

ヒトアディポネクチン ELISA キット

使用説明書

本キットは研究用試薬であり、疾病の診断若しくはその補助の目的で使用することはできない。

【開発の経緯及び特徴】

アディポネクチンは、1996年に大阪大学分子制御内科学、松澤らのグループにより脂肪組織中に特異的に発現する遺伝子 apM1 (adipose most abundant gene transcript) として新たに同定されたサイトカイン (アディポサイトカイン) であり、244個のアミノ酸より成る分泌蛋白である。血中では多量体を形成し、Ⅷ・X型コラーゲンや補体の C1q と相同性の高い球状構造を有することが報告されている^{1,2)}。近年、アディポネクチンは様々な生理活性を有することが報告され、特に平滑筋細胞の増殖を抑制することや単球の内皮細胞への接着を抑制することから、動脈硬化の抑制効果が期待されている^{3,4,5)}。さらに、マウスにおけるアディポネクチン投与実験では、アディポネクチンを投与することによって、糖尿病が改善することが見いだされた⁶⁾。ヒトでのアディポネクチンの血中濃度は血清1mLあたり数 μ g存在することが知られており、その低下と肥満⁷⁾や糖尿病^{8,9)}及び動脈硬化^{4,8)}との関連が報告されている。

本キットは、松澤らとの共同研究により開発されたヒトアディポネクチンに特異的な酵素免疫測定法 (ELISA 法) によるものであり、標準品にはリコンビナントヒトアディポネクチンを用いている。本キットは、ヒト血清又は血漿や脂肪細胞抽出液又は培養上清中のアディポネクチンを特異的に精度よく簡便に測定することが可能である。

【キットの構成】

	構成試薬名	容量	成分等
1	洗浄用原液	40mL / ボトル	緩衝剤ほか
2	検体前処理液	10mL / ボトル	緩衝剤ほか
3	検体希釈用原液	50mL / ボトル	緩衝剤ほか
4	抗体プレート	96ウェル / 1枚	抗ヒトアディポネクチンモノクローナル抗体ほか
5	標準品 12.0ng/mL	2mL / チューブ	リコンビナントヒトアディポネクチンほか
6	第1抗体液	12mL / ボトル	抗ヒトアディポネクチン抗血清 (ウサギ) ほか
7	酵素標識抗体原液	0.1mL / チューブ	西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (ヤギ) ほか
8	酵素標識抗体希釈液	15mL / ボトル	緩衝剤ほか
9	基質液A	7.5mL / ボトル	3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンほか
10	基質液B	7.5mL / ボトル	過酸化水素ほか
11	反応停止液	15mL / ボトル	硫酸銅ほか

※【キットの包装】

包装単位	数量	付属品
96テスト用	構成試薬(1~11) 1組	プレートシール 6枚
480テスト用	構成試薬(1~11) 5組	プレートシール 24枚

【使用目的】

ヒト血清又は血漿や脂肪細胞抽出液又は培養上清中のアディポネクチンの測定

【測定原理】

本キットは、ELISA 法を用いたヒトアディポネクチン測定キットである。

測定原理を図1に示した。抗ヒトアディポネクチンモノクローナル抗体固相プレート (抗体プレート) に、あらかじめ前処理を行った検体又は標準液を加えて反応させると、アディポネクチンが抗体プレートに結合する (第1反応)。抗ヒトアディポネクチン抗血清 (ウサギ) (第1抗体液) を反応させ (第2反応)、さらに西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (ヤギ) (酵素標識抗体液) を反応させる (第3反応)。基質液を加えて発色させ (発色反応)、その吸光度を 450nm で測定し、同時に測定した標準液の吸光度から検体中のアディポネクチン濃度を算出する。

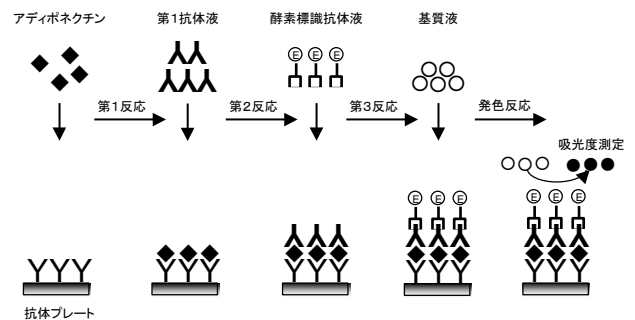


図1. 測定原理

【測定方法】

1. 必要器具、機器等

- (1) メスシリンダー
- (2) メスピペット
- (3) マイクロピペット及びチップ
- (4) プレートウォッシャー
- (5) ペーパータオル
- (6) プレートリーダー (測定波長: 450nm)
- (7) ヒートブロック等
- (8) マイクロチューブ等 (容量 1.5mL 以上の密閉可能な容器)

2. 試薬の調製法・保存法

(1) 洗浄液

洗浄用原液全量(40mL)に精製水を 960mL の割合で混和し調製する。洗浄用原液に結晶が析出している場合は、加温して溶解後に調製し、調製後は 2~8℃で保存する。

(2) 検体希釈液

検体希釈用原液全量(50mL)に精製水を 200mL の割合で混和し調製する。調製後は 2~8℃で保存する。

(3) 標準液

標準品 12.0ng/mL を検体希釈液で 2 倍段階希釈して、6.0ng/mL、3.0ng/mL、1.5ng/mL、0.75ng/mL、0.375ng/mL の濃度の標準液を調製する。なお、標準液 12.0ng/mL は標準品 12.0ng/mL を、0ng/mL は検体希釈液を使用する。

(4) 酵素標識抗体液

酵素標識抗体希釈液 12mL に酵素標識抗体原液を 60 μ L の割合で混和し、必要量調製する。第 2 反応の直前に調製し、速やかに使用する。

(5) 基質液

基質液 B 6mL に基質液 A を 6mL の割合で混和し、必要量調製する。発色反応の直前に調製し、速やかに使用する。基質液 A は必要量採取後直ちにキャップをして 2~8℃で保存する。

(6) 検体前処理液

検体前処理液に結晶が析出している場合は、泡立てないように加温して溶解後に使用する。

3. 操作方法

操作方法の概略を図 2 に示した。

(1) 検体の前処理

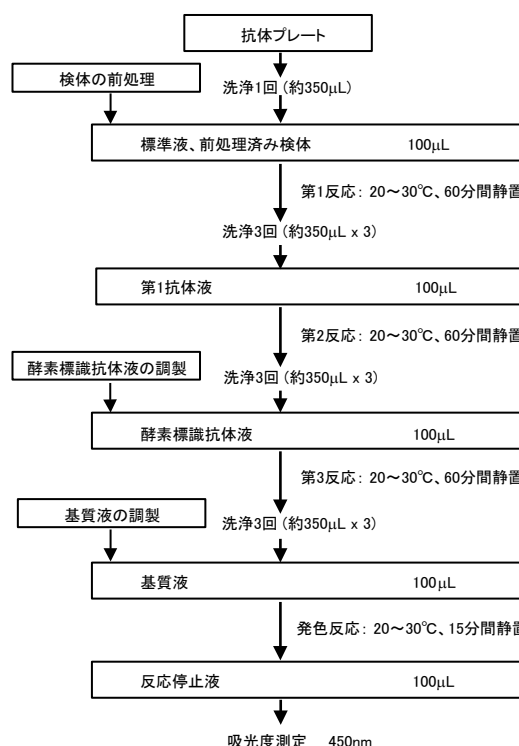
血清又は血漿(抗凝固剤: EDTA、ヘパリン)の前処理

- ① 必要な構成試薬を 20~30℃に戻す。
- ② 血清又は血漿 (抗凝固剤: EDTA、ヘパリン) 10 μ L を検体前処理液 90 μ L と混和後、ヒートブロック等を用いて 100℃で 5 分間加熱する。このとき、容量 1.5mL 以上のマイクロチューブ等の容器を用い、密閉状態で加熱すること (10 倍希釈検体となる)。
- ③ 検体希釈液を 900 μ L 加え混和する (100 倍希釈検体となる)。

- ④ ③の 100 倍希釈血清のうち 20 μ L を新たな容器に移し、検体希釈液 1.0mL と混和する (5, 100 倍希釈検体となる)。

脂肪細胞抽出液又は培養上清の前処理

- ① 必要な構成試薬を 20~30℃に戻す。
- ② 検体前処理液を精製水で 5 倍希釈する (5 倍希釈検体前処理液)。
- ③ 脂肪細胞抽出液又は培養上清 10 μ L を②の 5 倍希釈検体前処理液 90 μ L と混和後、ヒートブロック等を用いて 100℃で 5 分間加熱する。このとき、容量 1.5mL 以上のマイクロチューブ等の容器を用い、密閉状態で加熱すること (10 倍希釈検体となる)。
- ④ 検体希釈液を 900 μ L 加え混和する (100 倍希釈検体となる)。



(2) 測定方法

- ① 各構成試薬を 20~30℃に戻す。
- ② 洗浄液、検体希釈液、各濃度の標準液を調製する。
- ③ 抗体プレートのアルミラミネート袋を開封し、検査に必要なストリップだけを取り出す。データシート、プレートマップ等で標準液や検体の位置を確認する。
- ④ 洗浄液を抗体プレートの各ウェルに約 350 μ L ずつ加えた後、プレートウォッシャーでウェルの液を完全に吸引除去する。続けて抗体プレートを逆さにしてペーパータオル等に軽く叩きつけ、ウェル内に残った洗浄液を除去する。
- ⑤ 各濃度の標準液及び前処理済みの検体を各ウェルに 100 μ L ずつ加える。標準液は各測定ごと、各抗体プレートごとに必ず測定する。

- ⑥ プレートシールで抗体プレートをカバーし、20～30℃で60分間静置反応させる。
- ⑦ 液ハネ等しないように注意して抗体プレートからプレートシールを取り除き、プレートウォッシャーでウェルの液を完全に吸引除去する。続いて、洗浄液を各ウェルに約 350 μL ずつ加え、再度速やかに吸引除去する。このとき、洗浄液があふれないように注意する。この洗浄と吸引の操作をさらに2回繰り返した後、④と同様にウェル内に残った洗浄液を除去する
- ⑧ 第1抗体液を抗体プレートの各ウェルに 100 μL ずつ加える。
- ⑨ プレートシールで抗体プレートをカバーし、20～30℃で60分間静置反応させる。
- ⑩ ⑦と同様にウェルを洗浄する
- ⑪ 酵素標識抗体液を抗体プレートの各ウェルに 100 μL ずつ加える。
- ⑫ プレートシールで抗体プレートをカバーし、20～30℃で60分間静置反応させる。
- ⑬ ⑦と同様にウェルを洗浄する。
- ⑭ 基質液を抗体プレートの各ウェルに 100 μL ずつ加える。
- ⑮ 20～30℃で15分間静置反応させた後、反応停止液を抗体プレートの各ウェルに 100 μL ずつ加える。
- ⑯ プレートリーダーにより各ウェルの 450nm (2波長測定の場合には対照波長 650nm) における吸光度を測定する。

4. アディポネクチン濃度の算出

- (1) 各濃度の標準液及び検体の吸光度から標準液 0ng/mL の吸光度 (ブランク値) の平均値を差し引いて、各実質吸光度を算出する。
- (2) X 軸に標準液の濃度を、Y 軸にその実質吸光度をプロットする。各プロットに適当な回帰曲線を当てはめ (例: 両対数変換の二次回帰等、図3参照)、検量線を作成する。
- (3) 検体の実質吸光度を検量線に当てはめ、アディポネクチン濃度を読みとる。
- (4) その値に検体の希釈倍率 (血清又は血漿は 5, 100 倍、細胞抽出液又は培養上清は 100 倍) を乗じ、検体中のアディポネクチン濃度を算出する。

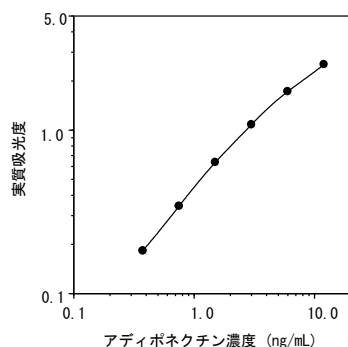


図3. 両対数変換の二次回帰による検量線作成例

【操作上の留意事項】

1. 検体は採取後測定に供するまで必ず凍結保存 (-70℃以下が望ましい) すること。
2. 検体として用いることができる血漿は、EDTA 血漿、ヘパリン血漿である。クエン酸血漿は、測定値が低くなる傾向があるため、使用できない。
3. 前処理済みの検体を保存する場合は、必ず凍結保存 (-70℃以下が望ましい) すること。
4. リコンビナントマウスアディポネクチンとの交差反応は 320ng/mL においても認められなかった。また、本キットを用いて、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウシ胎児の各血清を測定したとき、測定範囲下限 (0.375ng/mL) 未満であった。
5. 各構成試薬は 20～30℃に戻し、よく混和してから使用すること。洗浄用原液、検体前処理液に結晶が析出している場合は、加温して溶解すること。
6. 各試薬の調製は前述に従って、適切なタイミングで行うこと。特に基質液は、調製後時間経過とともにブランク値が上昇することや、浮遊物 (結晶) が生じることがあるため注意が必要である。
7. キットは、4回までの分割使用が可能である。分割使用后、残った構成試薬等は密閉して 2～8℃で保存すること。また、再使用する場合には、20～30℃に戻し、よく混和してから使用すること。未使用の抗体プレートは、乾燥剤とともにアルミラミネート袋に戻し、密閉して 2～8℃で保存すること。
8. 同一製造番号のキットを同時に2キット (2抗体プレート) 以上操作する場合も、各抗体プレートごとに検量線を作成すること。
9. 製造番号の異なるキットを組み合わせ使用しないこと。
10. 標準液、検体とも二重以上の測定をすること。
11. 検量線の範囲を超える高濃度検体は、検体希釈液で希釈して測定すること。
12. 洗浄後のウェルを乾燥させないように注意すること。また、洗浄中はウェルを傷つけないように注意すること。
13. 検体や試薬間のコンタミネーションを避けるため、検体や試薬類の分注に際しては十分注意すること。
14. 使用期限切れのキットは使用しないこと。

【性能(感度・再現性)】

1. 感度試験
標準液 12.0ng/mL の吸光度は 1.0 以上を示した。
2. 再現性試験
自社施設において、2種類の濃度の検体を同時に4回測定したとき、変動係数は10%未満であった。
自社施設において、2種類の濃度の検体を6回繰り返して測定したとき、変動係数は10%未満であった。
3. 測定範囲
0.375ng/mL～12.0ng/mL のアディポネクチンを測定するこ

とができる。また、自社施設において、最小検出限界は 23.4pg/mL であった。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 本キットの構成試薬は、ヒトアディポネクチン測定以外の目的には使用できない。
2. サンプルング等に使用するピペットには口をつけないこと。
3. 標準液及び検体は常に感染の危険性が伴うものとして取扱いには十分注意すること。検体に接触したチップ等の器具やそれらの残液及びその容器等も同様に扱うこと。
4. 反応停止液は硫酸を含むので、皮膚等に付着しないよう取扱いには十分注意すること。
5. 試薬が誤って目や口に入った場合や手等に触れた場合には水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、必要であれば医師の手当等を受けるようにすること。
6. 使用後の容器やピペット等は焼却処理するか、廃棄する場合には廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物等区別して処理すること。
7. 本キットにはアジ化ナトリウム(0.1%以下)を含有する構成試薬(検体希釈用原液、標準品 12.0ng/mL、第1抗体液)が含まれているので、廃棄する際には大量の水とともに廃棄するなど注意すること。
8. 標準液及び検体に接触したチップ等の器具やそれらの残液及びその容器等は、感染の危険性があるものとし、オートクレーブ(121°C、20分)で滅菌処理するか、又は次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度 1,000ppm以上)に1時間以上浸してから処理すること。
9. 本キットは研究用試薬であり、疾病の診断若しくはその補助の目的で使用することはできない。

【貯法・有効期間】

2~8°C、製造日より12ヵ月(使用期限は外箱に表示)

※【包装単位】

96テスト用及び480テスト用

【引用文献】

- 1) Maeda K, et al. : Biochem Biophys Res Commun, 221, 286~289, 1996
- 2) Maeda K, et al. : Gene, 190, 227~235, 1997
- 3) 木原進士: ホルモンと臨床, 49, 311-317, 2001
- 4) Ouchi N, et al. : Circulation, 100, 2473~2476, 1999
- 5) Ouchi N, et al. : Circulation, 102, 1296~1301, 2000
- 6) Yamauchi T, et al. : Nature Med, 7, 941-946, 2001
- 7) Arita Y, et al. : Biochem Biophys Res Commun, 257, 79~83, 1999
- 8) Hotta K, et al. : Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20, 1595~1599, 2000
- 9) Hotta K, et al. : Diabetes, 50, 1126~1133, 2001

※※【問合せ先】

大塚製薬株式会社 診断事業部

TEL : 03-6717-1400

【製造発売元】

大塚製薬株式会社

東京都千代田区神田司町2-9

【包材等の材質】



袋(抗体プレート): PE、PET、金属(アルミ)
ボトル(洗浄用原液、検体前処理液、検体希釈用原液、第1抗体液、酵素標識抗体希釈液、基質液A、基質液B、反応停止液): PE
チューブ(標準品 12.0ng/mL、酵素標識抗体原液): PP
キャップ(洗浄用原液、検体前処理液、検体希釈用原液、標準品 12.0ng/mL、第1抗体液、酵素標識抗体原液、酵素標識抗体希釈液、基質液A、基質液B、反応停止液): PP
抗体プレート本体: PS



ダンボール

個装箱(キットケース)、ケース内仕切り: ダンボール