

研究用試薬

YK050 Rat Leptin 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 E-mail: ask@yanaihara.co.jp

目次

I. はじめに	2
II. 特徴	3
III. キットの構成	4
IV. 操作法	5~6
V. 操作上の注意	7
VI. 基本性能	8
VII. 貯蔵法および有効期間	9
VIII. 文献	9

YK050 Rat Leptin ELISA キット

I. はじめに

ob 遺伝子の構造解析から推定されたたんぱく質、レプチンは 167 アミノ酸残基から構成され、その投与によって *ob/ob* マウスおよび正常マウスに食欲減退と、体重・体脂肪量・血糖値および血中インスリン値の低下が現れることが知られています。また、脳のニューロンペプチド Y (NPY) の遺伝子発現が低下しその生合成の抑制効果もみられます。近年、ヒトレプチンの定量が可能になり、ヒト肥満患者では血中レプチン濃度が上昇していること、その濃度は体脂肪率に良く相関することが明らかにされました。これらの結果から、血中レプチン濃度は、脂肪組織重量を反映すると考えられ、肥満の診断や治療の優れた指標となりうることが示されました。最近、脂肪細胞はエネルギー貯蔵のみならず、レプチンや TNF- α などのサイトカインをも分泌する細胞としての役割でも注目されております。

マウス、ヒトに続きラットの *ob* 遺伝子産物の構造も明らかにされました。ラットレプチンはマウスレプチンとの高い相同性 (95%) を示しますが、ヒトレプチンとは N 末端部および C 末端部でそれぞれ数残基のアミノ酸の置換が認められています。こうした背景からラットを用いる研究に必須である高感度のラットレプチン測定系の確立が求められておりました。

矢内原研究所では、ラットレプチン測定系の開発を進め、従来法に比し極めて優れた性能を有する ELISA 系を確立することができました。この測定系は、測定対象サンプル量が微量 (20 または 50 μ L) で済み、測定に要する時間が約 5.5 時間です。

本 ELISA 系には、抗レプチンモノクローナル抗体、および家兎抗ラットレプチン血清を用い、標準抗原として組換えラットレプチン、標識抗体として西洋ワサビ過酸化酵素 (HRP) 標識抗レプチンポリクローナル抗体を用いております。

YK050 Rat Leptin ELISA キット	内容
▼ 78.1~5000 pg/mL (血漿、血清検体以外の場合) 312.5~20000 pg/mL (血漿、血清検体の場合) の範囲を測定できます。	1) 抗体固定化プレート
▼ 測定は 5.5 時間で終了します。	2) ラットレプチン標準品
▼ 40 検体を duplicate で測定できます。	3) 酵素 (HRP) 標識抗体
▼ 細胞培養液、血漿、血清の測定が可能です。	4) 基質溶解液
▼ プレートは一列 (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) OPD 錠
▼ 同時再現性 CV (%) 3.9~4.5	6) 酵素反応停止液
▼ 日差再現性 CV (%) 6.2~9.5	7) 緩衝液 (A)
▼ 保存と安定性 2~8°C で保存してください。製造日より 20 ヶ月は安定です。	8) 緩衝液 (B)
	9) 濃縮洗浄液
	10) プレート密閉用シール

II. 特徴

本キットはラットの血漿、血清、その他細胞培養液に含まれるラットレプチンを定量的に測定するためのキットです。本キットによるラットレプチンの測定は簡便にしかも特異性、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。なお、添付の標準ラットレプチンは組換体であり、表示の重量はたんぱく質定量によって求められた絶対量を示しています。

< 1 日法 >

測定は約 5.5 時間で終了します。

< 測定原理 >

本キットによる測定法はサンドイッチ法に基づいています。96 ウエルプレートの各ウエルには抗ラットレプチンモノクローナル抗体が固定化されています。この抗体に標準抗原(標準品)、または検体および HRP 標識抗ラットレプチンポリクローナル抗体を反応させることにより、抗原抗体複合体を形成させます。最後にこの複合体中の HRP 活性を測定することにより、検体中のラットレプチン濃度を求めることができます。

< 特異性 >

本キットはラットレプチンに特異的であり、ヒトレプチンとの交差反応性は 0.02 ~0.04%以下にすぎません。なお、ラット IL-1 α 、IL-1 β 、ラット TNF- α 、ヒト TNF- α および他のサイトカインとは交差反応を認めません。

Ⅲ. キットの構成

試薬	形状	規格	内容物
1. 抗体固定化プレート	ドライプレート	96 ウェルプレート 1枚	抗ラットレプチンモノクローナル抗体
2. ラットレプチン標準品	凍結乾燥品	1本	ラットレプチン (20 ng)
3. 酵素(HRP)標識抗体	液状	6 mL 1本	HRP 標識抗ラットレプチンポリクローナル抗体 及び非特異反応除去剤を含むトリス緩衝液
4. 基質溶解液	液状	24 mL 1本	0.015%過酸化水素を含む0.1 M リン酸 ナトリウム-クエン酸緩衝液
5. OPD 錠	錠剤	2錠	o-フェニレンジアミン
6. 酵素反応停止液	液状	12 mL 1本	1M H ₂ SO ₄
7. 緩衝液 (A)	液状	20 mL 1本	非特異反応除去剤を含むトリスHC 1 緩衝液
8. 緩衝液 (B)	液状	15 mL 1本	非特異反応除去剤を含むトリスHC 1 緩衝液
9. 濃縮洗浄液	濃縮液	50 mL 1本	1%Tween20 を含む濃縮生理食塩水
10. プレート密閉用シール		2枚	

IV. 操作法

<使用器具および装置>

1. マイクロタイタープレートの吸光度計、波長 490 nm で 2.5 まで測定できる装置
2. マイクロタイタープレート振とう器またはシェーカー
3. マイクロタイタープレート洗浄器、用手法の場合は連続分注器、ニードルディスプレイペンサー、アスピレーター、または真空ポンプ
4. マイクロピペットおよびチップ（8 連または 12 連のマルチチャンネルピペットを使用する。）
5. 標準液の調製に使用するポリプロピレンまたはガラス製の試験管
6. メスシリンダー（1000 mL）
7. 蒸留水または脱イオン水

<試薬の調製>

1. 標準液の調製法：

(A) 血漿、血清の検体 20 μ L で測定の場合：

ラットレプチン標準品（凍結乾燥品）に 1 mL の緩衝液 (A) を加えて溶解し、20000 pg/mL 標準液を調製する。以下同緩衝液 (A) にて 2 倍連続段階希釈する。すなわちこの標準液 0.2 mL をとり、これを緩衝液 (A) 0.2 mL で希釈し 10000 pg/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、5000, 2500, 1250, 625, 312.5 pg/mL の各標準液を調製する。0 pg/mL の標準液は緩衝液 (A) をそのまま用いる。

(B) 血漿、血清以外の検体 50 μ L で測定の場合：

ラットレプチン標準品（凍結乾燥品）に 1 mL の緩衝液 (B) を加えて溶解し、この 0.1 mL をとり、緩衝液 (B) 0.3 mL を加え、5000 pg/mL 標準液を調製する。以下同緩衝液 (B) にて 2 倍連続段階希釈する。すなわち、この標準液 0.2 mL をとり、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 2500 pg/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、1250, 625, 312.5, 156.2, 78.1 pg/mL の各標準液を調製する。0 pg/mL の標準液は緩衝液 (B) をそのまま用いる。

2. 発色剤溶液の調製法：
使用直前に基質溶解液 11 mL に OPD 錠 1 錠を加え溶解し使用する。
3. 洗浄液の調製法：
濃縮洗浄液 50 mL (全量) を精製水 950 mL で希釈し、プレート洗浄用に使用する。
4. その他の試薬はそのまま測定操作にしたがって使用する。

<測定操作>

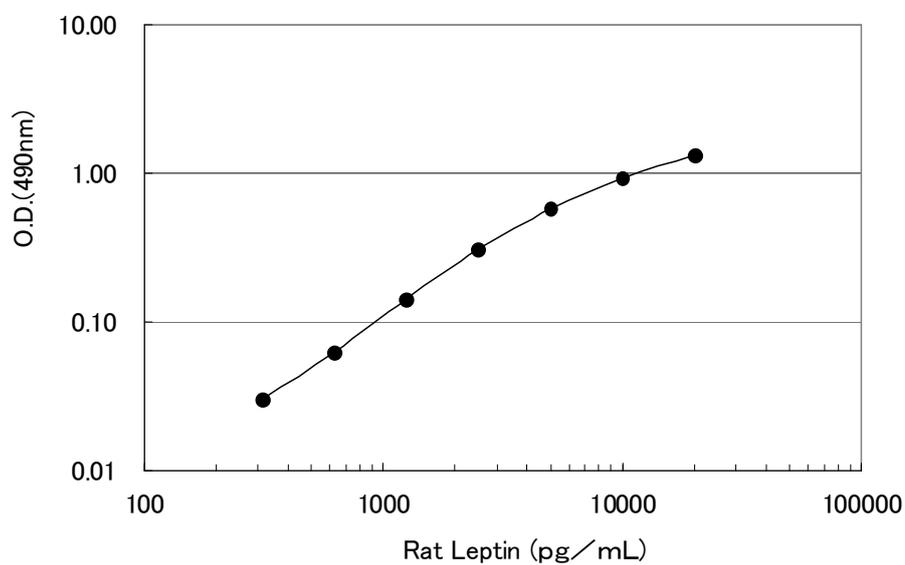
1. キットの内容を室温にもどす。
2. 標準液または検体の分注：
 - (A) 血漿、血清の検体 20 μ L で測定の場合：
各ウエルに添付の緩衝液 (A) 50 μ L を分注した後、上記標準液調製法 (A) にて調製した標準液希釈系列 (0, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000, 10000, 20000 pg/mL の各標準液)、または検体 20 μ L を各ウエルに加えた後、酵素 (HRP) 標識抗体 50 μ L ずつ分注する。全量は 120 μ L/ウエルとなる。
 - (B) 血漿、血清以外の検体 50 μ L で測定の場合：
上記標準液調製法 (B) にて調製した標準液希釈系列 (78.1, 156.2, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 pg/mL の各標準液)、または検体 50 μ L を各ウエルに加えた後、酵素 (HRP) 標識抗体を 50 μ L ずつ分注する。全量は 100 μ L/ウエルとなる。
3. マイクロタイタープレートをシールし、室温 (20~30°C) で 5 時間反応を行なう。
反応中はプレート振とう器を用いてゆっくりと振とうする。
4. 各ウエル中の液を除き、各ウエルに 350 μ L の洗浄液を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいは液を捨てて、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして完全に液を除く。この操作をさらに 4 回繰り返し、合計 5 回の洗浄操作を行なう。
5. 各ウエルに使用直前に調製した発色剤溶液 100 μ L を入れ、室温で 10 分間反応する。
6. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μ L を入れる。
7. マイクロタイタープレート吸光度計にて 490 nm の吸光度を測定する。ラットレプチン標準液の測定値から標準曲線を作成し、検体中のラットレプチン測定値を標準曲線にあてはめ、ラットレプチン濃度を算出する。

V. 操作上の注意

1. 被検血漿、血清は採血後ただちに測定してください。やむを得ない場合には検体を小分け分注し、 -30°C 以下で凍結保存してください。なお、検体の凍結融解の繰り返しは出来る限り避けてください。
2. 標準品および発色剤溶液は用時調製を原則としてください。なお、キットを分割使用する場合、調製後の標準品は適宜小分けして、 -30°C 以下で凍結保存してください。
3. 洗浄原液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。
4. 各ウエルの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行ってください。また検体をウエルに注入する場合は、各検体ごとに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、希釈段階ごとにかみならず新しいチップを使ってください。
5. 20000 pg/mL (血漿・血清)または 5000 pg/mL (血漿・血清以外)を超える高値検体の場合は、検体を本キット添付の緩衝液(A)または(B)にて希釈してください。
6. 反応液を静置したままで抗原抗体反応を行いますと反応性が低下しますので、抗原抗体反応中は必ずマイクロタイタープレート用振とう器を用いて振とうしてください。なお、振とうはプレートシールに反応液がはねないようにゆっくりと行ってください。
7. 測定はすべて2重測定で行ってください。
8. 発色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. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、マイクロタイタープレートの振とうの程度などでわずかですが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。
10. 各試薬の保存もしくは使用中には、これらに強い光が当たらないように注意してください。
11. 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。

VI. 基本性能

標準曲線



添加回収試験 A (血清)

Rat Leptin added (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)
0	0	-	-
625	678	625	108.5
2500	2571	2500	102.8
10000	8795	10000	87.9

添加回収試験 B (培地の場合)

Rat Leptin added (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)
0	0	-	-
156	169	156	108.0
625	668	625	106.9
2500	2482	2500	99.3

- 同時再現性 CV(%) 3.9~4.5
- 日差再現性 CV(%) 6.2~9.5

VII. 貯蔵法および有効期間

<貯蔵> 遮光して、2～8℃にて保存してください。

<有効期間> 製造日より 20 ヶ月

<包装> 1 キット 96 テスト分 (標準曲線作成用も含む)

VIII. 文献

1. Zhang, Y. et al. (1994): Positional cloning of mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425-432
2. Pelleymounter, MA. et al. (1995): Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* **269**:540-543.
3. Funahashi, T. et al. (1995): Enhanced expression of rat obese (ob) gene in adipose tissues of ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**: 469-475
4. McGregor, GP. et al. (1996): Radiomunological measurement of leptin in plasma of obese and diabetes human subjects. *Endocrinology* **137**:1501-1504
5. Sainsbury, A. et al. (1996): Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y to normal rats increase obese gene expression in white adipose tissues. *Diabetologia* **39**:353-356
6. Hosoda, H. et al. (1996): Development of radioimmunoassay for human leptin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**:234-239

<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

2012年8月30日改訂