

研究用試薬

YK231 Human Obestatin EIA

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	6
VI. 基本性能	7
VII. 貯蔵法および有効期間	8
VIII. 文献	8

YK231 Human Obestatin EIA キット

I. はじめに

Obestatin は、ラットの胃から分離された 23 残基のアミノ酸からなるペプチドであり、前駆体を共有し摂食亢進作用を持つ Ghrelin に対し、摂食抑制作用を示しさらに胃内容物排出や空腸の収縮に対し、抑制作用を持っていることが明らかにされています⁽¹⁾。ラット組織の免疫染色では、Obestatin は胃の粘膜細胞、腸管神経叢、精巢の Leydig 細胞に存在し、また、腸管神経叢の Obestatin 陽性神経細胞はほぼすべて Choline acetyltransferase と共存しています⁽²⁾。ラット大脳皮質神経培養実験では、100nM Obestatin 処理により、細胞質内 Ca イオン濃度が上昇することが観察されています⁽²⁾。さらに Obestatin のラット脳室内投与により、自由な飲水、摂食状態にあるラットの飲水を抑制する作用があることが報告されています。また、Angiotensin II 誘導の飲水行動も抑制することが明らかにされています⁽³⁾。

なお、Obestatin はインスリン分泌や、グルコース代謝には直接的な影響はなく、食欲だけを抑制することにより糖代謝に影響を及ぼしているという報告があります⁽⁴⁾。さらに、ラットにおける食欲抑制作用は飲水を抑えることにより二次的に起きたものだと推測されます⁽³⁾。最近では、心臓虚血保護作用、心細胞アポトーシス抑制作用⁽⁵⁾、視床下部ドーパミン放出の抑制作用⁽⁶⁾などが報告されています。今後は、Obestatin が関与するエネルギーホメオスタシスと体重調節の研究など多彩の展開が期待されています。

今回本研究所においてマウス/ラット Obestatin EIA キット開発の成功に続き、ヒトの血漿および血清中の免疫活性 Obestatin の直接測定を可能にしたキットの開発に成功し、これにより生体内 Obestatin の分泌様式や、血中レベルの変動などを検討する上で、有効なツールとして活用できるものであります。

YK231 Human Obestatin EIA キット	内容
▼ 0.231~25ng/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
▼ 血漿、血清 (検体量 20 μ L) サンプルの直接測定ができます。	3) 標識抗原
▼ 測定は 20~22 時間と 1.5 時間で終了します。	4) 特異抗体
▼ プレートは一行 (8 ウェル) 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) SA-HRP 溶液
▼ 同時再現性	6) 酵素基質液
CV(%) 3.5~9.9	7) 酵素反応停止液
▼ 日差再現性	8) 緩衝液
CV(%) 5.6~9.0	9) 濃縮洗浄液
保存と安定性	10) プレート密閉用シール
2~8℃で保存してください。製造日より	
24 ヶ月は安定です。	

II. 特徴

本キットはヒト血漿および血清中に含まれる **Obestatin** を直接且つ特異的に定量するためのキットです。操作は簡便でしかも特異性・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、添付のヒト **Obestatin** 標準品は高純度合成品（純度 99%以上）であり、表示の重量は絶対量を示しております。

<特異性>

本キットはヒト **Obestatin** と 100%、マウス/ラット **Obestatin** と 37.3 %、ヒト **Obestatin(11-23)-NH₂** と 25.2%、ヒト/マウス/ラット **Obestatin(1-10)**と 0.02%以下の交差反応性が認められます。マウス/ラット **Obestatin(11-23)-NH₂** との交差反応性は認められません。また、ヒト **Ghrelin**、ヒト **des-octanoyl-Ghrelin** との交差反応性は標準曲線範囲以内では認められていません。

<測定原理>

本アッセイ系は特異性の高いウサギ抗ヒト **Obestatin** 抗体を用いた競合法に、ビオチンとストレプトアビジンの非常に高い親和性を利用した測定法です。

測定プレート（96 ウェル）の各ウェルには、ヤギ抗ウサギ **IgG** 抗体が固定されています。この各ウェルにビオチン化標識抗原、標準品または検体およびウサギ抗ヒト **Obestatin** 特異抗体を順次加えて競合反応させます。

これに **HRP** (horse radish peroxidase) 結合 **SA** (streptavidin) を加え、ウェル上に **HRP** 結合 **SA**-ビオチン化抗原-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、検体中のヒト **Obestatin** 濃度を求めることができます。有効測定範囲は 0.231~25ng/mL です。

Ⅲ. 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	固定化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体
2. 標準品	凍結乾燥品	25ng	1 本	合成ヒト Obestatin
3. 標識抗原	凍結乾燥品	バイアル	1 本	ビオチン化ヒトObestatin
4. 特異抗体	液状	6 mL	1 本	ウサギ抗ヒトObestatin 抗体
5. SA-HRP 溶液	液状	12 mL	1 本	HRP 結合したストレプトアビジン
6. 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)
7. 酵素反応停止液	液状	12 mL	1 本	1M 硫酸溶液
8. 緩衝液	液状	25 mL	1 本	非特異的反応除去剤を含む緩衝液
9. 濃縮洗浄液	液状	25 mL	1 本	1% Tween20 を含む濃縮生理食塩液
10. プレート密閉用シール		1 枚		

IV. 操作法

測定を始める前に必ず最後までお読みください。ご注意：検体（V. 操作上の注意 1. を参照してください）を除き、キットに含まれるすべての試薬は室温(20-25℃)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（20 μ L～1mL）；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、できれば吸光度 3.0 まで測定可能な装置）。
3. 標準液の調製に使用するポリプロピレン製試験管またはガラス製試験管。
4. マイクロプレート洗浄装置、用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。
5. 蒸留水または脱イオン水およびメスシリンダー（500mL-1000mL）。

<試薬の調製>

1. 標準液の調製法：標準品の容器に緩衝液 1mL を加え、内容物を充分溶解させ、25ng/mL の標準液を作製する。この標準液 0.1mL を取り、これを緩衝液 0.2mL で希釈し 8.333ng/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、さらに 2.778、0.926ng/mL の各標準液を調製する。0.926ng/mL の標準液を 0.1mL を取り、これを緩衝液 0.1mL で希釈し 0.463ng/mL の標準液を調製する。同様に 0.463ng/mL の標準液を 0.1mL を取り、これを緩衝液 0.1mL で希釈し 0.231ng/mL の標準液を調製する。0ng/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
2. 標識抗原溶液の調製法：標識抗原の容器に緩衝液 6mL を加え、内容物を溶解させてから使用する。
3. 洗浄液の調製法：25mL (全量)を蒸留水または脱イオン水 475mL にて希釈し使用する。
4. その他の試薬はそのまま<測定操作>に従って使用する。

<測定操作>

1. 各ウェルに洗浄液 300 μ L を加え、30 秒以上放置した後、アスピレーターによって吸引するかプレートを反転して液を除いてから、反転したプレートを綿ほこりを起さない紙タオルなどに適切な力で確りたたきつけるようにして充分液を除く。
2. 各ウェルに標識抗原溶液 50 μ L を加え、ついで標準液または検体 20 μ L を入れ、さらに特異抗体 50 μ L を加える。
3. 測定プレートをプレート密閉用シールで密閉し、4℃で 20～22 時間静置する。
4. 各ウェル中の液を除き、洗浄液 350 μ L を満たした後、2. と同様の洗浄操作を合計 5 回行った後、反転したプレートを紙タオルなどに適切な力で確りたたきつけるようにして充分液を除く。
5. 各ウェルに SA-HRP 溶液 100 μ L を加える。

6. 測定プレートはプレート密閉用シールで密閉し、室温で 1 時間静置または振とうする。
7. 各ウェル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 5 回行った後、反転したプレートを紙タオルなどに適切な力で確りたたきつけるようにして充分液を除く。
8. 各ウェルに酵素基質液 100 μ L を加え、プレートをプレート密閉用シールで密閉し、遮光の状態で室温 30 分間静置または振とうする。
9. 各ウェルに酵素反応停止液 100 μ L を加える。
10. マイクロプレート用吸光度計にて 450nm の吸光度を測定する。
11. 零濃度標準液の吸光度 (Bo とし) に対し、各濃度標準液の吸光度 (B) の B/Bo% を計算し、標準曲線を作成する。検体もそれぞれの吸光度から B/Bo% を計算し、標準曲線に当てはめ、検体中 Obestatin の濃度を算出する。また、B/Bo% を計算せず、吸光度のみで標準曲線の作成と検体濃度の読取りも可能である。

V. 操作上の注意

1. 血清または血漿は分離後ただちに 分解酵素抑制剤 (例: pepstatin A 10 μ M、または protease inhibitor cocktail set など) を加えてください。ただし、Pepstatin A 10 μ M 添加の場合、測定値が 10 パーセント程の上昇が観測されている。Protease inhibitor cocktail set の場合、有効使用濃度により無視できないほど測定値の大幅な上昇が確認されている。Aprotinin は測定値に影響を与えなかったが、0.8 TIU/mL まで添加しても、有効な抑制効果が認められなかった。血清または血漿分離後ただちに測定出来ない場合は適宜小分けし、 -30°C 以下で凍結保存してください (長期保存の場合、 -80°C の超低温冷凍庫に保存してください)。血液検体は分離後または凍結から融解中プレートに添加するまでは 必ず氷冷保存 し、できるだけ迅速に測定してください。
2. 試薬は、用時調製・希釈を原則としてください。キットを分割使用の場合、溶解 (希釈) した試薬 (標準品および標識抗原) の残液は -30°C 以下にて凍結保存してください。他の試薬は 4°C で保存し、2 週間以内に使ってください。
3. 検体をウェルに注入する場合は、検体ごとになら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、希釈段階ごとになら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。
4. 標準液、検体ともに測定は二重以上の測定で行なってください。
5. 発色反応はかならずプレートを遮光して行ってください。
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毎に作成してください。
7. 不適切な酵素基質液の温度は異常発色の原因となる可能性があるため、酵素基質液を添加する前に必

ず室温に戻して（室温環境で 1 時間以上に置いて）から添加してください。

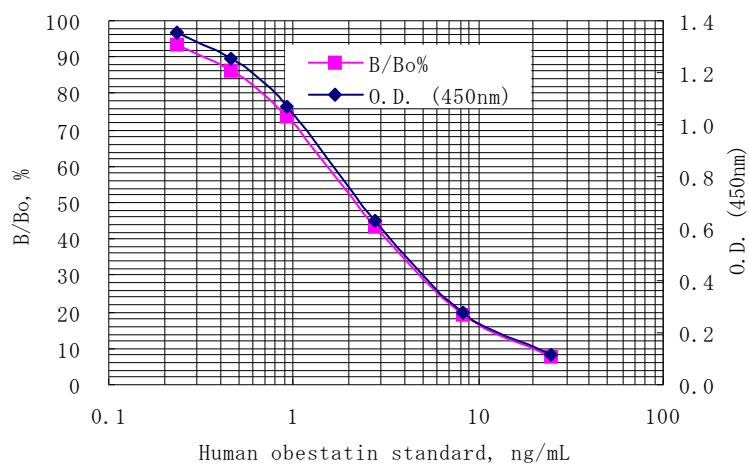
8. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
9. 試薬の保管中もしくは使用中は、強い光が当たらないように注意して下さい。
10. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせ使用しないでください。
11. 複数のキットを使用されるとき、各キットの測定条件をかならず統一して行ってください。

VI. 基本性能

<測定範囲> 有効測定範囲 0.231~25ng/mL

$$\text{感度} = (2 \times \text{SD}_{0\text{ng/mL}} \times 0.231\text{ng/mL}) / (\text{O.D.}_{0\text{ng/mL}} - \text{O.D.}_{0.231\text{ng/mL}})$$

Human obestatin EIA 標準曲線の1例



<再現性>

同時再現性 CV (%) 3.5~9.9

日差再現性 CV (%) 5.6~9.0

<添加回収試験>

ヒト血清 (n=7) 101.5~113.2%

ヒト血漿 (n=7) 106.1~118.9%

<希釈試験>

ヒト血清において 8 倍希釈まで、ヒト血漿において 4 倍希釈まで良好な希釈性を示しました。

VII. 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 24 ヶ月（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）

VIII. 文献

1. Zhang JV, Ren PG, et al: **Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake.** Science 310:996-999, 2005
2. Dun SL, Brailoiu GC, et al: **Distribution and biological activity of obestatin in the rat.** J Endocrinol 191:1-10, 2006
3. Samson WK, White MM, et al: **Obestatin acts in brain to inhibit thirst.** Am J Physiol: Regulatory, Integrat. and Compar. Physiol 292:R637-643, 2007; Epub 2006 Aug 24
4. Green BD, Irwin N, and Flatt PR: **Direct and indirect effects of obestatin peptides on food intake and the regulation of glucose homeostasis and insulin secretion in mice.** Peptides 28:981-987, 2007
5. Alloatti G, Arnoletti E et al: **Obestatin affords cardioprotection to the ischemic- reperused isolated rat heart and inhibits apoptosis in cultures of similarly stressed cardiomyocytes.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 299:H470- 81, 2010
6. Brunetti L, Di Nisio C et al: **Obestatin inhibits dopamine release in rat hypothalamus.** Eur J Pharmacol 641:142-7, 2010

<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

2008年8月25日作成 2011年8月9日改訂

