

LRRC15 ELISA Kit, Human

ヒト LRRC15 ELISA キット

【I】キットについて

【I-1】背景と測定原理

LRRC15 (leucine-rich repeat-containing protein 15) は、多くの固形腫瘍（乳房、頭頸部、肺、膵臓など）の間質線維芽細胞で発現しているほか、間葉系起源の癌細胞のサブセット（肉腫、黒色腫、神経膠芽腫など）でも直接発現しています。また、LRRC15 の発現は、活性化線維芽細胞および間葉系幹細胞上で TGFβ によっても誘導されます。これらの総合的な知見から、LRRC15 は、LRRC15 陽性間質性線維形成を伴う癌または間葉系起源の癌の治療における治療標的として有用な新しい CAF(癌関連線維芽細胞)および間葉系マーカーであることが示唆されています。¹⁾

本製品は、LRRC15 蛋白の細胞外ドメインに対して特異性の高い新たな 2 種のモノクローナル抗体を利用し、LRRC15 蛋白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

- ・ 抗 LRRC15 抗体を固相化したプレートと HRP 標識した抗 LRRC15 抗体を用いた 2 ステップサンドイッチ法により高感度に LRRC15 検出します。
- ・ 検出限界(detection limit: DL)及び定量限界(quantitation limit: QL)は、それぞれ 3.0pg/mL 及び 9.1pg/mL です。
- ・ 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 - 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。 このキットの ELISA プレートは抗 LRRC15 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 LRRC15 抗体をプレートの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 LRRC15 と HRP 標識抗 LRRC15 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 LRRC15 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 LRRC15 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 LRRC15 (25ng/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 LRRC15 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眼の損傷 ・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。

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。

【Ⅱ-2】標準 LRRC15 の希釈調製（アッセイ毎に 2 ウェル分ずつ調製）

	LRRC15 濃度 (pg/mL)	標準 LRRC15	アッセイ バッファー	希釈率
A	25000			
B	2500	50μL of A	450μL	10
C	1250	250μL of B	250μL	2
D	625	250μL of C	250μL	2
E	313	250μL of D	250μL	2
F	156	250μL of E	250μL	2
G	78	250μL of F	250μL	2
H	39	250μL of G	250μL	2

キットに入っている標準 LRRC15（上表の A）50μL にアッセイバッファー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ー250μL 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、100μL ずつ測定して下さい。各濃度 n=2 では、100μL x 2 = 200μL 使用します。

希釈調製した標準 LRRC15(39~2500 pg/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 LRRC15 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 LRRC15 抗体(500 倍濃縮)を 20μL を加え、転倒混和します。希釈調製した HRP 標識抗 LRRC15 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 LRRC15 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、血清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 4 倍以上に希釈して下さい。

測定範囲上限(2500pg/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℃で保存して下さい。

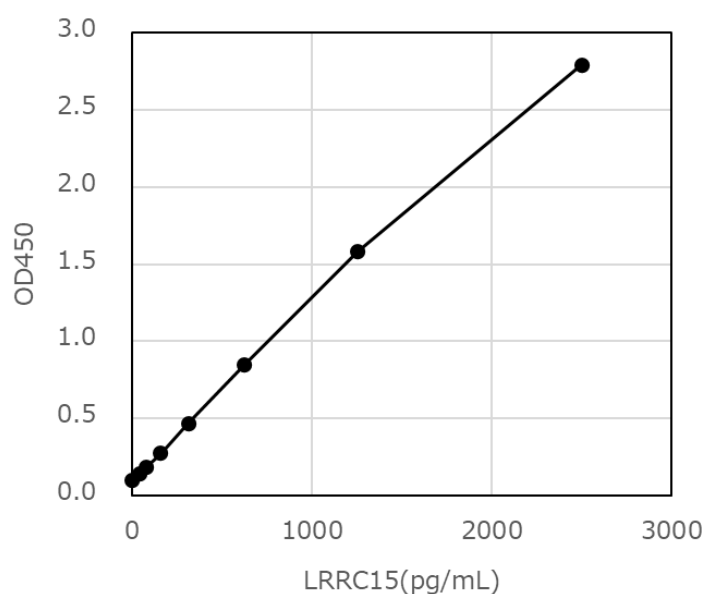
【Ⅲ】 測定方法

1. 抗 LRRC15 抗体固相化プレートと試薬を室温に戻します。
2. 標準 LRRC15 を希釈調製します（【Ⅱ-2】）。
3. 2 で希釈調製した標準 LRRC15 (39～2500 pg/mL)もしくはサンプル溶液を 1 ウェルあたり 100μL 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 300μL 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 LRRC15 抗体（【Ⅱ-3】）を各ウェルに 100μL 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 300μL 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 100μL 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 50μL 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 LRRC15 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 LRRC15 (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 LRRC15(pg/mL)を算出し、更に希釈倍数を乗じて血清中の LRRC15(pg/mL)を求めてください。ただし、標準 LRRC15 は LRRC15 の細胞外ドメインにタグ配列を付加した組換え蛋白ですので、全長 LRRC15 蛋白量に換算する場合には、さらに 0.729 を乗じた値となります。



標準 LRRC15 (pg/mL)	吸光度(450nm)		平均吸光度
	1	2	
0	0.098	0.097	0.098
39	0.139	0.140	0.140
78	0.185	0.188	0.187
156	0.277	0.274	0.276
313	0.469	0.464	0.467
625	0.854	0.842	0.848
1250	1.577	1.585	1.581
2500	2.764	2.816	2.790

図1 標準 LRRC15 による標準曲線および血清サンプル測定

【IV-2】 サンプルの測定例

1. エクソソーム

LRRC15 を強制発現させた Expi293 の培養上清から超遠心法により精製したエクソソーム（31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000ng/mL）をウェルに 100μL ずつ加えて本キットで測定しました。エクソソーム濃度(ng/mL)と吸光度(OD450)を グラフに表すと図2 のようになります。

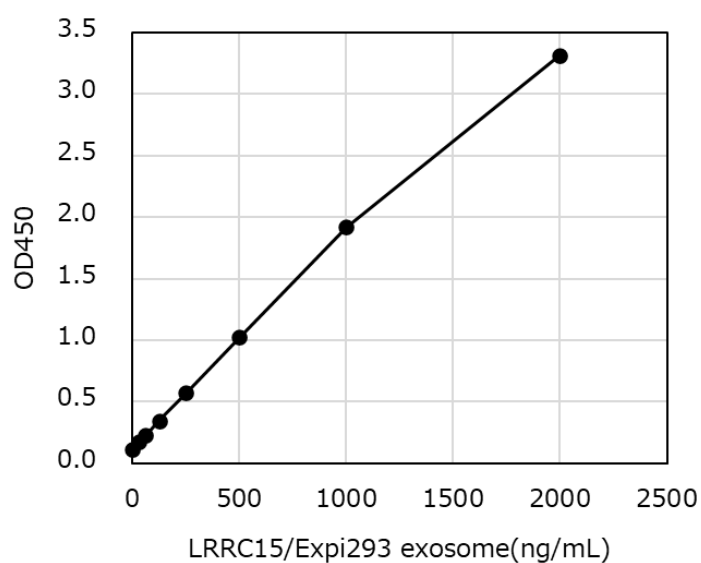


図 2 LRRC15 を強制発現させたエクソソームの測定

2. 細胞抽出液

LRRC15 を強制発現させた Expi293 細胞を RIPA で溶解させた抽出液（1 μ g/mL）をウェルに 100 μ L ずつ加えて本キットで測定しました。培養日数と抽出液中の LRRC15 発現量 (pg/mL) を グラフに表すと図 3 のようになります。

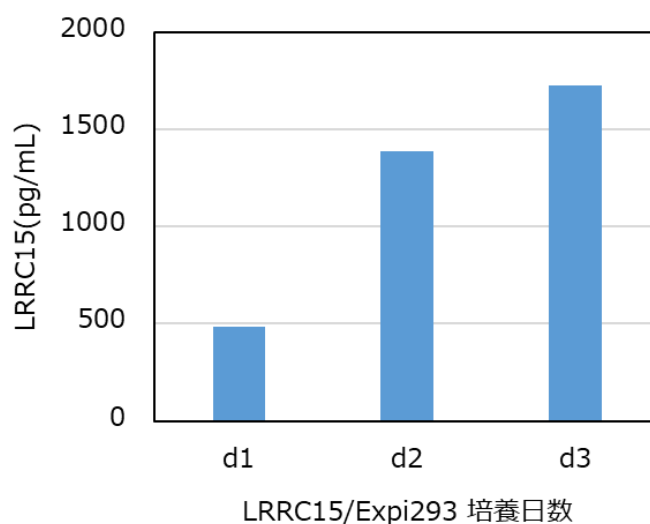


図 3 細胞抽出液中の LRRC15 発現量のタイムコース

【V】キットの有効期限及び貯法

有効期限：製造日から 6 か月後 （製造日はキット箱ラベルに表示）

貯法：冷蔵（2～8℃）

【参考文献】

- 1) Purcell JW et al., *Cancer Res.*, **78**, 4059 (2018).

LRRC15 ELISA Kit, Human

【 I 】 About this kit

【 I – 1 】 Background and Measurement Principal

LRRC15 is expressed on stromal fibroblasts in many solid tumors (e.g., breast, head and neck, lung, pancreatic) as well as directly on a subset of cancer cells of mesenchymal origin (e.g., sarcoma, melanoma, glioblastoma). LRRC15 expression is induced by TGF β on activated fibroblasts (α SMA+) and on mesenchymal stem cells. These collective findings suggested LRRC15 as a novel CAF and mesenchymal marker with utility as a therapeutic target for the treatment of cancers with LRRC15-positive stromal desmoplasia or cancers of mesenchymal origin. ¹⁾

This product is a two-step sandwich ELISA kit to detect LRRC15 protein using a couple of highly specific monoclonal antibodies against the extracellular domain of human LRRC15.

【 I – 2 】 Features

- Detects high sensitivity Human LRRC15 by a two-step sandwich method using solid phase anti LRRC15 antibody and HRP conjugated anti LRRC15 antibody.
- The detection limit and quantification limit are 3.0pg/mL and 9.1pg/mL .
- No special equipment is required. Standard microplate reader capable of reading at 450nm will do the job.

【 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 LRRC15 antibody.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

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

Next after washing, HRP conjugated anti LRRC15 antibody is added to react. After washing, substrate is added to the HRP conjugated anti LRRC15 antibody reacted with LRRC15.

Finally, HRP color development is read with a plate reader to quantify Human LRRC15 in the sample.

【 I – 4 】 Kit Component

Storage temperature : 2 ~ 8 °C

	Reagent	Volume	Quantity
1	Anti LRRC15 Antibody Immobilized Plate	96well (8well x 12 strips)	1 plate
2	LRRC15 Standard	200μL	1tube* ¹
3	Assay Buffer	25mL	1vial
4	Washing Buffer (10X)* ²	25mL	1vial
5	HRP Conjugated Anti LRRC15 Antibody (500X)* ³	20μL	1tube
6	Substrate Solution	12mL	1vial
7	Stop Solution (2N H ₂ SO ₄)	6mL	1vial
8	Plate Seals		1sheets

*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

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

【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)	LRRC15 Standard	Assay Buffer	Dilution factor
A	25000			
B	2500	50μL of A	450μL	10
C	1250	250μL of B	250μL	2
D	625	250μL of C	250μL	2
E	313	250μL of D	250μL	2
F	156	250μL of E	250μL	2
G	78	250μL of F	250μL	2
H	39	250μL of G	250μL	2

- To prepare Solution B, add 450μL of Assay Buffer into 50μL of Human LRRC15 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 LRRC15 Standard Solution(39~2500 ng/mL) should be freshly prepared at each time before use.

【Ⅱ – 3】 Preparation of antibody solution

- Dilute HRP conjugated anti-Human LRRC15 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

In order to measure LRRC15 protein dissolved in some buffer, the sample can be diluted with assay buffer appropriately. In case that LRRC15 level in serum is analyzed, dilute the serum 4-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 LRRC15 antibody solid phased plate and the reagents to the room temperature.
2. Prepare Human LRRC15 Standard solution by serial dilution. (from step 【II – 2】)
3. Add 100 μ L each of serial diluted LRRC15 Standard solution (39~2500 pg/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 LRRC15 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) for each LRRC15 Standard concentration against the LRRC15 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 LRRC15 in the sample.

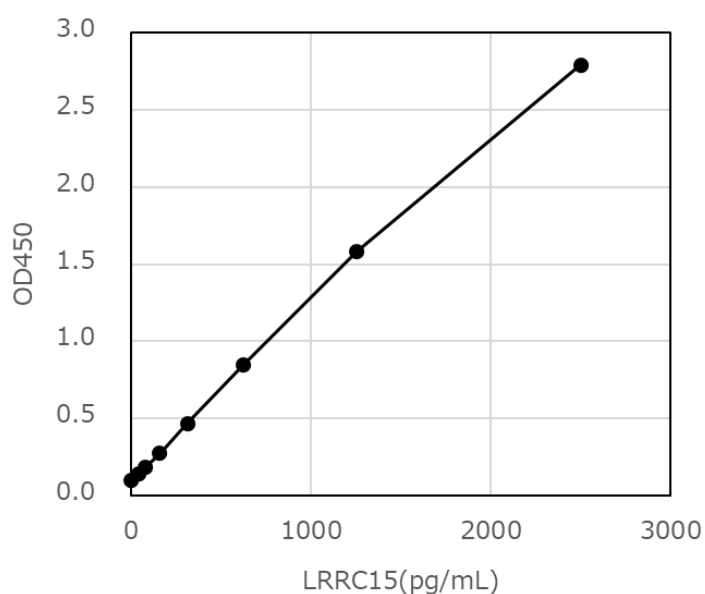
【IV】 Measurement example

【IV- 1】 Standard curve

As an example, the graph of absorbance (OD450) against Human Standard LRRC15 concentration is drawn as shown in Figure 1.

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

As the Standard LRRC15 is prepared using extracellular domain of LRRC15 fused with some tag sequences, the measured value should be 0.729-fold when convert it as full length LRRC15 protein amount.



LRRC15 (pg/mL)	absorbance(450nm)		mean
	1	2	
0	0.098	0.097	0.098
39	0.139	0.140	0.140
78	0.185	0.188	0.187
156	0.277	0.274	0.276
313	0.469	0.464	0.467
625	0.854	0.842	0.848
1250	1.577	1.585	1.581
2500	2.764	2.816	2.790

Fig.1 Standard curve and measured values

【IV-2】 Sample measurement example

1. Exosomes

Exosomes (31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000ng/mL) purified from the culture supernatant of Expi293 in which LRRC15 was forcibly expressed were measured.

Figure 2 shows the exosome concentration (ng/mL) and absorbance (OD450) graphically.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

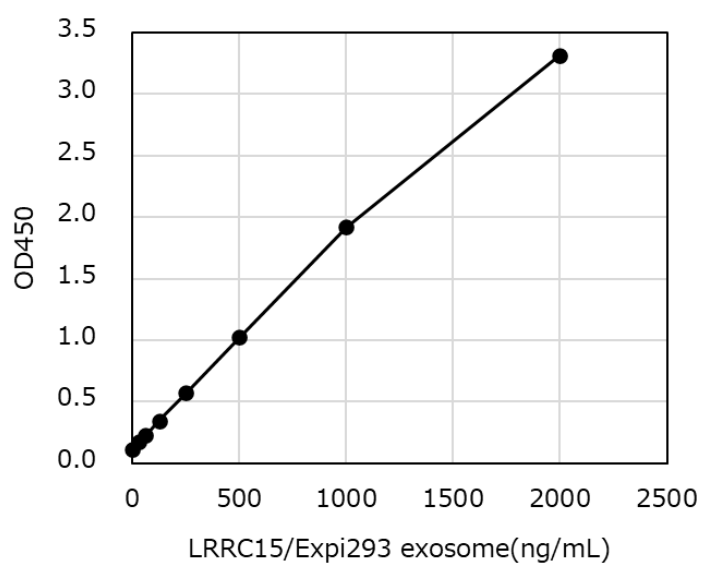


Fig. 2 Measurement of exosomes overexpressing LRRC15

2. Cell extract

The cell extract (1 μ g/mL) of Expi293 cells overexpressing LRRC15 was prepared with RIPA and measured. Figure 3 shows the culture period and LRRC15 expression level (pg/mL) in the cell extract graphically.

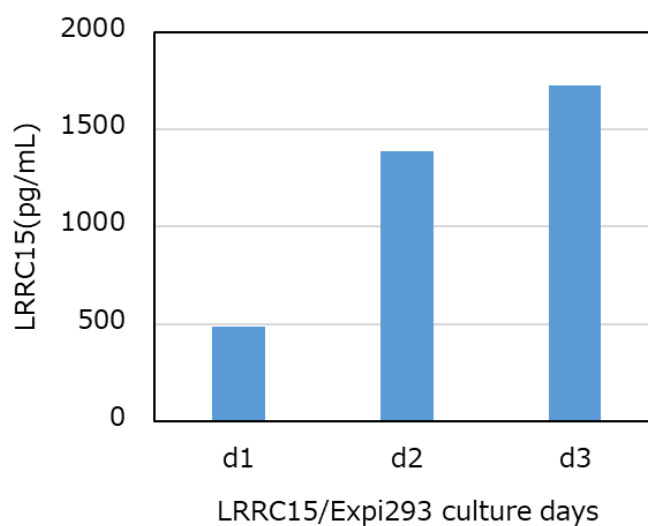


Fig. 3 Time course of LRRC15 expression in the cell extract

【V】 Kit expiry date and storage

Expiry date : 6 months after the manufacturing date.

(The manufacturing date is indicated on the kit box label)

Storage : Refrigeration (2-8°C)

【Reference】

- 1) Purcell JW et al., *Cancer Res.*, **78**, 4059 (2018).