

研究用試薬

YK052 Mouse 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 | 8~9 |
| VII. 貯蔵法および有効期間 | 10 |
| VIII. 文献 | 10 |

YK052 Mouse 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 146 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、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てマウス、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。マウスレプチンの一次構造はラットレプチンのそれと高い相同性 (96%) を示しますが、ヒトレプチンとは中央部および C 末端部でかなりのアミノ酸残基の置換が認められています。こうした背景からマウスを用いる研究に必須であるマウスレプチン測定系の確立が求められていました。

矢内原研究所ではレプチン測定系の開発を進め、すでに YK050 Rat Leptin ELISA キットおよび YK051 Rat Leptin-HS(高感度)ELISA キットを開発し、製造販売してまいりましたが、この度これらラットレプチン測定系に加え、マウス血中レプチンの測定系としての 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およそ 6.5 時間となっています。ラットレプチン測定キットに加え、マウス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。

| YK052 Mouse Leptin ELISA キット | 内容 |
|---|---------------|
| ▼ 0.313~20 ng/mL の範囲で測定できます。 | 1) 測定プレート |
| ▼ 測定は約 6.5 時間で終了します。 | 2) 標準品 |
| ▼ 40 検体を duplicate で測定できます。 | 3) 標識特異抗体液 |
| ▼ 血清サンプルの測定ができます。 | 4) SA-HRP 溶液 |
| ▼ 検体量は 25 μ L です。 | 5) 酵素基質液 |
| ▼ プレートは 1 列 (8 ウェル) 毎に取り外しできますのでキットの分割使用が可能です。 | 6) 酵素反応停止液 |
| ▼ 同時再現性 CV(%) 血清 : 5.01~9.84 | 7) 緩衝液 |
| ▼ 日差再現性 CV(%) 血清 : 4.37~7.71 | 8) 濃縮洗浄液 |
| 保存と安定性 2~8 $^{\circ}$ C で保存してください。製造日より 24 ヶ月は安定です。 | 9) プレート密閉用シール |

II. 特徴

本キットはマウスの血清に含まれる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、添付のマウスレプチン標準品は組換体であり、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おります。

<特異性>

本キットはマウスレプチンと 100%、ラットレプチンと 33.8%の交差反応性が認められますが、ヒトレプチンとは交差反応性は認められません。

<測定原理>

本キットによるマウスレプチンの測定はサンドイッチ法に基づいて行います。96 ウエルプレートの各ウエルには、ウサギ抗マウスレプチン抗体が固定化されています。このプレートに標準液または検体を入れ、抗原抗体複合体を形成させ、さらにビオチン化ウサギ抗マウスレプチン抗体と反応させ、サンドイッチ複合体を形成させます。その複合体に HRP 結合ストレプトアビジンを反応させます。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レプチン濃度を求めることができます。

Ⅲ. キットの構成

| 試薬・器具 | 形状 | 規格 | 内容物 | |
|--|-------|--------------------|--------------------------|---|
| 1. Antibody coated plate (測定プレート) | | 96 ウエル 1 枚 プレート | ウサギ抗マウスレプチン抗体固定 化プレート | |
| 2. Standard (標準品) | 凍結乾燥品 | 20 ng | 1 本 | マウスレプチン |
| 3. Labeled antibody solution (標識特異抗体液) | 液状 | 12 mL | 1 本 | ビオチン化ウサギ抗マウスレプチ ン抗体 |
| 4. SA-HRP solution (SA-HRP 溶液) | 液状 | 12 mL | 1 本 | 安定剤を含むトリス塩酸緩衝液に溶解 した HRP 結合ストレプトアビジン |
| 5. Enzyme substrate solution (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) |
| 6. Stopping solution (酵素反応停止液) | 液状 | 12 mL | 1 本 | 1M 硫酸溶液 |
| 7. Buffer solution (緩衝液) | 液状 | 15 mL | 1 本 | 非特異的の反応除去剤を含むリン酸 緩衝液 |
| 8. Washing solution (concentrated) (濃縮洗浄液) | 液状 | 50 mL | 1 本 | 1% Tween 20 を含む濃縮生理食塩液 |
| 9. Adhesive foil (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 450 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 1 mL を加え内容物を溶解させ、20 ng/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 10 ng/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、5、2.5、1.25、0.625、0.313 ng/mL の各標準液を調製する。0 ng/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。

※<測定範囲>有効測定範囲 0.313 ng/mL~20 ng/mL

0.313 ng/mL を下回るような低値の検体が予想される場合、検出限度としてさらに 0.313 ng/mL の標準液を 2 倍希釈し、0.156 ng/mL の標準液を設けることができます。この場合、0.156 ng/mL~0.313 ng/mL の範囲の測定値の精度は上記有効測定範囲ほど高くはありませんので、概算値として使用してください。

2. 洗浄液の調製法：濃縮洗浄液 50 mL (全量) を蒸留水 950 mL にて希釈し使用する。
3. 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>

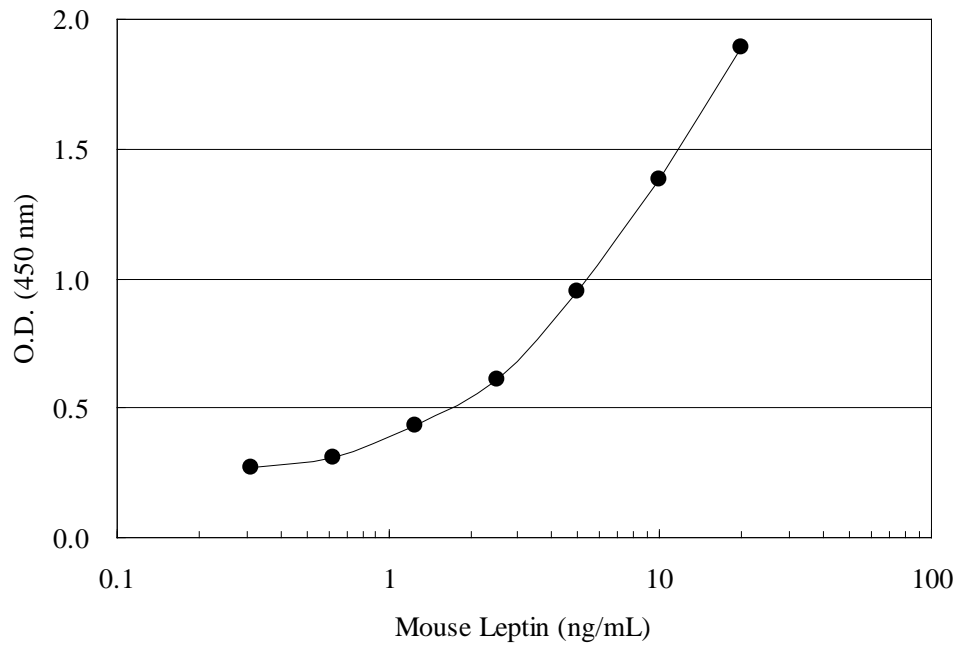
1. キット内容を室温（20～30℃）に戻す。
標準液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. 各ウェルに、洗浄液 350 μ L を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てた後、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに 2 回繰り返す、合計 3 回の洗浄操作を行う。
3. 各ウェルに緩衝液 45 μ L を入れ、ついで標準液または検体 25 μ L を加える。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 3 時間振とうする（約 100 rpm）。
5. 各ウェル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 4 回行う。
6. 各ウェルに標識特異抗体液 100 μ L を加える。
7. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 2 時間振とうする（約 100 rpm）。
8. 各ウェル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 4 回行う。
9. 各ウェルに SA-HRP 溶液 100 μ L を加える。
10. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 1 時間振とうする（約 100 rpm）。
11. 必要量の酵素基質液を使用する約 1 時間前に分取し、遮光しながら室温に戻す。
12. 各ウェル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 4 回行う。
13. 各ウェルに酵素基質液 100 μ L を加え、遮光の状態で室温で静置し 30 分間反応させる。
14. 各ウェルに酵素反応停止液 100 μ L を加える。
15. 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。
16. 市販のソフトウェアを用いて、4 (or 5) -Parameter、もしくは Log-Logit の回帰式を使用し、マウスレプチン 標準液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、検体のマウスレプチン濃度を求める。片対数方眼紙を用いる場合は、横軸 (Log 側) に標準液の濃度を、縦軸 (Linear 側) 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、マウスレプチンの濃度を読み取る。

V. 操作上の注意

1. 血液検体は採取後、血清を分離し、直ちに測定してください。直ちに測定できない場合は血清を適宜小分けして、 -30°C 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。
2. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品は調製後、直ちに使用してください。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（約1ヶ月は安定です）。
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. 各ウェ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ってください。また検体をウェルに注入する場合は、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、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。
5. 20 ng/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測定してください。
6. 室温での反応には必ずマイクロプレート用振とう機を用い、測定プレートを振とうしてください（呈色反応の場合を除く）。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ってください（約 100 rpm ）。
7. 測定はすべて2重測定で行ってください。
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. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定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. 各試薬の保存中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。
12. 酵素基質液は遮光しながら室温に戻し、使用してください。
13. 一部の試薬には、ヒトの血清を使用していますので取り扱いに注意してください（HBsAG, HIV 1/2, HCV, HIV-1 AG または HIV-1 NAT, ALT および Syphilis は陰性です）。

VI. 基本性能

<標準曲線の一例>



<添加回収試験>

<マウス血清 1>

| Added leptin (ng/ml) | Observed (ng/ml) | Expected (ng/ml) | Recovery (%) |
|----------------------|------------------|------------------|--------------|
| 0.0 | 1.69 | | |
| 0.3 | 2.17 | 1.99 | 109.05 |
| 3.0 | 4.49 | 4.69 | 95.74 |
| 7.0 | 8.48 | 8.69 | 97.58 |

<マウス血清 2>

| Added leptin (ng/ml) | Observed (ng/ml) | Expected (ng/ml) | Recovery (%) |
|----------------------|------------------|------------------|--------------|
| 0.0 | 2.11 | | |
| 0.3 | 2.52 | 2.41 | 104.56 |
| 3.0 | 5.33 | 5.11 | 104.31 |
| 7.0 | 8.41 | 9.11 | 92.32 |

<マウス血清 3>

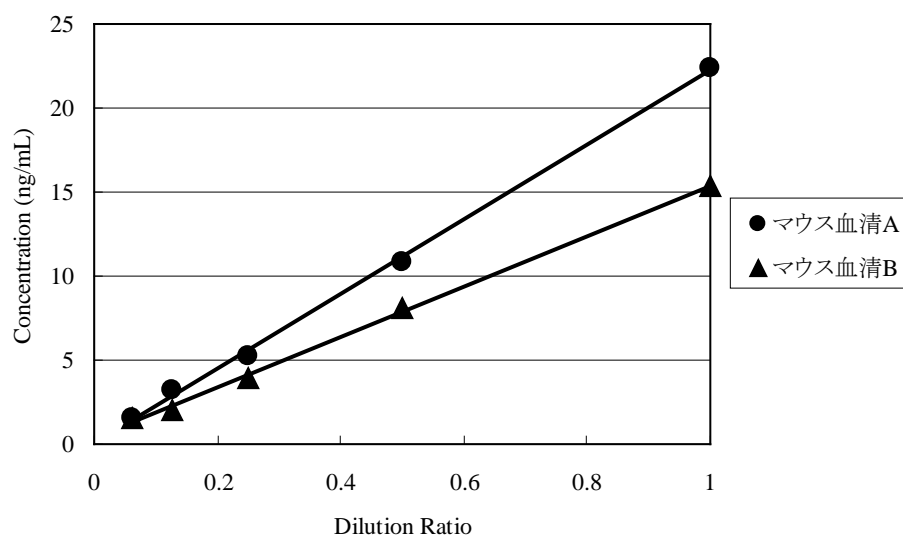
| Added leptin (ng/ml) | Observed (ng/ml) | Expected (ng/ml) | Recovery (%) |
|-------------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| 0.0 | 1.20 | | |
| 0.3 | 1.58 | 1.50 | 105.33 |
| 3.0 | 3.90 | 4.20 | 92.86 |
| 7.0 | 8.91 | 8.20 | 108.66 |

<マウス血清 4>

| Added leptin (ng/ml) | Observed (ng/ml) | Expected (ng/ml) | Recovery (%) |
|-------------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| 0.0 | 0.86 | | |
| 0.3 | 1.02 | 1.16 | 87.93 |
| 3.0 | 3.56 | 3.86 | 92.23 |
| 7.0 | 6.84 | 7.86 | 87.02 |

<希釈試験>

<マウス血清>



<交差反応性>

| 関連たんぱく質 | 交差反応性 (%) |
|--------------|-----------|
| Mouse leptin | 100.0 |
| Rat leptin | 33.8 |
| Human leptin | 0.0 |

<再現性試験>

同時再現性 CV (%) マウス血清：5.01～9.84

日差再現性 CV(%) マウス血清：4.37～7.71

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 24 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, MA 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
7. Hashimoto, H et al: Parathyroid hormone-related protein induces cachectic syndromes without directly modulating the expression of hypothalamic feeding-regulating peptides. Clin Cancer Res 13, 292, 2007

<お問い合わせ先>

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市粟倉 2480-1

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

www.yanaihara.co.jp ask@yanaihara.co.jp

2019年11月18日改訂