

CDCP1 ELISA Kit, Human

ヒト CDCP1 ELISA キット

【I】キットについて

【I-1】背景と測定原理

前立腺がんは、世界中で毎年 679,000 人が診断され、220,000 人が死亡すると言われ、男性で最も頻度の高いがんの 1 つであります。

特に注目すべきは、KLK3（前立腺特異抗原、PSA）を含むいくつかのカリクレイン関連ペプチダーゼなどが広範囲に研究され、前立腺がんの進行を促進することです。最近の知見では、進行性および悪性の高い去勢抵抗性前立腺がん（CRPC）の発症において、プロテアーゼ活性化膜タンパク質である CDCP1 (CUB-domain-containing protein 1) が重要な役割を果たすことが示唆されています¹⁾。

CDCP1 は、CRPC のサブセットにおいて過剰発現しており、腫瘍抑制遺伝子 PTEN の欠損と相乗的に作用して転移性前立腺癌の発生を促進します。また、抗 CDCP1 抗体をエンザルタミドと併用した化学療法は、前立腺腫瘍の進行を著しく抑制します²⁾。

更に、前立腺癌細胞由来の細胞外小胞（EVs）上に存在する CDCP1 が破骨細胞形成を促進し、骨転移を有する前立腺癌患者の血漿由来 EVs において、高レベルの CDCP1 が検出されることも明らかにされています³⁾。

本製品は、CDCP1 に対して特異性の高い 2 種のモノクローナル抗体を利用し、CDCP1 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

- ・ヒト血液サンプルや細胞培養上清などに含まれる CDCP1 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 CDCP1 抗体と HRP 標識した CDCP1 抗体を用いて、2 ステップサンドイッチ法でヒト

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。

CDCP1 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 CDCP1 抗体が予め固相されています。

最初に、サンプルを ELISA 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 CDCP1 抗体を結合させます。次に、洗浄後、プレートにトラップされたサンプル中の CDCP1 と HRP 標識抗 CDCP1 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、サンプル中のヒト CDCP1 を定量します。

【I-4】構成

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 CDCP1 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 CDCP1 (20ng/mL)	150μL	1 本*	
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 CDCP1 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 3 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 CDCP1 の希釈調製（プレート 1 枚あたり 2 ウェル分ずつ調製）

	濃度(pg/mL)	標準 CDCP1	アッセイ バッファー	希釈率
A	20,000			
B	2,000	50μL of A	450μL	10
C	1,000	250μL of B	250μL	2
D	500	250μL of C	250μL	2
E	250	250μL of D	250μL	2
F	125	250μL of E	250μL	2
G	62.5	250μL of F	250μL	2
H	31.25	250μL of G	250μL	2

キットに入っている標準 CDCP1（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 CDCP1(31.25～2,000pg/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 CDCP1 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 CDCP1 抗体(500 倍濃縮)20μL を加え、転倒混和します。希釈調製した HRP 標識抗 CDCP1 抗体、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。

血漿はアッセイバッファーを用いて 2 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 x 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(2000pg/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-6】 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。

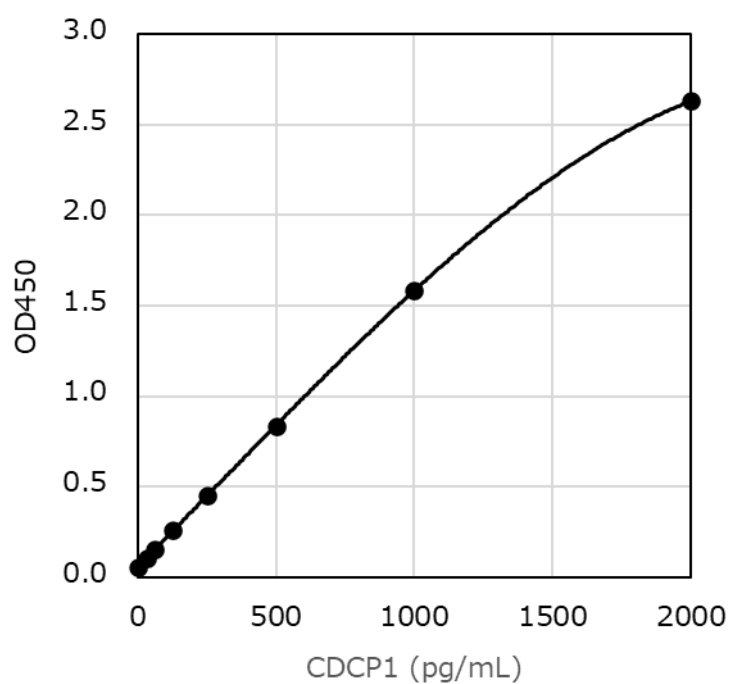
【Ⅲ】 測定方法

1. 抗 CDCP1 抗体固相化プレートと試薬を室温に戻します。
2. 標準 CDCP1 を希釈調製します（【Ⅱ-2】）。
3. 2 で希釈調製した標準 CDCP1 (31.25～2,000pg/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 CDCP1 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 CDCP1 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、標準 CDCP1 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 CDCP1 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、アッセイ毎に新たな標準曲線を描いてください。



標準 CDCP1 (pg/mL)	吸光度(450nm)		平均吸光度
	1	2	
0	0.056	0.056	0.056
31.25	0.106	0.105	0.106
62.5	0.155	0.149	0.152
125	0.252	0.262	0.257
250	0.454	0.445	0.450
500	0.858	0.815	0.837
1,000	1.660	1.508	1.584
2,000	2.724	2.535	2.630

図1 標準 CDCP1 による標準曲線

【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) H. Koistinen et al.: *IUBMB Life.*, **75**, 493 (2023).
- 2) A. Alajati et al.: *J Clin Invest.*, **130**, 2435 (2020).
- 3) F. Urabe et al.: *J Extracell Vesicles.*, **12**, 12312 (2023).

CDCP1 ELISA Kit, Human

【 I 】 About this kit

【 I – 1 】 Background and Measurement Principal

Prostate cancer (PCa) is one of the most frequent cancer types in men with 679,000 diagnoses and 220,000 deaths worldwide each year.

Most notably, several kallikrein-related peptidases, including KLK3 (prostate-specific antigen, PSA) have been extensively studied and found to promote prostate cancer progression. Recent findings also suggest a critical role for CDCP1 (CUB domain-containing protein 1) as the protease-activated transmembrane proteins in the development of advanced and aggressive castration-resistant prostate cancer (CRPC).¹⁾

CDCP1 is overexpressed in a subset of CRPC. Notably, CDCP1 cooperates with the loss of the tumor suppressor gene PTEN to promote the emergence of metastatic prostate cancer. Moreover, we demonstrate that anti-CDCP1 immunoliposomes (anti-CDCP1 ILs) loaded with chemotherapy suppress prostate cancer growth when administered in combination with enzalutamide.²⁾

The effect of EVs isolated from metastatic PCa cells on mature osteoclast formation in the presence of RANKL and used functional siRNA screening to determine that CDCP1, which is a membrane protein located on EVs derived from PCa cells, promotes osteoclastogenesis. In addition, it was found that high levels of CDCP1 were detected in plasma-derived EVs from PCa patients with bone metastasis.³⁾

This product is a two-step sandwich ELISA kit to detect CDCP1 protein using a couple of highly specific monoclonal antibodies against the extracellular domain of human CDCP1.

【 I – 2 】 Features

- Directly quantitate exosomal CDCP1 in human blood samples or cell culture supernatant.
- No special equipment is required. Standard microplate reader capable of reading at 450nm will do the job.
- Detect human CDCP1 by two-step sandwich method using immobilized anti-CDCP1 antibody and HRP conjugated anti-CDCP1 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-CDCP1 antibody.

First, the sample is added into the wells of the ELISA plate and allowed to react. Next after washing, HRP conjugated anti CDCP1 antibody is added to react.

After washing, substrate is added to the HRP conjugated anti CDCP1 antibody reacted with CDCP1. Finally, HRP color development is read with a plate reader to quantify human CDCP1 in the sample.

【 I – 4 】 Kit Component

Storage temperature : 2 ~ 8 °C

	Reagent	Volume	Quantity
1	Anti-CDCP1 Antibody Immobilized Plate	96well (8well x 12 strips)	1 plate
2	CDCP1 Standard (20ng/mL)	150μL	1tube* ¹
3	Assay Buffer	25mL	1vial
4	Washing Buffer (10X) * ²	25mL	1vial
5	HRP Conjugated Anti-CDCP1 Antibody (500X) * ³	20μL	1tube
6	Substrate Solution	12mL	1vial
7	Stop Solution (2N H ₂ SO ₄)	6mL	1vial
8	Plate Seals		2sheet

*¹ Sufficient to create 3 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)	CDCP1 Standard	Assay Buffer	Dilution factor
A	25,000			
B	2,500	50µL of A	450µL	10
C	1,250	250µL of B	250µL	2
D	625	250µL of C	250µL	2
E	312.5	250µL of D	250µL	2
F	156.3	250µL of E	250µL	2
G	78.2	250µL of F	250µL	2
H	39.1	250µL of G	250µL	2

- To prepare Solution B, add 450µL of Assay Buffer into 50µL of 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 200µL for measurement, using 2 wells for each solution (n=2).
- Diluted CDCP1 Standard Solution(31.25~2,000pg/mL) should be freshly prepared at each time before use.

【Ⅱ-3】 Preparation of antibody solution

Dilute HRP conjugated anti-CDCP1 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

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

Plasma is measured as a sample diluted 2-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

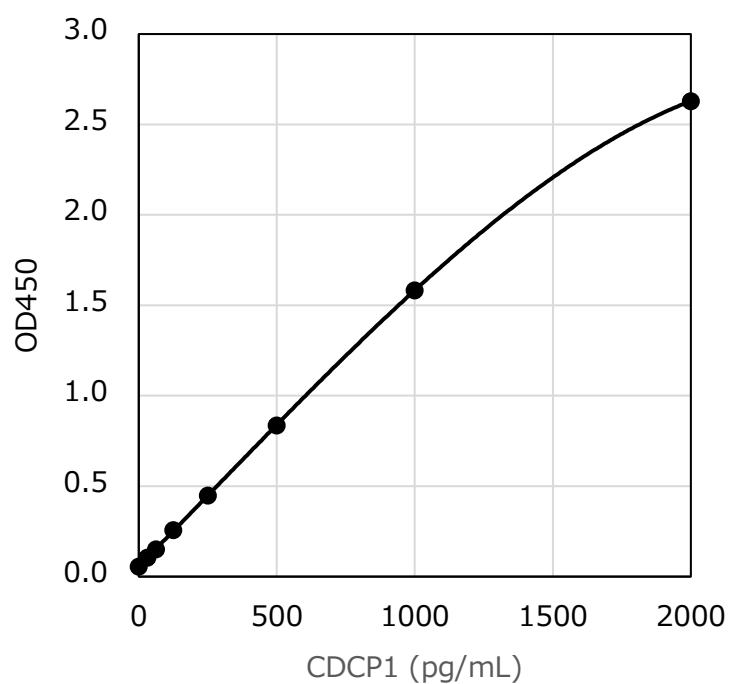
1. Bring anti-CDCP1 antibody solid phased plate and the reagents to the room temperature.
2. Prepare CDCP1 Standard solution by serial dilution. (from step 【Ⅱ-2】)
3. Add 100µL each of serial diluted CDCP1 Standard solution (31.25 ~ 2,000pg/mL) or Sample solution into the well.
4. Seal the microplate 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 CDCP1 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.
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 CDCP1 in the sample.

【IV】 Measurement example

【IV- 1】 Standard curve

As an example, the graph of absorbance (OD450) against standard concentration is drawn as shown in Figure 1. However, draw a new standard curve for each assay to calculate the concentration in the sample.



Standard CDCP1 Solution (pg/mL)	Absorbance (450nm)		mean
	1	2	
0	0.056	0.056	0.056
31.25	0.106	0.105	0.106
62.5	0.155	0.149	0.152
125	0.252	0.262	0.257
250	0.454	0.445	0.450
500	0.858	0.815	0.837
1,000	1.660	1.508	1.584
2,000	2.724	2.535	2.630

Fig.1 Standard curve

【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) H. Koistinen et al.: *IUBMB Life.*, **75**, 493 (2023).
- 2) A. Alajati et al.: *J Clin Invest.*, **130**, 2435 (2020).
- 3) F. Urabe et al.: *J Extracell Vesicles.*, **12**, 12312 (2023).