

研究用試薬

YK051 Rat Leptin-HS ELISA

取 扱 説 明 書

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市粟倉 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	8～9
VII. 貯蔵法および有効期間	10
VIII. 文献	10

YK051 Rat Leptin-HS 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よく相関することが明らかにされました。この結果から、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を示されました。最近、脂肪細胞はエネルギー貯蔵のみならず、レプチン、アディポネクチン及び TNF- α などのアディポサイトカインをも分泌する細胞として注目され、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。ラットレプチンの一次構造はマウスレプチンのそれと高い相同性(96%)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ラットレプチン測定系の確立が求められていました。

矢内原研究所ではラットレプチン測定系の開発を進め、従来法に比して優れた性能を有する ELISA キット YK050 Rat Leptin ELISA を開発し、製造販売してまいりましたが、この度さらに高感度のラット血清・血漿中レプチン測定系としての ELISA 系を確立することができました。この測定系は、測定対象サンプルが微量 (25 μ L) で済み、測定に要する時間はおよそ 6.5 時間となっています。本改良 ELISA キット YK051 Rat Leptin-HS ELISA では従来測定できなかった低濃度のラット血中レプチン量も測定することが可能となり、種々のレプチン研究を進める上で極めて有効に使用できるものとなりました。

YK051 Rat Leptin-HS ELISA キット	内容
▼ 78.1~2500 pg/mL の範囲で測定できます。	1) 抗体固定化プレート
▼ 測定は約 6.5 時間で終了します。	2) ラットレプチン標準品
▼ 41 未知検体を duplicate で測定できます。	3) 特異抗体
▼ 血清・血漿サンプルの測定ができます。	4) 酵素標識 2 次抗体
▼ 検体量は 25 μ L です。	5) 基質溶解液
▼ プレートは一列 (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。	6) OPD 錠
▼ 同時再現性	7) 酵素反応停止液
CV(%) 血清: 1.8~4.5 血漿: 3.2~5.9	8) 緩衝液
▼ 日差再現性	9) 濃縮洗浄液
CV(%) 血清: 4.2~5.2 血漿: 3.1~6.1	10) プレート密閉用シール
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。	

II. 特徴

本キットはラットの血清および血漿に含まれるラットレプチンを直接的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、添付のラットレプチン標準品は組換え体であり、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おります。

<1 日法>

測定はおよそ 6.5 時間で終了します。

<特異性>

本キットはヒトレプチンと 0.41%、マウスレプチンと 3.1%の交差反応性が認められます。ラット IL-1 α 、ラット IL-1 β 、ラット TNF- α 、ヒト TNF- α および他のサイトカインとの交差反応性は認められません。

<測定原理>

本キットによる測定法はサンドイッチ 2 ステップ法に基づいています。96 ウエルプレートには特異性の高い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。この抗体にラットレプチン標準液または検体およびウサギ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、抗体－抗原－抗体複合体を形成させます。さらに HRP 標識ヤギ抗ウサギ Ig 抗体（酵素標識 2 次抗体）を反応させることにより、抗体－抗原－抗体－2 次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。測定濃度範囲は 78.1～2,500 pg/mL です。

Ⅲ. キットの構成

試薬・器具	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		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	20ng	1 本	ラットレプチン
3. 特異抗体	凍結乾燥品	6 mL 用	1 本	ウサギ抗ラットレプチン抗体
4. 酵素標識 2 次抗体	液状	12 mL	1 本	HRP 標識ヤギ抗ウサギ Ig 抗体
5. 基質溶解液	液状	26 mL	1 本	0.015% 過酸化水素を含む 0.1M ケン酸緩衝液
6. OPD 錠	錠剤		2 錠	o-フェニレンジアミン
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	20 mL	1 本	非特異的反応除去剤を含む トリス HCl 緩衝液
9. 濃縮洗浄液	液状	50 mL	1 本	1% Tween 20 を含む 濃縮生理食塩液
10. プレート密閉用シール		4 枚		

IV. 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 (25 μ L～1 mL)；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 490 nm で吸光度 2.5 まで測定できる装置)
3. マイクロプレート用振とう機またはシェーカー
4. 標準液の調製に使用するポリプロピレン製の試験管またはガラス試験管
5. 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
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：標準品の容器に緩衝液 2 mL を加え内容物を溶解させ、10000 pg/mL の標準液を作製する。この標準液 0.1 mL をとり、これを緩衝液 0.3 mL で希釈し 2500 pg/mL の標準液を調製する。この標準液 0.2 mL をとり、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 1250 pg/mL の標準液を調製する。以下同様の 2 倍連続希釈操作を繰り返し、625, 312.5, 156.2, 78.1 pg/mL の各標準液を調製する。0 pg/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
2. 特異抗体溶液の調製法：特異抗体の容器に緩衝液 6 mL を加え内容物を溶解させ使用する。
3. 発色剤溶液の調製法：使用時に基質溶解液 12 mL に OPD 錠 1 錠を加え溶解させ使用する。
4. 洗浄液の調製法：50 mL (全量)を蒸留水 950 mL にて希釈し使用する。
5. 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. キット内容を室温(20～30℃)に戻す。
標準液、特異抗体溶液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. プレートの各ウェルに緩衝液 50 μ L を分注した後、上記標準液の調製法にて調製した標準ラットレプチン希釈系列 (0, 78.1, 156.2, 312.5, 625, 1250, 2500 pg/mL の各標準液) または検体 25 μ L を入れ、更に特異抗体溶液 50 μ L を加える。
3. プレートをシールし、室温(20～30℃)で振とうさせながら 5 時間反応を行なう。
4. 各ウェル中の液を除き、洗浄液 350 μ L を満たした後、アスピレーターによって吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに 2 回繰り返し、合計 3 回の洗浄操作を行なう。
5. 各ウェルに酵素標識 2 次抗体 100 μ L を加える。
6. プレートをシールし、室温で 1 時間振とうする。
7. 6. の反応終了直前に OPD 錠を基質溶解液で溶解し、発色剤溶液を調製する。
8. 各ウェル中の液を除き 4. と同様の洗浄操作を 5 回行なう。
9. 各ウェルに発色剤溶液 100 μ L を加え、室温で 30 分間反応させる。
10. 各ウェルに酵素反応停止液 100 μ L を加える。
11. マイクロプレート用吸光度計にて 490 nm の吸光度を測定する。ラットレプチン標準液の各濃度 (6 ポイント) とそれぞれの 490 nm の吸光度の測定値から標準曲線を作成し、検体の測定値を標準曲線に当てはめ、ラットレプチン濃度を算出する。

V. 操作上の注意

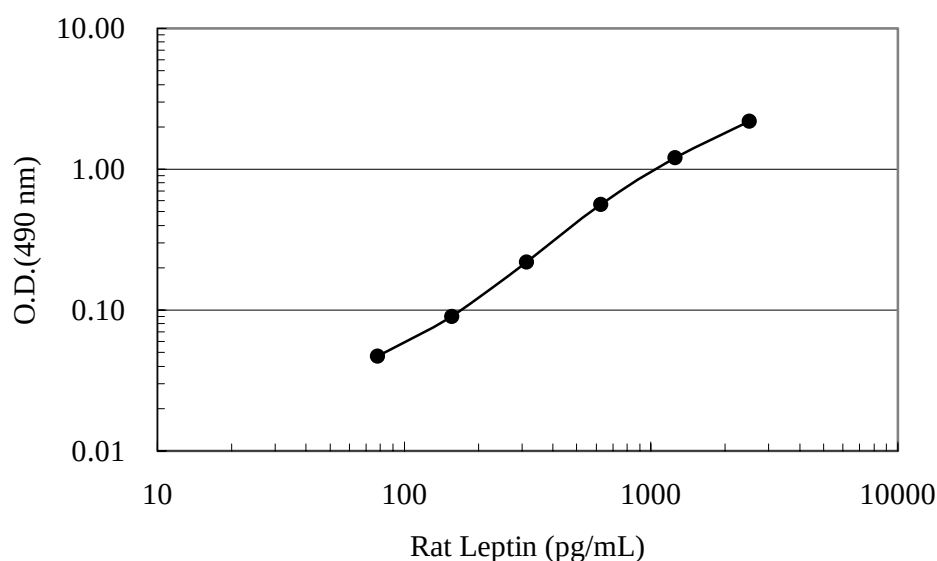
1. 血液検体は採血後ただちに測定してください。採血後ただちに測定出来ない場合は血清もしくは血漿分離後、最初に小分けして-30℃以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。血漿は EDTA-2Na を入れた採血管で採血してください。
2. 試薬は、用時調製（希釈）を原則としてください。
3. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。
4. 各ウエルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行なってください。また検体をウエルに注入する場合は、各検体毎に新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。標準液を希釈するときは、希釈段階ごとにかならず新しいチップを使ってください。
5. 2500 pg/mL 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にて希釈してから測定してください。
6. 室温で反応中は必ずマイクロプレート用振とう器を用い振とうしてください（呈色反応は除く。）。なお振とうはプレート密閉用シールに反応液がはねないようにゆっくりと行なってください。
7. 標準液、検体ともに測定は二重測定で行なってください。
8. キットは分割使用が可能です。溶解された試薬の残り（標準品）は適宜小分けして-30℃以下にて凍結保存してください。また、特異抗体溶液は 4℃保存で4ヶ月は安定です。4ヶ月以上保存する場合は-30℃以下に凍結保存してください。
9. 酵素基質の発色レベルは、反応温度、時間、プレートの振とうの程度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。
10. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行なってください。
11. 試薬の保存もしくは使用中に、強い光が当たらないように注意してください。
12. 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て使用しないでください。

VI. 基本性能

<測定範囲> 測定濃度範囲 78.1 pg/mL～2,500 pg/mL

78.1 pg/mL を下回るような低値の検体が予想される場合、検出限界として 78.1 pg/mL の標準液を 2 倍希釈し 39.0 pg/mL の標準液を設けることができます。この場合 39.0 pg/mL～78.1pg/mL の範囲の測定値は精度的な面から概算値としてご使用ください。

<標準曲線の一例>



<添加回収試験>

(血清の場合)

Sample No.	Leptin added (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)
1	0.0	185.0	-	-
2	62.5	248.0	247.5	100.2
3	250.0	370.0	435.0	85.1
4	1000.0	920.0	1185.0	77.7

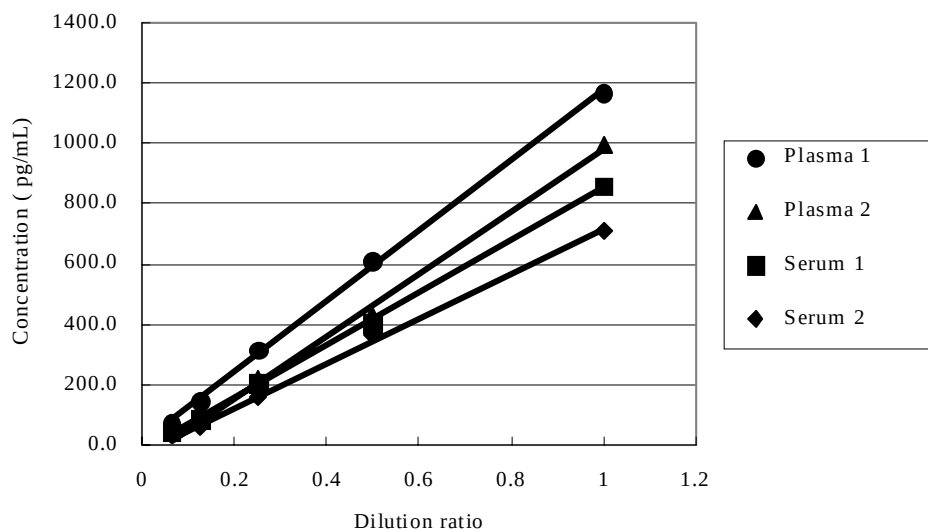
(血漿の場合)

Sample No.	Leptin added (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)
1	0.0	121.0	-	-
2	62.5	174.0	183.5	94.8
3	250.0	292.0	371.0	78.7
4	1000.0	843.0	1121.0	75.2

<再現性>

- 同時再現性 CV(%) 血清：1.8～4.5 血漿：3.2～5.9
- 日差再現性 CV(%) 血清：4.2～5.2 血漿：3.1～6.1

<希釈試験>

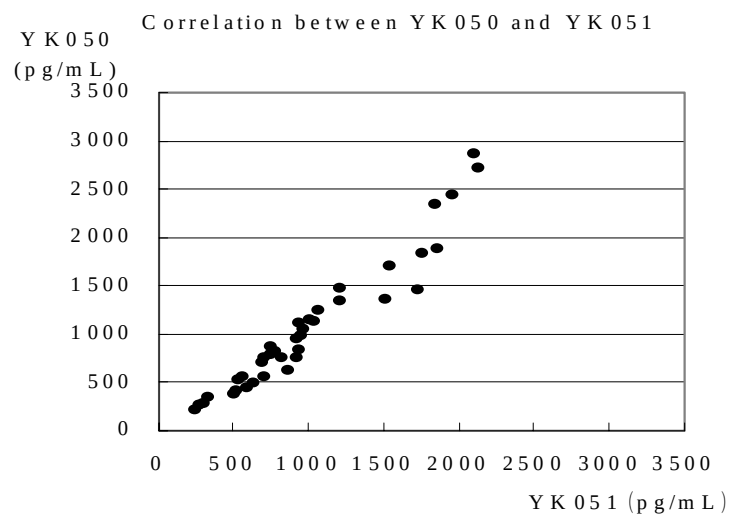


<相関性>

YK050 Rat Leptin ELISA キットとの相関性は以下の通りである。

$Y = YK050$ Rat Leptin ELISA、 $X = YK051$ Rat Leptin-HS ELISA

$Y = 1.26X - 179$ $r = 0.968$ $n = 38$



VII. 貯蔵法および有効期間

<貯法>

遮光し、2～8℃にて保存してください。

<有効期間>

製造日より 20 ヶ月間（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, Y. et al: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature, 372, 425, 1994
2. Pelleymounter, M. A. et al: Effects of the obese gene and product on body weight regulation in ob/ob mice, Science, 299, 540, 1995
3. Funahashi, T. et al: Enhanced expression of rat obese(ob) gene in adipose tissues of ventromedial hypothalamus(VMH)-lesioned rats, Biochem. Biophys. Res. Commun. 211, 469, 1995
4. McGregor, G. et al: Radioimmunological measurement of leptin in plasma of obese and diabetic human subject, Endocrinology., 137, 1501, 1996
5. Sainsbury, A. et al: Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y to normal rats increase obese gene expression in white adipose tissues, Diabetologia, 39, 353, 1996
6. Hosoda, H. et al: Development of radioimmunoassay for human leptin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 221, 234, 1996

<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

Website: www.yanaihara.co.jp E-mail: ask@yanaihara.co.jp

2009 年 5 月 28 日改訂