or distilled water to prepare 100 mL of 1X Sample Buffer.

3. 1X Blocking Buffer

Add 10 mL of Blocking Buffer (2X) to 10 mL of deionized or distilled water to prepare 20 mL of 1X Blocking Buffer.

4. 1X Biotin-HABP

Add 6 mL of 1X Sample Buffer to an appropriate tube (tube A). Take 0.5 mL of 1X Sample Buffer from tube A to Biotin-HABP tube and mix well. Return all the solution in Biotin-HABP tube to tube A and mix well.

5. HA Standard

Prepare eight 1.5 mL tubes (No.1 ~ No.8). Pipette 980 µL of 1X Sample Buffer to No.1 tube, and 500 µL of 1X Sample Buffer to No.2 ~ No.8 tubes. Pipette 20 µL of HA Standard (10 µg/mL) to No.1 tube, and mix well (200 ng/mL). Pipette 500 µL of HA Standard (No.1 tube, 200 ng/mL) to No.2 tube, and make 2-fold serial dilutions to No.7 tube in a similar manner. Mix each tube well before the next transfer.

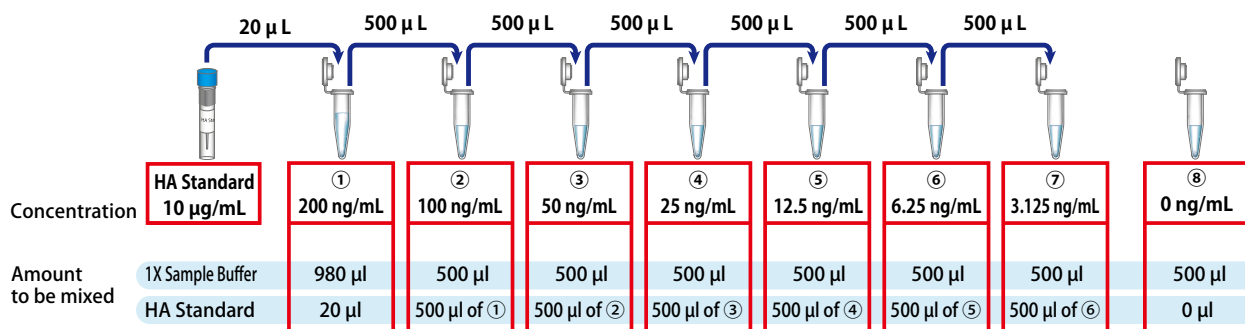


Fig. 2. Dilution of HA Standard

6. Preparation of test samples

Samples should be diluted appropriately with 1X Sample Buffer.

7. 1X HRP-Avidin

Pipette a 100 µL of HRP-Avidin (100X) to 9.9 mL of 1X Sample Buffer to prepare 10 mL of 1X HRP-Avidin.

8. Substrate Solution

Mix 1 mL of Substrate Solution A and 10mL of Substrate Solution B to prepare 11 mL of Substrate Solution within 15 minutes of use. Protect from light. Please use up all the prepared solution and dispose the remainder.

[3-1] Assay Procedure

Bring all reagents and test samples to room temperature before beginning test.

1. Vortex HA Coating Solution bottle well before use. Add 100 μL of HA Coating Solution to each well. Cover with the plate seal provided. Incubate for 1 hour at room temperature.
2. Discard the solution and wash 4 times with 1X Wash Buffer. Wash by filling each well with 300 μL of Wash Buffer using a multi-channel pipette. Invert the plate and blot it against paper towel.
3. Add 200 μL of 1X Blocking Buffer to each well. Cover with the plate seal and incubate for 30 minutes at room temperature.
4. Discard the solution and wash 1 times with 300 μL of 1X Wash Buffer.
5. Add 50 μL of each standard and sample to appropriate well ($n=2$).
6. Add 50 μL of 1X Biotin-HABP to all the wells. Cover with the plate seal and mix for 30 seconds using microplate shaker. Incubate for 1 hour at room temperature.
7. Discard the solution and wash 4 times with 300 μL of 1X Wash Buffer.
8. Add 100 μL of 1X HRP-Avidin to each well. Cover with the plate seal and incubate for 1 hour at room temperature.
9. Discard the solution and wash 4 times with 300 μL of 1X Wash Buffer.
10. Add 100 μL of Substrate Solution to each well. Incubate for 20-30 minutes in the dark.
11. Add 100 μL of Stop Solution to each well. Read the absorbance at 450 nm using a microplate reader, immediately.
12. Plot the standard curve with standard concentration and absorbance, and calculate the concentration of HA in the samples.

Fig. 3. An example of plates arrangement

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																	

[3-2] Precautions for Use

1. Avoid repeated freeze-thaw cycles of samples and reagents.
2. Reagents except substrate solution should be prepared at time of use and may be stored for up to 1 week at 2-8°C . For Substrate Solution, it should be used immediately. Do not keep it once prepared.
3. Change pipette tips between the preparation and addition of each standard and test sample to avoid cross-contamination.
4. The standard curve must be run with each assay.
5. Do not mix and use different lots of reagents.

【4】 Measuring Range

The measuring range of HA using Hyaluronan Quantification Kit is 3.13 ~ 200 ng/mL (Fig. 4).

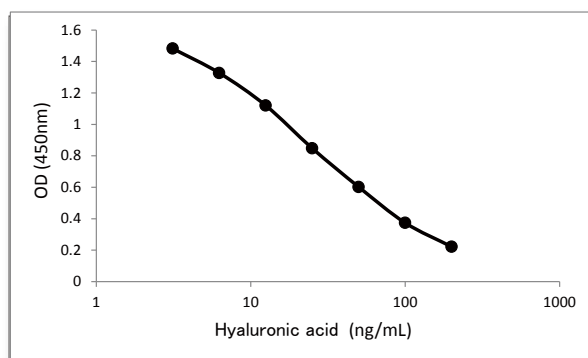


Fig. 4. Typical calibration curve

【5】 Concentrations of HA in Serum and Plasma

The concentration of HA in normal human and animal sample is summarized in Table 1.

Samples	n	Mean (ng/mL)
Human plasma	30	18.1
Human serum	3	29.2
Rabbit serum	8	37.1
Rat serum	2	213.3

Table 1. HA contents in plasma and serum

【6】 Specificity

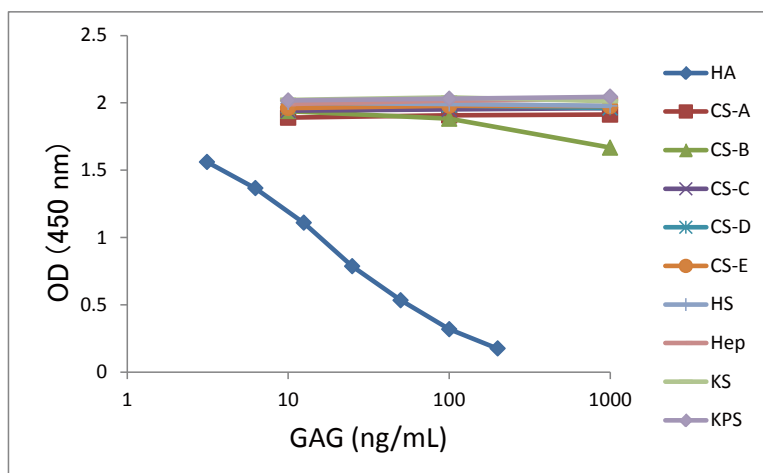


Fig. 5. The cross-reactivity with various kinds of GAGs

The cross-reactivity with various kinds of glycosaminoglycans (GAGs) was evaluated using Hyaluronan Quantification Kit (Fig.5). This kit did not show the cross-reactivity with chondroitin sulfate-A (CS-A), CS-C, CS-D, CS-E, heparan sulfate (HS), heparin (Hep), keratan sulfate (KS) and keratan polysulfate (KPS) at the concentrations of up to 1000 ng/mL. A weak reactivity was shown in high concentration of CS-B (dermatan sulfate).

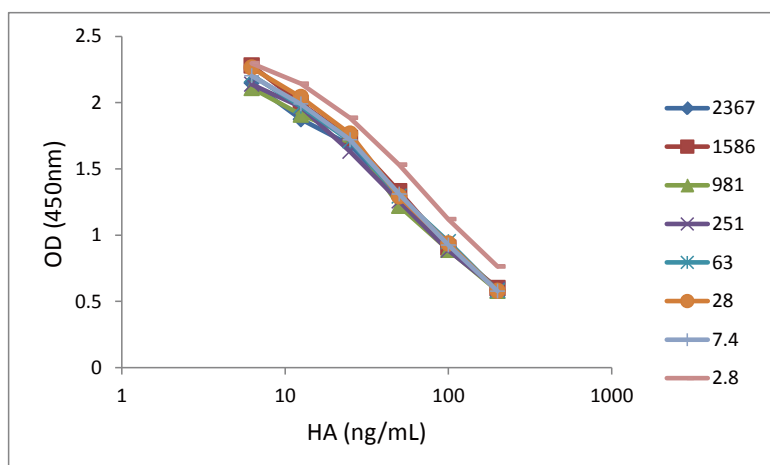


Fig. 6. The reactivity with various molecular weights of HA (HA with molecular weights of from 2.8 to 2367 kDa were compared)

The reactivity with various molecular weights of HA was evaluated using Hyaluronan Quantification Kit (Fig. 6). When using HA with molecular weights of from 2.8 to 2367 kDa, this kit reacted with molecular weights of over 7.4kDa HA in a similar manner. HA with a molecular weight of 2.8kDa showed a slightly weaker reactivity (Fig. 6).

【VII】 Various Tests

Intra-assay Precision

Table 2. Intra-assay Precision

	Mean	SD	CV(%)
Sample L	8.9	0.6	7.1
Sample M	38.1	0.9	2.3
Sample H	149.8	3.6	2.4

unit: ng/mL, SD: standard deviation, CV: coefficient of variation

Three samples of known concentration (Sample L, M, H) were tested eight times in duplicate on one plate to assess precision within an assay. The CVs were less than 10% (Table 2).

Inter-assay Precision

Table 3. Inter-assay Precision

	M 1	M 2	M 3	M 4	Mean	SD	CV(%)
Sample L	8.9	8.3	10.4	10.2	9.5	0.9	9.2
Sample M	38.1	34.5	41.2	39.7	38.4	2.5	6.5
Sample H	149.8	148.7	154.6	151.3	151.1	2.2	1.5

unit: ng/mL, M: measurement, SD: standard deviation, CV: coefficient of variation

Three samples of known concentration (Sample L, M, H) were tested four times in duplicate on different days to assess precision between assays. The CVs were less than 10% (Table 3).

Recovery

	Spike	Estimated	Observed	Recovery%
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

Table 4. Recovery

Unit: ng/mL

The recovery of HA spiked to three different levels in three different serum samples throughout the range of assay was evaluated. The value of recovery was between 98.9 - 106.9% (Table 4).

Linearity

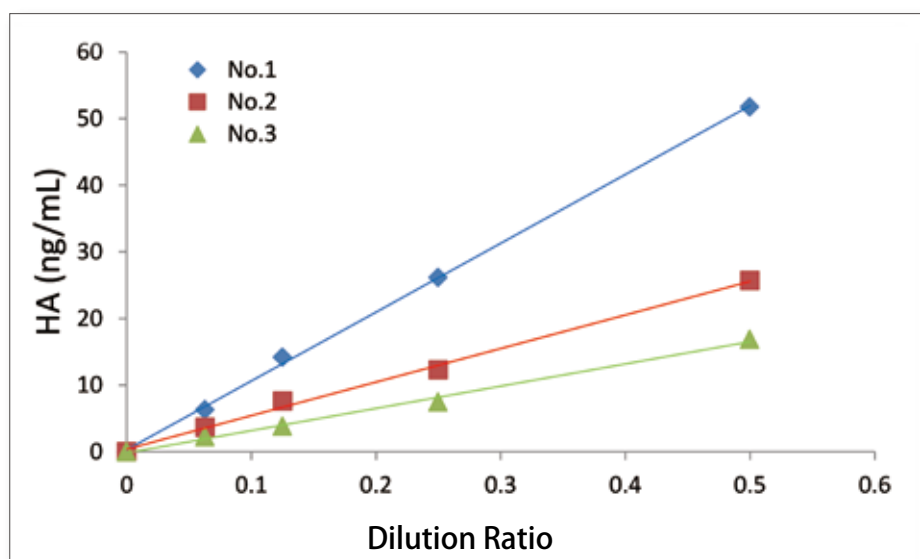


Fig. 7. Linearity

Linearity was evaluated using serially diluted three human sera (No.1 - 3). When samples were diluted with sample buffer (dilution ratio 0.0625 - 0.5), good correlation coefficients ($r > 0.998$) were observed (Fig. 6).

[8] References

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.



COSMO BIO CO., LTD.

TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,
 KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN
 TEL : (81)3-5632-9617
 FAX : (81)3-5632-9618
 e-mail : export@cosmobio.co.jp
 URL : www.cosmobio.com



一般研究用キット

Hyaluronan Quantification Kit

ヒアルロン酸定量キット

Cat. No. HA-96KIT

2017年1月6日作成

www.cosmobio.co.jp

【1-1】背景と測定原理

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 Da、血中の分子量は 10 ~ 30 万 Da、尿中では 1 万 Da 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、7.4 kDa 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。

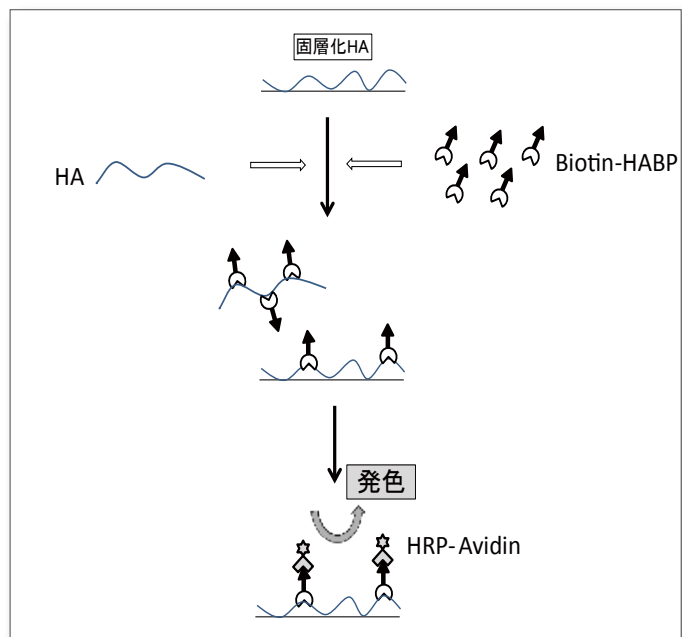


図1 キットの測定原理

ヒアルロン酸固層化プレートに、ヒアルロン酸を含む試料及びビオチン標識ヒアルロン酸結合タンパク (Biotin-HABP) を添加し、固層化ヒアルロン酸に結合した Biotin-HABP を HRP-Avidin 及び発色基質により検出する競合法。

【1-2】キットの特長

- HA の分子量による影響を受けにくい
- 7.4 kDa 以上の血清、血漿、培養上清中の HA 濃度を正確に測定可能
- 測定範囲は、濃度 3.13 ~ 200 ng/mL のヒアルロン酸

【1-3】キット構成

本製品は 96 検体を測定できます。

保存温度：-20℃

内容	容量	数量	危険表記および取扱上の注意
96 well プレート	8 well x 12	1 枚	
HA Coating Solution	11 mL	1 本	
Wash Buffer (20X)	50 mL	1 本	
Sample Buffer (2X) *	50 mL	1 本	
Blocking Buffer (2X) *	11 mL	1 本	
HA Standard (10 µg/mL) *	0.1 mL	1 本	
Biotin-HABP *	10 ~ 40 µL	1 本	
HRP-Avidin (100X) *	0.2 mL	1 本	
Substrate Solution A	1 mL	1 本	
Substrate Solution B	10 mL	1 本	
Stop Solution	11 mL	1 本	(成分として塩化水素を 3.6%含む) 労働安全衛生法 第 57 条の 2 に該当 危険  金属腐食のおそれ、吸入すると有毒のおそれ (ミスト) 重篤な皮膚の薬傷・眼の損傷、重篤な眼の損傷、吸入するとアレルギー、 喘息又は呼吸困難を起こすおそれ、呼吸器系の障害のおそれ、長期又は は反復ばく露による歯、呼吸器系の障害のおそれ、水生生物に毒性
プレートシール	5 mL	2 枚	

* 防腐剤として 0.025 ~ 0.05% Proclin 300 含有

ご準備いただくもの (その他必要なもの)

※本製品の測定は吸光プレートリーダーでの測定を想定して設計しております。

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

【II】 試薬類の調製方法

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
950 mL の精製水に 50 mL の Wash Buffer (20X) を加え、1X Wash Buffer を調製する。
- 2) 1X Sample Buffer
50 mL の精製水に 50 mL の Sample Buffer (2X) を加え、1X Sample Buffer を調製する。
- 3) 1X Blocking Buffer
10 mL の精製水に 10 mL の Blocking Buffer (2X) を加え、1X Blocking Buffer を調製する。
- 4) 1X Biotin-HABP
6 mL 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
1.5 mL チューブを 8 本 (1 ~ 8 番) 準備する。1 番のチューブに 980 μ L、2 ~ 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。

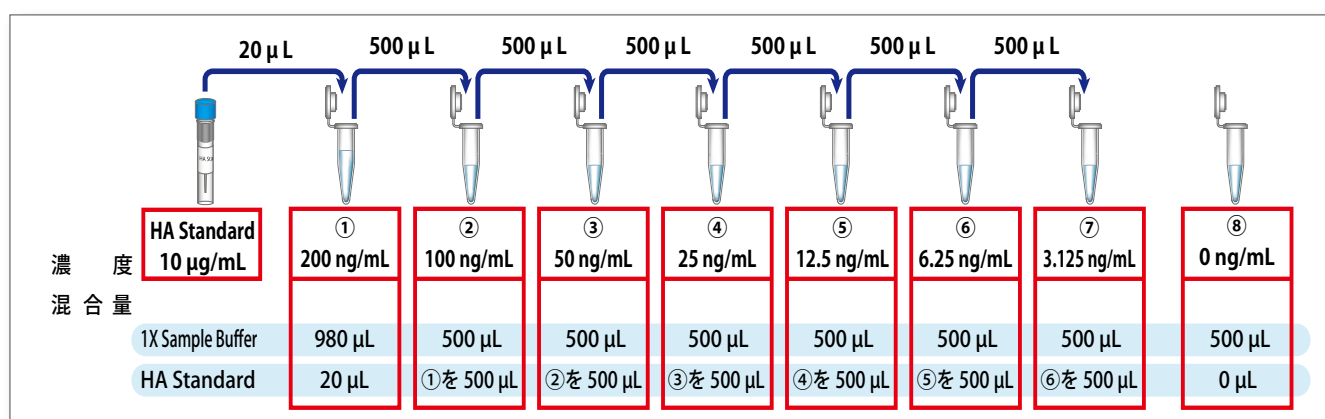


図 2. HA Standard 希釈

- 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 9.9 mL の 1X Sample Buffer にて希釈し、1X HRP-Avidin を調製する。
- 8) Substrate Solution
使用の 15 分前に 10 mL の Substrate Solution B に 1 mL の Substrate Solution A を混合する。使用時まで、室温で遮光する。混合した Substrate Solution は保存せずに、使い切ってください。

【III-1】測定方法

試薬類は、室温（18～25℃）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、96 well 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。
- 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 450 nm 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。

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																			

図3. プレート配置例

【III - 2】 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。
Substrate Solution については用時調製となりますので、残液については保存せず廃棄してください。
- 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構成を組み合わせて使用しないでください。

【IV】 測定範囲

濃度 3.13 ~ 200 ng/mL の HA を測定できます。

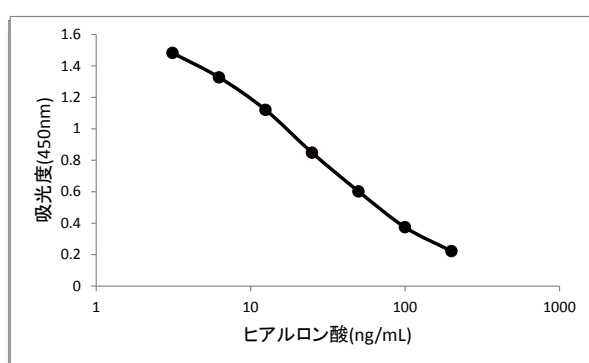


図 4. HA 測定の検量線

【V】 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

【VI】 特異性

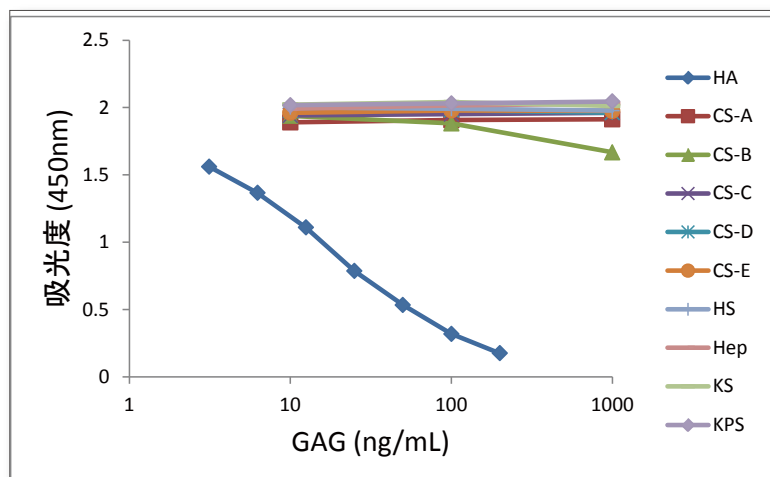


図 5. HA 以外の GAG に対する交叉反応性

HA 以外の GAG への交叉反応性について検討した結果、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、1000 ng/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が、7.4 ~ 2,367 kDa 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。

【VI】 特異性のつづき

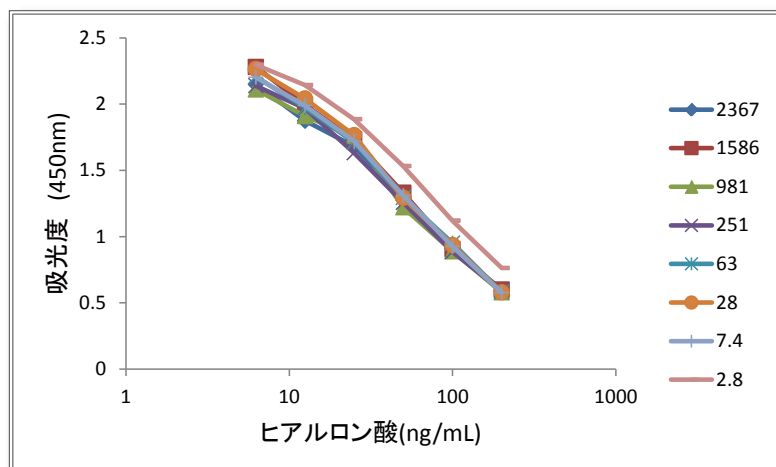


図6. 各種分子量の HA の反応性

※平均分子量 2.8 ~ 2,367 kDa の HA を用いて比較

【VII】 各種試験

同時再現性試験

	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

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。

日差再現性試験

	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

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。

【VII】各種試験のつづき

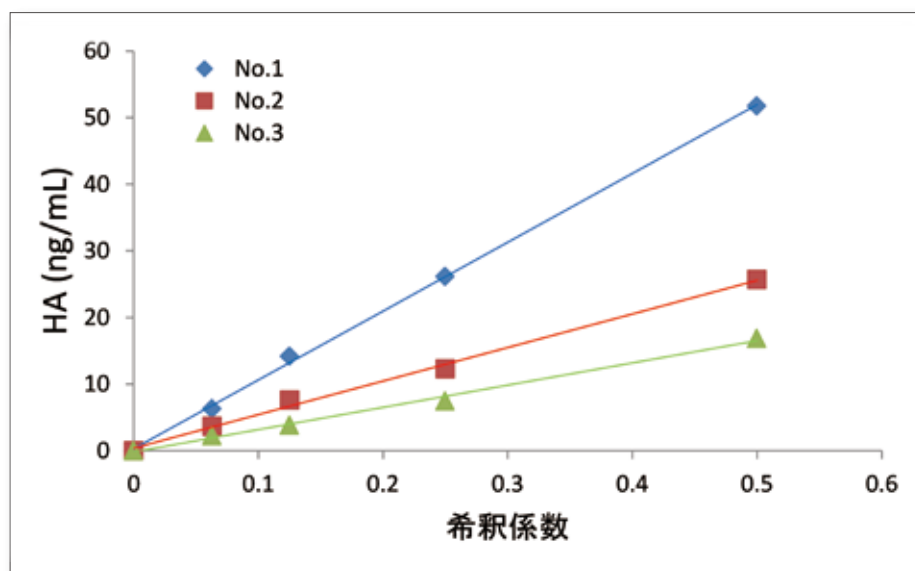
添加回収試験

	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

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。

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）した試料中のヒアルロン酸濃度について測定した結果、良好な希釈直線性を示した。



【VIII】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.

本商品をご利用になられた文献、発表データを募っております。

本商品をご利用いただき投稿された論文、学会発表/パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付方法

郵送

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
コスモ・バイオ株式会社 製品情報部 宛

E-mail

tech@cosmobio.co.jp ※ PDF ファイルにてお送りください。



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO Co., LTD.

12555
— 商品の価格・在庫・納期に関するお問い合わせ —
TEL: 03-5632-9630 (受付時間 9:00 ~ 17:30)
FAX: 03-5632-9623 E-mail: nouki@cosmobio.co.jp
— 商品に関するお問い合わせ —
TEL: 03-5632-9610 (受付時間 9:00 ~ 17:30)
FAX: 03-5632-9619 E-mail: service@cosmobio.co.jp
本社所在地 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル