

HER2 ELISA Kit, Dog

イヌ HER2 ELISA キット

【I】キットについて

【I-1】背景と測定原理

HER2（ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 : human epidermal growth factor receptor type2）は、さまざまなヒトの固形腫瘍で頻繁に過剰発現しています。HER2 は ErbB ファミリーの他の 3 つの受容体の何れともヘテロ二量体を形成します。受容体のヘテロ二量体化は、ヘテロ二量体の細胞質ドメイン内のチロシン残基の自己リン酸化をもたらし、細胞増殖と発癌につながるシグナル伝達を開始します。¹⁾

ラパチニブは、HER2 の過剰発現および/または遺伝子増幅を抱えるヒトの乳がんに対して確立された治療薬です。イヌの乳腺癌、胃腺癌、尿路上皮癌細胞においても HER2 蛋白の過剰発現が認められており、最近、ピロキシカムと組み合わせてラパチニブ（HER 2 チロシンキナーゼ阻害剤）で治療されたイヌの筋肉浸潤性尿路上皮癌において、臨床反応および、無増悪生存期間並びに全生存期間はピロキシカム単独のイヌよりも優れているというデータも示されています。²⁾ したがって、イヌの癌においても HER2 の発現を調べるのが重要となりつつあります。

組織中の蛋白発現を調べる IHC 検査(免疫組織化学染色法)は、一般的に侵襲性が高く患者さんの負担も大きいです。また、獣医学では、ヒト HER2 に対する抗体を用いた IHC 検査が主に報告され、イヌ体液中の HER2 蛋白を定量的に測定した報告は多くありません。

本製品は、イヌにおいても有用な腫瘍マーカーとなりうるイヌ HER2 蛋白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、イヌの血清や尿中の HER2 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。³⁾

【I-2】キットの特長

- ・ 抗イヌ HER2 抗体を固相化したプレートと HRP 標識した抗イヌ HER2 抗体を用いた 2 ステップ

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。

サンドイッチ法により高感度にイヌ HER2 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 - 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 プレートは抗イヌ HER2 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 標識抗イヌ HER2 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イヌ HER2 と HRP 標識抗イヌ HER2 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、サンプル中のイヌ HER2 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	抗イヌ HER2 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	標準イヌ HER2	200μL	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)	25mL	1 本	
5	HRP 標識抗イヌ HER2 抗体 (500 倍濃縮)	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	

*n=2 として、検量線 4 回分

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。

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】標準イヌ HER2 の希釈調製（アッセイ毎に 2 ウェル分ずつ調製）

	イヌ HER2 濃度 (pg/mL)	標準イヌ HER2	アッセイ バッファー	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	93.8	250μL of F	250μL	2
H	4.69	250μL of G	250μL	2

キットに入っている標準イヌ HER2（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。

希釈調製した標準イヌ HER2(4.69~3000 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 標識抗イヌ HER2 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 標識抗イヌ HER2 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 標識抗イヌ HER2 抗体、必要量を用時調製してください。

【Ⅱ-4】サンプル調製

アッセイバッファーを用いて、血清は 10 倍希釈、尿は 2 倍希釈してサンプルとして用いてください。

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℃で保存して下さい。

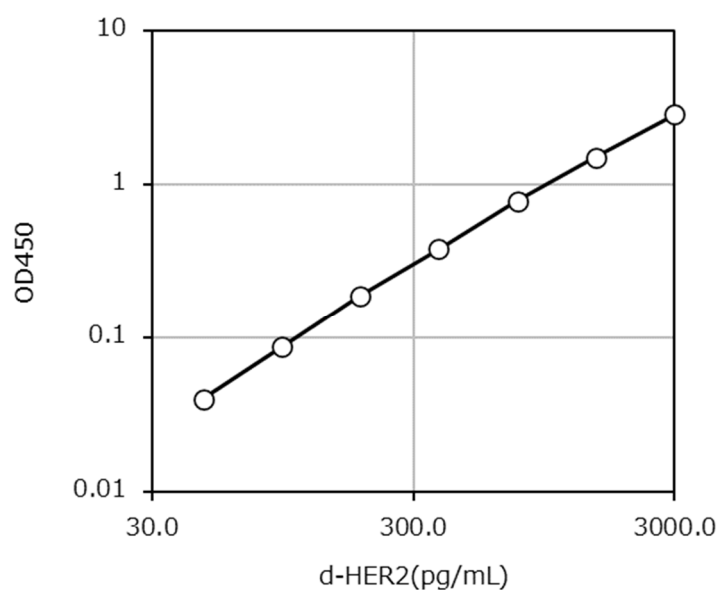
【Ⅲ】 測定方法

1. 抗イヌ HER2 抗体固相化プレートと試薬を室温に戻します。
2. 標準イヌ HER2 を希釈調製します（【Ⅱ-2】）。
3. 2 で希釈調製した標準イヌ HER2 (46.9～3000 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、プレートシェーカーで攪拌(800rpm, 30 秒)します。
5. 室温で 2 時間静置反応します。
6. 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。
7. 希釈調製した HRP 標識抗イヌ HER2 抗体（【Ⅱ-3】）を各ウェルに 100μL ずつ加えます。
8. プレートにシールし、プレートシェーカーで攪拌(800rpm, 30 秒)します。
9. 室温で 2 時間静置反応します。
10. 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。
11. 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。
12. 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。
13. 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）。
14. 横軸に標準イヌ HER2 濃度、縦軸に吸光度を取り、標準曲線を描きます（図 1）。

【Ⅳ】 測定例

【Ⅳ-1】 標準曲線

一例として、標準イヌ HER2 濃度(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イヌ HER2 濃度(pg/mL)を算出し、更に希釈倍数を乗じて血清または尿中のイヌ HER2 濃度(pg/mL)を求めてください。



(各イヌ HER2 濃度の吸光度からブランク吸光度を差し引いた値をプロットしています)

イヌ HER2 (pg/mL)	吸光度(450nm)		平均吸光度	濃度計算値 (pg/mL)
	1	2		
0	0.058	0.061	0.060	
46.9	0.101	0.099	0.100	
93.8	0.149	0.146	0.148	
187.5	0.246	0.254	0.250	
375	0.444	0.441	0.443	
750	0.885	0.816	0.851	
1500	1.593	1.563	1.578	
3000	2.967	2.900	2.934	
血清サンプル	0.463	0.457	0.460	382.8

図1 標準イヌ HER2 による標準曲線および血清サンプル測定

【参考文献】

- 1) Y. Yarden, et al.: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 127 (2001)
- 2) S. Maeda, et al.: *Sci Rep.*, **12**, 4 (2022)
- 3) 国内特許出願中

HER2 ELISA Kit, Dog

【 I 】 About this kit

【 I – 1 】 Background and Measurement Principal

HER2 are frequently overexpressed in various human malignancies. Heterodimerization of these receptors results in the autophosphorylation of tyrosine residues within the cytoplasmic domain of the heterodimer and initiates signaling pathways leading to cellular proliferation and carcinogenesis.¹⁾

Lapatinib is an established therapeutic drug in human breast cancer harboring HER2 overexpression and/or gene amplification. It has been suggested that lapatinib (HER2 tyrosine kinase inhibitor) therapy combined with piroxicam in spontaneous canine muscle-invasive urothelial carcinoma is superior to piroxicam monotherapy in terms of clinical response, progression-free survival (PFS) and overall survival (OS).²⁾ As a result, it becomes important to detect the expression of HER2 in canine tumors as well.

In general, immunohistochemistry (IHC) tests for the protein expression in tissues are highly invasive and stressful for patients. In veterinary medicine, few reports describes quantitative measurement of HER2 protein in the canine body fluids although some IHC tests using anti-HER2 antibodies are reported.

This product is a two-step sandwich ELISA kit to detect HER2 protein in canine serum or urine using couple of highly specific monoclonal antibodies against canine HER2 which may be a potential biomarker in canine tumors.³⁾

【 I – 2 】 Features

- Detects high sensitivity dog HER2 by a two-step sandwich method using solid phase anti-dog HER2 antibody and HRP conjugated anti-dog HER2 antibody.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

- 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-dog HER2 antibody.

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

Next after washing, HRP conjugated anti-dog HER2 antibody is added to react. after washing, substrate is added to the HRP conjugated anti-dog HER2 antibody reacted with HER2.

Finally, HRP color development is read with a plate reader to quantify dog HER2 in the sample.

【 I – 4 】 Kit Component

Storage temperature : 2 ~ 8 °C

	Reagent	Volume	Quantity
1	Anti-dog HER2 Antibody Immobilized Plate	96well (8well x 12 strips)	1 plate
2	Dog HER2 Standard	200μL	1tube*
3	Assay Buffer	25mL	1vial
4	Washing Buffer (10X)	25mL	1vial
5	HRP Conjugated Anti-dog HER2 Antibody (500X)	20μL	1tube
6	Substrate Solution	12mL	1vial
7	Stop Solution (2N H ₂ SO ₄)	6mL	1vial
8	Plate Seals		1sheets

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

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)	Dog HER2 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	93.8	250μL of F	250μL	2
H	46.9	250μL of G	250μL	2

- To prepare Solution B, add 450μL of Assay Buffer into 50μL of Dog HER2 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 Dog HER2 Standard Solution(46.9~3000 ng/mL) should be freshly prepared at each time before use.

【II –3】 Preparation of antibody solution

- Dilute HRP conjugated anti-dog HER2 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

Dilute serum 10-fold and urine 2-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-dog HER2 antibody solid phased plate and the reagents to the room temperature.
2. Prepare Dog HER2 Standard solution by serial dilution. (from step 【II – 2】)
3. Add 100 μ L each of serial diluted Dog HER2 Standard solution (46.9~3000 pg/mL) or Sample solution into the well.
4. Seal the microplate with Plate Seals, place into plate shaker, and then shake it at 800 rpm for 30 sec.
5. Incubate at room temperature for 2hrs for static reaction.
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-dog HER2 antibody (from step 【II-3】) to the well.
8. Seal the plate, and then shake it in the plate shaker at 800 rpm for 30 sec.
9. Incubate at room temperature for 2hrs for static reaction.

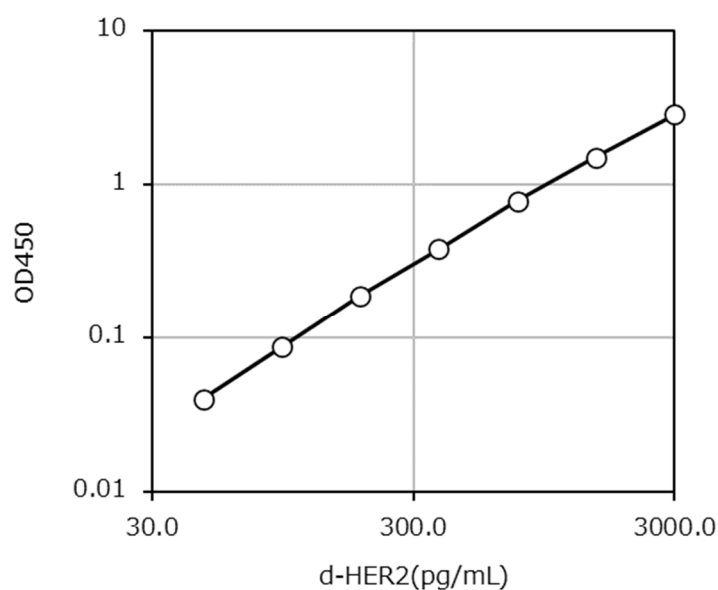
10. Discard the reaction solution, and then rinse each well with 300 μ L of Washing Buffer(from step 【II-1】). Repeat this step for 3 times.
11. Add 100 μ L of Substrate Solution into each well, and then incubate at room temperature protected from light for 20min for static reaction.
12. Visually confirm 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 average blank control subtracted absorbance value for each Dog HER2 Standard concentration (y axis) against the Dog HER2 Standard concentration (x axis).
15. Determine the concentration of the target protein in the sample by interpolating the blank control subtracted absorbance values against the standard curve. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, if used, to obtain the concentration of dog HER2 in the sample.

【IV】 Measurement example

【IV- 1】 Standard curve

As an example, the graph of absorbance (OD450) against Dog Standard HER2 concentration is drawn as shown in Figure 1.

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



(Plotted is the value obtained by subtracting the blank absorbance from the absorbance of each standard protein concentration)

Dog HER2 (pg/mL)	Absorbance (450nm)		Average	Calculated value (pg/mL)
	1	2		
0	0.058	0.061	0.060	
46.9	0.101	0.099	0.100	
93.8	0.149	0.146	0.148	
187.5	0.246	0.254	0.250	
375	0.444	0.441	0.443	
750	0.885	0.816	0.851	
1500	1.593	1.563	1.578	
3000	2.967	2.900	2.934	
Serum sample	0.463	0.457	0.460	382.8

Fig.1 Standard curve and measured values

【Reference】

- 1) Y. Yarden, et al.: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 127 (2001)
- 2) S. Maeda, et al.: *Sci Rep.*, **12**, 4 (2022)
- 3) Domestic patent pending.