



## Soluble CD147 (EMMPRIN) ELISA Kit

### INTRODUCTION

CD147, a member of the immunoglobulin superfamily, is a transmembrane glycoprotein included two immunoglobulin-like domains <sup>1)</sup>. CD147 is also known as extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) or basigin and is enriched on the surface of many malignant tumor cells and stromal cells. The up-regulation of the matrix metalloproteinases (MMPs) by CD147 is believed to be progression of malignancies through tumor growth, invasion and metastasis <sup>2,3,4)</sup>.

In the recent studies, EMMPRIN fragment (22KDa) is released in a soluble form by the proteolytic cleavage of MMPs from tumor cell surface. There are several evidences that the soluble CD147 is existed into the culture medium of several tumor cells <sup>5,6)</sup>.

### TEST PRINCIPLE

This assay kit employs the quantitative sandwich ELISA technique based on two mouse monoclonal antibodies against to specific different epitope of EMMPRIN. One of specific antibody is pre-coated onto 96-well microplate.

Calibrators and samples (culture medium and clinical sample, e.g. urine) are applied into the wells and incubated, EMMPRIN is captured by the coated antibody. Following, the microplate is incubated with biotinylated antibody. And next step, HRP-conjugated streptavidin is added to the well and incubated. Finally, a chromogenic substrate solution (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and OPD) is applied to each test well and color develops in proportion to EMMPRIN level. The enzymatic reaction is stopped by addition of sulphuric acid and absorbance of the color intensity is measured spectrophotometrically at 490 nm. Calibration curve is constructed, and EMMPRIN concentrations of samples are able to determine using the calibration curve.

### KIT COMPONENTS

- |   |                         |
|---|-------------------------|
| ○ Antibody pre-coated 96-well microplate            | --- 1 plate (6 strips)  |
| ○ Biotinylated antibody, concentrated (100 x)       | --- 1 vial (120 µL)     |
| ○ HRP-conjugated streptavidin, concentrated (100 x) | --- 1 vial (120 µL)     |
| ○ Antibody diluent                                  | --- 1 vial (30 mL)      |
| ○ Wash solution, concentrated (20 x)                | --- 1 vial (30 mL)      |
| ○ Substrate solution                                | --- 1 vial (30 mL)      |
| ○ OPD tablet  | --- 2 tablets           |
| ○ Stop solution (sulphuric acid)                    | --- 1 vial (15 mL)      |
| ○ Sample diluent                                    | --- 1 vial (15 mL)      |
| ○ EMMPRIN standard (1000 ng/mL)                     | --- 2 vial (30 µL/vial) |



### OTHER SUPPLIES REQUIRED

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 490 nm.
- Precision (multi-channel) pipettes and disposable tips to deliver 10 – 1000  $\mu$ L.
- Polypropylene test tubes for diluting samples, calibrators and reagents.
- Graduated cylinder or bottle (500 mL volume) for preparing Wash solution.
- Deionized or distilled water.

### PROCEDURAL HINTS

- The kit should be stored at the appropriate condition, and not be used beyond the expiry date.
- Reagents with different lot numbers should not be mixed.
- The thawed reagents should be stored at 2-8°C and used within 1 week.
- The prepared (diluted) reagents should be used within the day.
- Clinical samples should be handled as potentially infectious agents.
- The assay procedure should be continually performed. The wells removed aliquot should not be kept dry.

### SAMPLE PREPARATION

Culture medium and clinical sample (e.g. urine) are appropriately diluted by Sample diluent.

### REAGENTS PREPARATION

- Biotinylated antibody solution  
Dilute 100  $\mu$ L of concentrated Biotinylated antibody with 10 mL of Antibody diluent.
- HRP-conjugated streptavidin solution  
Dilute 100  $\mu$ L of concentrated HRP-conjugated streptavidin with 10 mL of Antibody diluent.
- Wash solution  
Dilute 25 mL of concentrated Wash solution into deionized water to prepare 500 mL of wash solution.
- Chromogenic substrate solution  
Dissolve 1 OPD tablet with 13 mL of Substrate solution. Use within a few minutes.
- EMMPRIN calibrators  
Dilute 25  $\mu$ L of EMMPRIN standard with 475  $\mu$ L of Sample diluent, and constitute 50 ng/mL of EMMPRIN calibrator#1. Following, mix with equal volume (250  $\mu$ L) of calibrator and Sample diluent, produce a series of 7 calibrators for duplicates (#1; 50 ng/mL, #2; 25 ng/mL, #3; 12.5 ng/mL, #4; 6.25 ng/mL, #5; 3.13 ng/mL, #6; 1.56 ng/mL, #7; 0.78 ng/mL).



### ASSAY PROCEDURE

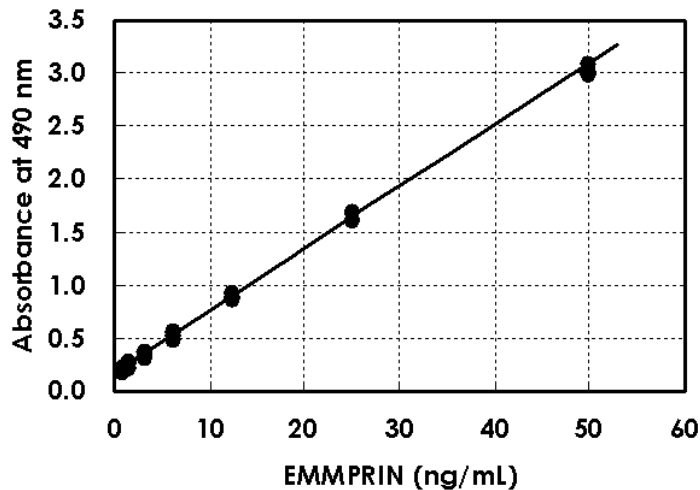
1. Pipet 100  $\mu$ L of calibrators and samples into the wells of Antibody pre-coated 96-well microplate and incubate at room temperature (25°C) for 1 hour.
2. Wash the wells 3 times with 300  $\mu$ L of Wash solution, and tap the plate for no droplets remaining.
3. Pipet 100  $\mu$ L of Biotinylated antibody solution into the wells and incubate at room temperature (25°C) for 1 hour.
4. Perform washing step about 2.
5. Pipet 100  $\mu$ L of HRP-conjugated streptavidin solution into the wells and incubate at room temperature (25°C) for 30 min.
6. Perform washing step about 2.
7. Pipet 100  $\mu$ L of Chromogenic substrate solution into the wells and incubate at room temperature (25°C) for 10 min.
8. Add 100  $\mu$ L of Stop solution into the wells.
9. Measure the optical density of the wells at 490 nm using a microplate reader.

### CALCULATION

The EMMPRIN concentrations are recommended to calculate based on the calibration curve using a built-in program of the most microplate readers.

For manual, first find the absorbance value on the Y-axis and extend a horizontal line to the calibration curve. At the point of intersection, extend a vertical line to the X-axis and read the corresponding EMMPRIN concentration.

Typical data; Calibration curve





### KIT PERFORMANCE

Sensitivity (the corresponding concentration of blank absorbance + 2SD); 0.30 ng/mL

Intra assay Precision (n = 10); CV < 10%

Inter assay Precision (n = 10); CV < 10%

### STORAGE

Store at -30°C.

The kit is stable until the expiry date indicated on the box label.

### CAUTIONS

- For research purpose only. Not for in vitro diagnostic use.
- Handle with care the reagents. Especially, avoid contact with sulphuric acid, substrate solution and OPD. Protect your eye, mouth, skin and clothing.
- Follow your local regulation for disposal of all waste materials

### REFERENCES

- 1) Yoshida S. *et al.* (2000) *Eur J Biochem* 267, 4372-4380
- 2) Millimaggi D. *et al.* (2007) *Neoplasia* 9(4), 349 – 357
- 3) Kathryn T. *et al.* (2007) *Exp Mol Pathol* 83(3), 283–295
- 4) Reimers N. *et al.* (2004) *Clin Cancer Res* 10, 3442-3428
- 5) Egawa N. *et al.* (2006) *J Biol Chem* 281(49), 37576 – 37585
- 6) Tang, Y. *et al.* (2004) *Mol Cancer Res* 2, 73-80

Manufactured by  TransGenic Inc.



COSMO BIO CO., LTD.  
Inspiration for Life Science

TOYO 2CHOME, KOTO-KU, TOKYO, 135-0016, JAPAN

<http://www.cosmobio.co.jp> e-mail : [export@cosmobio.co.jp](mailto:export@cosmobio.co.jp)

Phone : +81-3-5632-9617 FAX : +81-3-5632-9618

## 可溶性 CD147 (EMMPRIN) 測定用 ELISA キット

### 序論

CD147 は、イムノグロブリンスーパーファミリーに属し、2 つのイムノグロブリン様ドメインを持つ膜糖蛋白質です<sup>1)</sup>。CD147 は、各種の癌細胞やストローマ細胞で高発現しており、細胞外マトリックスメタロプロテアーゼの発現を誘導する (EMMPRIN) ことで、血管新生・浸潤に関与し悪性腫瘍の発達に重要な役割を果たしていると考えられています<sup>2,3,4)</sup>。

近年の研究で CD147 の N 末端イムノグロブリン様ドメインを含む EMMPRIN フラグメント (22KDa) は、メタロプロテアーゼによって切断を受け、可溶性の CD147 として分泌されることが報告されています。いくつかの癌細胞株の培養上清には可溶性 CD147 が検出されることが知られています<sup>5,6)</sup>。

### 測定原理

本キットは、EMMPRIN に特異的なエピトープに対するマウスモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法による可溶性 CD147 測定キットです。マイクロプレートには特異抗体が既に固相化されています。

キャリブレーター及び 検体 (細胞株の培養上清や尿などの生体試料) 中の EMMPRIN は、マイクロプレートの各ウェルに固相化された抗体と特異的に結合します。続いて、ビオチン標識された特異抗体、HRP 標識されたストレプトアビジンと順次反応させます。最後に、発色基質液 ( $H_2O_2$  と OPD) を添加し反応させることで、試料中の EMMPRIN 量に応じた発色が得られます。硫酸で酵素反応を停止させ、一般的なプレートリーダーを用いて波長 490nm で測光します。キャリブレーターを用いて検量線を作製し 試料の測定吸光度を検量線に代入することによって、試料中の EMMPRIN 濃度を求めることができます。

### キットの構成

○ 抗体固相化プレート	---	1 枚 (6 ストリップ)
○ ビオチン標識特異抗体 (100 倍)	---	1 本 (120 $\mu$ L)
○ HRP 標識ストレプトアビジン (100 倍)	---	1 本 (120 $\mu$ L)
○ 抗体希釈液	---	1 本 (30 mL)
○ 濃縮洗浄液 (20 倍)	---	1 本 (30 mL)
○ 基質液	---	1 本 (30 mL)
○ OPD 錠	---	2 錠
○ 反応停止液 (硫酸)	---	1 本 (15 mL)
○ 検体希釈液	---	1 本 (15 mL)
○ EMMPRIN 標準品 (1000 ng/mL)	---	2 本 (30 $\mu$ L/vial)

### 測定に必要なもの

- マイクロプレートリーダー(490 nm が測光できるもの)
- ピペットあるいは、マルチチャンネルピペットと使い捨てチップ(10-1000  $\mu$ L が測り取れるもの)
- 希釈操作用の容器(ポリプロピレン製)
- 洗浄液調製用のメスシリンダーあるいは、ビーカー(500 mL 容)
- 脱イオン水あるいは、蒸留水

### 操作上の注意

- キットは定められた条件下で適切に保管し 有効期限内にご使用ください。
- 他のロットの試薬を混合して使用しないで下さい。
- 融解した試薬類は 2-8°C で保存し、1 週間以内にご使用ください。
- 希釈調製した試薬は、当日中にご使用ください。
- 生体試料の取り扱いには、感染等に十分注意してください。
- 操作を途中で中断しないで下さい。また、操作中のウェルを乾燥させたまま放置しないでください。

### サンプルの準備

細胞株の培養上清や尿などの生体試料は、任意の倍率まで検体希釈液で希釈します。

### 試薬の準備

- ビオチン標識特異抗体液  
100  $\mu$ L のビオチン標識特異抗体を 10 mL の抗体希釈液で希釈します。
- HRP 標識ストレプトアビジン液  
100  $\mu$ L の HRP 標識ストレプトアビジンを 10 mL の抗体希釈液で希釈します。
- 洗浄液  
25 mL の濃縮洗浄液を脱イオン水で希釈し、500 mL とします。
- 発色基質液  
OPD 錠 1 錠を 13 mL の基質液に溶解します。調製後はすぐに使用してください。
- EMMPRIN キャリブレーター  
25  $\mu$ L の EMMPRIN 標準品を 475  $\mu$ L の検体希釈液で希釈し、50 ng/mL のキャリブレーター#1 を調製します。続いて 250  $\mu$ L ずつの検体希釈液で 2 倍段階希釈を行い 7 濃度のキャリブレーターを調製します(#1; 50 ng/mL, #2; 25 ng/mL, #3; 12.5 ng/mL, #4; 6.25 ng/mL, #5; 3.13 ng/mL, #6; 1.56 ng/mL, #7; 0.78 ng/mL)。

### 測定方法

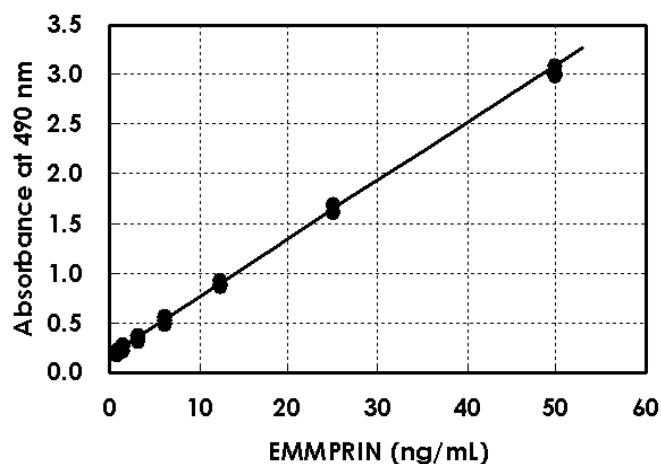
1. 100  $\mu$ L ずつのキャリブレーター及び 検体を抗体固相化プレートのウェルに添加し、室温(25 $^{\circ}$ C) で1時間インキュベートします。
2. 300  $\mu$ L の洗浄液で3回、ウェルを洗浄し 液滴が残らないようにタッピングします。
3. 100  $\mu$ L のビオチン標識特異抗体液をウェルに添加し 室温(25 $^{\circ}$ C) で1時間インキュベートします。
4. ウェルの洗浄操作を、2と同様に行います。
5. 100  $\mu$ L の HRP 標識ストレプトアビジン液をウェルに添加し 室温(25 $^{\circ}$ C) で30分間インキュベートします。
6. ウェルの洗浄操作を、2と同様に行います。
7. 100  $\mu$ L の発色基質液をウェルに添加し 室温(25 $^{\circ}$ C) で10分間インキュベートします。
8. 100  $\mu$ L の反応停止液をウェルに添加します。
9. プレートリーダーを用いて波長 490nm で測光します。

### 濃度の計算

EMMPRIN 濃度は、ほとんどのマイクロプレートリーダーに内蔵されている計算プログラムを用いて算出することができます。

あるいは、測定された吸光度を検量線に代入することにより、試料中の EMMPRIN 濃度を求めることができます。

Typical data; Calibration curve



### キットの性能

検出感度 (ブランクの平均測定吸光度 + 2SD から算出); 0.30 ng/mL

同時再現性 (n = 10); CV < 10%

日間再現性 (n = 10); CV < 10%

### 貯法

キットの構成部品は、-30 $^{\circ}$ C保存です。

キットの有効期限は外箱に表示してあります。

**使用上の注意**

- 本品は研究用試薬です。臨床上の診断などの目的にはご使用になれません。
- 試薬の取り扱いには十分気をつけてください。特に、硫酸、基質液、OPD 錠は皮膚や着衣について、目や口に入らないようにしてください。
- 使用後の容器および廃液は、各自治体の規定に従って処理して下さい。

**参考文献、**

- 1) Yoshida S. *et al.* (2000) *Eur J Biochem* 267, 4372-4380
- 2) Millimaggi D. *et al.* (2007) *Neoplasia* 9(4), 349 – 357
- 3) Kathryn T. *et al.* (2007) *Exp Mol Pathol* 83(3), 283–295
- 4) Reimers N. *et al.* (2004) *Clin Cancer Res* 10, 3442-3428
- 5) Egawa N. *et al.* (2006) *J Biol Chem* 281(49), 37576 – 37585
- 6) Tang, Y. *et al.* (2004) *Mol Cancer Res* 2, 73-80

**販売元：****コスモ・バイオ株式会社**

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル  
TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619  
e-mail : mail@cosmobio.co.jp  
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>