

研究用試薬

---

**YK260 Human Prorenin (open form) ELISA**

取 扱 説 明 書

---

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770 TEL: 0544-22-2771

Website: [www.yanaihara.co.jp](http://www.yanaihara.co.jp) E-mail: [ask@yanaihara.co.jp](mailto:ask@yanaihara.co.jp)

## 目 次

|              |     |
|--------------|-----|
| ． はじめに       | 2   |
| ． 特徴         | 3   |
| ． キットの構成     | 4   |
| ． 操作法        | 4～5 |
| ． 操作上の注意     | 5～6 |
| ． 基本性能       | 6～8 |
| ． 貯蔵法および有効期間 | 8   |
| ． 文献         | 8   |

## YK260 Human Prorenin (open form) ELISA キット

### ．はじめに

Prorenin は、レニンの非活性型前駆体であり、腎臓の傍系球体装置で生成された preprorenin の N 端 23 個のアミノ酸を切るプロセッシングを受け prorenin に転換された後、一部はさらに N 端の 43 個のアミノ酸を切り離され活性型レニンとして腎臓の分泌細胞に貯蔵されますが、残りは血中に放出されます<sup>1)</sup>。Prorenin は腎臓以外のいくつかの臓器でも産生されますが、レニンの生成部位は基本的に腎臓に限られます。Prorenin は受容体と結合することによって、N 末端の 1 - 43 のペプチドアームが close 型から open 型に変化し、そのアームが蛋白酵素の切断を受けることなく残ったままでもレニンのような酵素活性作用を持ち、angiotensin I を産生します。酸性 (pH3.0) または低温環境への曝露はアームを可逆的に開放させます。Renin inhibitor たとえば aliskiren などは非可逆的にアームを開放させますが、もたらした open 型 prorenin は angiotensinogen を angiotensin I に分解する活性を有しませんが、高濃度の prorenin が腎症、網膜症、微小蛋白尿症などの合併症を併発している糖尿病患者の血中から観測されています<sup>2)</sup>。腎 mesangial 細胞を高濃度の prorenin で培養すると、angiotensin I の産生能力を獲得するだけでなく、TGF- $\beta$ 1、PAI-1、および fibronectin の mRNA 発現も顕著に誘導されます<sup>3)</sup>。肥満ラットでは、インスリン抵抗性の発展が prorenin の非蛋白分解活性化と局部における骨格筋及び脂肪の angiotensin II 産生に関係します<sup>4)</sup>。従って、非蛋白分解活性化 prorenin 濃度の調査は糖尿病や高血圧の疾患における prorenin の病理的メカニズムを解明するのに非常に重要となっています。

その一方、open 型 prorenin のみを特異的に定量測定する商品は存在していません。現在唯一販売されている prorenin を直接定量する ELISA キットは close 型 prorenin を測定できますが、open 型 prorenin は認識できませんので、特に、高血圧患者で治療薬として aliskiren を服用している場合、血中の close/open 型 prorenin の濃度均衡化は著しく変わっていることが考えられますので、これらの患者の血中 prorenin 濃度を測定する際、既存のキットでは血中濃度を正確に反映できません。また、糖尿病合併症や、心臓繊維化などにおける prorenin の病理的な役割を探索する時も close 型 prorenin よりも open 型 prorenin の方が重要であると考えられますので、今回弊社が開発したキットは検体を前処理することなく、直接しかも短時間に open 型 prorenin を特異的に定量できる方法として、今後これらの研究に大いに役立てると期待できます。

|                                              |               |
|----------------------------------------------|---------------|
| YK260 human Prorenin (open form) ELISA キット   | 内容            |
| ▼ 25 ~ 6000pg/mL の範囲で測定できます。                 | 1) 測定プレート     |
| ▼ 41 検体を duplicate でアッセイできます。                | 2) 標準品        |
| ▼ 測定対象：ヒト血漿                                  | 3) 標識抗体       |
| ▼ 測定は 5.5 時間で終了します。                          | 4) 緩衝液 A      |
| ▼ プレートは一行（8 ウエル）ずつ取り外しができますので、キットの分割使用が可能です。 | 5) 緩衝液 B      |
| ▼ 同時再現性<br>CV (%) 1.3 ~ 3.1                  | 6) 濃縮洗浄液      |
| ▼ 日差再現性<br>CV (%) 2.7 ~ 4.2                  | 7) 酵素基質液      |
| 保存と安定性                                       | 8) 酵素反応停止液    |
| 2 ~ 8 で保存してください。使用期限は<br>キット外箱のラベルに表示しています。  | 9) プレート密閉用シール |

## ・ 特徴

本キットはヒトの血漿中に含まれる prorenin (open form) を特異的に定量する測定キットです。本キットによる測定に際しては、検体を前処理する必要なく、血漿分離後アッセイに直接用いることができます。さらに測定は短時間で終了しますので、非常に簡便であり、かつ定量性に優れ、共存する他の生理活性物質や体液成分の影響を受けにくいなど多くの利点があります。

### < 特異性 >

ヒト prorenin (open form) を特異的に認識します。Prorenin (close form) およびレニンとの交差性は認められません。ただし、市販の recombinant prorenin, native を測定した場合、約 2 % 前後の交差性が認められます。これは close/open prorenin の均衡化反応が常に存在していることに由来する open form 型 prorenin が占める割合と考えられます。

### < 測定原理 >

本アッセイ系はマウス抗ヒト preprorenin (21-64) 特異抗体と HRP (horse radish peroxidase) 結合ウサギ抗ヒト prorenin (open form) 2 次抗体標識体を用いたサンドウィッチ法 (ELISA) による測定法です。測定プレート (96 ウエル) の各ウエルには、マウス抗ヒト preprorenin (21-64) 抗体が固定されています。この各ウエルにヒト prorenin (open form) の標準品または検体を加えて反応させます。プレートを洗浄した後、キャッチされたヒト prorenin (open form) に HRP 標識したウサギ抗ヒト prorenin (open form) 2 次抗体を加えて反応させます。これによりウエル上に抗体-抗原-抗体-HRP 複合体が形成されます。最後にこの複合体中の HRP 活性を測定することにより、検体中の prorenin (open form) 濃度を求めることができます。

## ． キットの構成

| 試薬・器具         | 形状    | 規格     | 内容物                                |
|---------------|-------|--------|------------------------------------|
| 1. 測定プレート     |       | 96 ウエル | 1 枚 固定化抗 preprorenin(21-64)抗体      |
| 2. 標準品        | 凍結乾燥品 | 18 ng  | 1 本 組換えヒト prorenin (open form)     |
| 3. 標識抗体       | 液状    | 12 mL  | 1 本 HRP 標識抗 prorenin (open form)抗体 |
| 4. 緩衝液 A      | 液状    | 7 mL   | 1 本 非特異的反応除去剤を含む緩衝液                |
| 5. 緩衝液 B      | 液状    | 5 mL   | 1 本 Aliskiren 含有緩衝液                |
| 6. 濃縮洗浄液      | 液状    | 25 mL  | 1 本 1% Tween20 を含む濃縮生理食塩液          |
| 7. 酵素基質液      | 液状    | 12 mL  | 1 本 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB)    |
| 8. 酵素反応停止液    | 液状    | 12 mL  | 1 本 1 M 硫酸                         |
| 9. プレート密閉用シール | 1 枚   |        |                                    |

## ． 操作法

測定を始める前に必ずお読みください。

(注意：キットに含まれるすべての試薬は室温に戻してから測定を始めてください。)

### < 使用器具および装置 >

1. マイクロピペットおよびチップ (10 $\mu$ L ~ 1mL); 8 連または 12 連のマルチチャンネルピペットの使用を薦めます
2. マイクロプレート用吸光度計 (測定波長 450nm で吸光度 2.5 まで測定できる装置)
3. 標準液または検体希釈の調製に使用するポリプロピレン製チューブ
4. プレートシェーカー (最大速度 250rpm まで可能な仕様)
5. マイクロプレート洗浄装置、手法の場合は連続分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプの使用を薦めます
6. メスシリンダー (500mL)
7. 脱イオン蒸留水

### < 試薬の調製 >

1. 標準液の調製法：標準品の容器に緩衝液 B 0.5mL を加え、内容物を充分溶解させ、36000 pg/mL の標準液を作製します。この標準液 0.1mL を取り、これを緩衝液 B 0.5mL で希釈し 6000 pg/mL の標準液を調製します。ついで、6000 pg/mL の標準液 0.2mL を緩衝液 B 0.4mL で希釈し 2000pg/mL の標準液とします。以下同様の希釈操作を繰り返し、667、222、74、25 pg/mL の各標準液を調製します。0 pg/mL の標準液は緩衝液 B をそのまま使用します。
2. 洗浄液の調製法：濃縮洗浄 25mL (全量)を脱イオン蒸留水 475mL にて希釈し使用します。
3. その他の試薬はそのまま < 測定操作 > に従って使用します。

#### <測定操作>

1. キット内容を室温(20～30℃)に戻します。
2. 各ウエルに緩衝液 A 50  $\mu$ L を入れます。
3. 各濃度の標準液または検体 50  $\mu$ L を加えます。
4. 測定プレートがプレート密閉用シールで密閉し、プレートシェーカーにて室温で4時間反応させます。
5. 各ウエル中の液を除き、洗浄液 350  $\mu$ L を満たした後、洗浄液を除きます。さらに洗浄液 350  $\mu$ L を加え、同様の洗浄操作を合計4回繰り返します。
6. 各ウエルに標識抗体 100  $\mu$ L を加えます。
7. 測定プレートがプレート密閉用シールで密閉し、プレートシェーカーにて室温で1時間反応させます。
8. 反応終了後、5. と同様の洗浄操作を行います。
9. 各ウエルに酵素基質液 100  $\mu$ L を加えます。
10. 測定プレートがプレート密閉用シールで密閉し、プレートシェーカーにて室温で遮光しながら30分間反応させます。
11. 各ウエルに酵素反応停止液 100  $\mu$ L を加えます。
12. マイクロプレート用吸光度計にて 450nm の吸光度(620nm を参照波長として)を測定します。
13. 標準液の各濃度(6ポイント)の吸光度測定値から 0 pg/mL 濃度の吸光度測定値を差し引き、横軸に標準液の各濃度を、縦軸に標準液各濃度の吸光度をプロットし、標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、prorenin (open form)の濃度を読み取る。2000 pg/mL から 0 pg/mL の範囲においては常に直線性が認められます。

#### ・ 操作上の注意

1. 抗凝固剤 EDTA-2Na 入りの血漿は分離後冷蔵冷凍をせず、ただちに測定することが望ましい。  
Close/open prorenin の均衡反応が常に存在し、しかもその割合は温度に影響されるためです。  
すぐ測定出来ない場合は適宜小分けし、-30℃以下で凍結保存してください(長期保存の場合、-80℃の超低温冷凍庫に保存してください)。ただし、冷蔵または凍結保存中でも測定値の上昇がある程度観察されていますので、値を垂直方向で比較される時注意が必要です。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・希釈を原則としてください。キット分割使用時、各希釈された標準液は次回の使用に利用しないで下さい。その他の試薬は4℃保存してください。洗浄液と停止液は室温で構いません。残った試薬は2週間以内に使用してください。

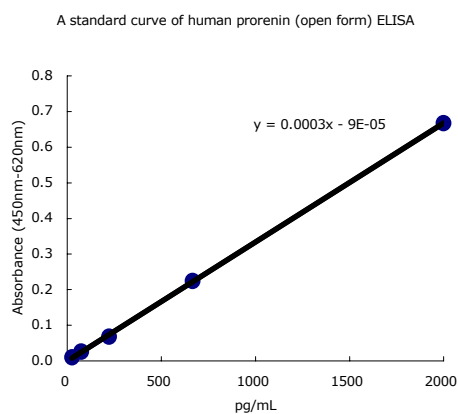
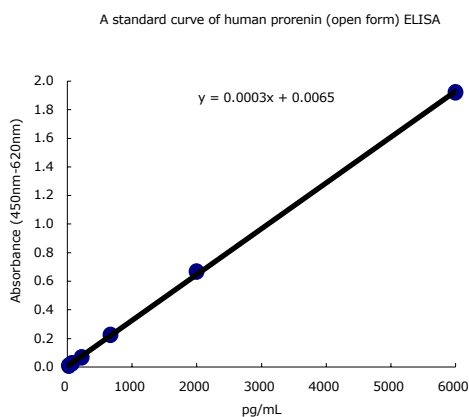
3. 洗浄時にウエルに残液が残らないように反転したプレートをやや強くたたきつけるようにして紙タオルなどの上に充分叩いて残液が残らないように注意してください。
4. 検体をウエルに注入する場合は、検体ごとに必ず新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。標準液を希釈するときは、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。なお、ピペットの操作は丁寧かつ正確に行ってください。
5. 標準液、検体ともに測定は二重以上の測定で行ってください。
6. 酵素基質の発色レベルは、反応温度、時間などでわずかながら影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごとに作成してください。
7. 発色反応は必ずプレートを遮光して行ってください。
8. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
9. 試薬の保管中もしくは使用中は、強い光が当たらないように注意してください。
10. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせ使用しないでください。

## ・ 基本性能

### < 測定範囲 >

25~6000 pg/mL

### < 標準曲線の 1 例 >



< 再現性 >

同時再現性

| Intra-assay variation | Measured (pg/mL) | %CV |
|-----------------------|------------------|-----|
| QC sample 1           | 224±7            | 3.1 |
| QC sample 2           | 364±10           | 2.8 |
| QC sample 3           | 1198±15          | 1.3 |

(mean ± SD, n=10)

日差再現性

| Inter-assay variation | Measured (pg/mL) | %CV |
|-----------------------|------------------|-----|
| QC sample 4           | 277±12           | 4.2 |
| QC sample 5           | 679±28           | 4.1 |
| QC sample 6           | 2366±64          | 2.7 |

(mean ± SD, n=5)

< 添加回収試験 >

| Human plasma | Prorenin (open form)<br>added (pg/mL) | Observed<br>(pg/mL) | Expected<br>(pg/mL) | Recovery<br>(%) |
|--------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| No.1         | 0                                     | 137                 |                     |                 |
|              | 66                                    | 201                 | 203                 | 99.0            |
|              | 595                                   | 710                 | 732                 | 97.0            |
|              | 1784                                  | 1864                | 1921                | 97.0            |
| No.2         | 0                                     | 85                  |                     |                 |
|              | 66                                    | 164                 | 151                 | 108.6           |
|              | 595                                   | 646                 | 680                 | 95.0            |
|              | 1784                                  | 1881                | 1869                | 100.6           |
| No.3         | 0                                     | 87                  |                     |                 |
|              | 66                                    | 180                 | 153                 | 117.6           |
|              | 595                                   | 766                 | 682                 | 112.3           |
|              | 1784                                  | 2004                | 1871                | 107.1           |

< 希釈試験 >

| Human plasma | Dilution ratio<br>(1X ) | Observed<br>(pg/mL) | Expected<br>(pg/mL) | % of expected |
|--------------|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------|
| No.1         | 1                       | 204                 |                     |               |
|              | 2                       | 86                  | 102                 | 84.3          |
|              | 4                       | 61                  | 51                  | 119.6         |
| No.2         | 1                       | 172                 |                     |               |
|              | 2                       | 79                  | 86                  | 91.9          |
|              | 4                       | 58                  | 43                  | 134.9         |
| No.3         | 1                       | 185                 |                     |               |
|              | 2                       | 93                  | 93                  | 100           |
|              | 4                       | 53                  | 46                  | 115.2         |

<交差性>

ヒト prorenin (open form) 100%, preprorenin (21-64) 0%, prorenin (close form) 0%, renin 0%

・ 貯蔵法および有効期間

<貯蔵>

遮光し、2～8℃にて保存してください。

<有効期間>

製造日より6ヶ月（暫定、使用期限は外箱に表示）

<包装>

1キット96テスト分（標準曲線作成用を含む）

・ 文献

1. Imai T, Miyazaki H et al: **Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:7405-7409, 1983
2. Luetscher JA, Kreamer FB et al: **Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications.** *N Engl J Med.* 312:1412-1417, 1985
3. Zhang J, Wu J et al: **Receptor-mediated nonproteolytic activation of prorenin and induction of TGF- $\beta_1$  and PAI-1 expression in renal mesangial cells.** *Renal Physiol.* 303:no. 1 F11-F20, 2012
4. Rafiq K, Mori H et al: **(Pro)renin receptor and insulin resistance: Possible roles of angiotensin II-dependent and -independent pathways.** *Mol. Cell Endocrinol.*, 2012, Jun 7 Epub

<お問い合わせ先>

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770 TEL: 0544-22-2771

<http://www.yanaihara.co.jp> [ask@yanaihara.co.jp](mailto:ask@yanaihara.co.jp)

初版：2013年2月15日

改訂：2013年4月22日