

ラット・アディポネクチンELISAキット

Cat# CY-8049

使用目的.....	1
保存条件.....	1
はじめに.....	2
測定原理.....	2-3
キット構成.....	4
その他準備するもの.....	5
操作上の留意点.....	6
サンプルの採取と保存.....	7
アッセイプロトコール.....	8-9
濃度算出法.....	9
測定範囲.....	10
トラブルシューティング.....	10
試薬保存性.....	10
試薬性能.....	11-13
参考文献.....	14
関連製品.....	14

使用目的

CircuLex 研究用試薬ラット・アディポネクチン ELISA キットは、ラット血清/血漿、ラット脂肪細胞細胞培養液、その他の生物学的なサンプル中のラット・アディポネクチン濃度の定量的測定に使用します。

注意：このキットは研究用ですので、診断には使用しないで下さい。

保存条件:すべての構成部品は4°Cに保存して下さい。直射日光に当てないで下さい。

はじめに

apM1 の遺伝子産物であるアディポネクチンは Acrp30、AdipoQ、および GBP-28 とも呼ばれています。このタンパク質は 244 アミノ酸からなり、脂肪細胞の中で特異的かつ高濃度に発現しています。また、可溶性コラーゲンスーパーファミリーに属しており、構造的にコラーゲンタイプ VIII とタイプ X と相同性のあるコラーゲン様ドメインと補体 C1q 様の球形のドメインを持っています (1, 2)。アディポネクチンはホモ三量体を形成し、それがさらに高次元の複合体を形成して、血中を循環しています(3, 4)。総血漿蛋白質のおよそ 0.01%にもおよぶほど、血中のアディポネクチン濃度(5-30 µg/mL)は高いことが知られています (5-8)。

最近、アディポネクチン受容体の AdipoR1 と AdipoR2 がクローニングされました。AdipoR1 は骨格筋で豊富に発現し、AdipoR2 は肝臓に特異的に発現しています(9)。矛盾しているようですが、脂肪質の組織に発現しているアディポネクチンレベルは肥満の度合いに逆相関します(10, 11)。インシュリン抵抗性を呈する人、たとえば肥満の人とか II 型糖尿病患者(12, 13)などではアディポネクチンの血清中濃度が減少します。また、同様のことが冠動脈疾患の患者においても報告されています(13)。一方、I 型糖尿病、拒食症、および慢性腎不全においては、血清中のアディポネクチンの濃度が増加することが報告されています。血清中のアディポネクチン濃度は血糖値、インシュリン濃度、トリグリセリド濃度、および BMI 値と負の相関を示し、HDL-コレステロールレベルやインシュリン刺激性グルコース代謝と正の相関を示します。アディポネクチンは、組織の脂肪の酸化を亢進することにより、インシュリン感受性を増加させ、血糖値を減少させます。

アディポネクチンは、動脈内皮細胞では細胞接着分子、マクロファージではサイトカインの発現を抑えることによって、アテローム性動脈硬化症の発症を抑制します。このアディポカインは、虚血性障害後の心筋の再構築において、新たに形成されるコラーゲンの足場として重要な役割を果たすとともに、内皮細胞内において、AMPK と Akt-シグナルとのクロストークを促すことによって、血管新生を促進します(14)。

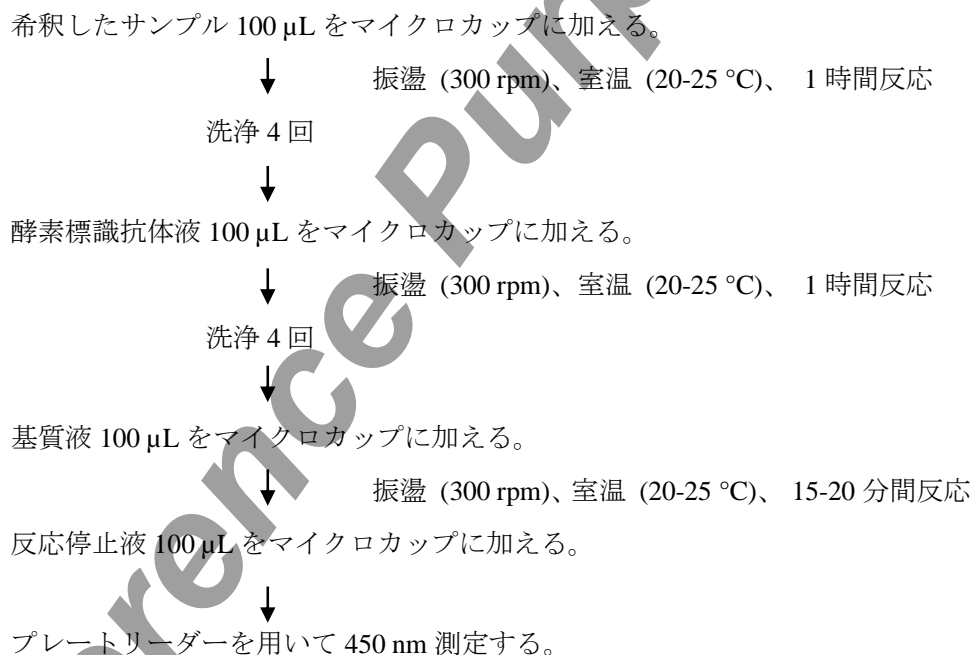
非肥満型の糖尿病ラットへのアディポネクチンの注射はインシュリン非依存的に血糖値を減少させます(15)。これはアディポネクチンがトリグリセリドの代謝を制御することによって、インシュリン感受性を高める効果を引き起こしているためとだと考えられます(15)。

C-末端の球形ドメインだけを含む、欠失型アディポネクチン(gAdiponectin)が血液中に存在することが報告されています。そして、組換え型の gAdiponectin は、ラット筋肉と肝臓の遊離脂肪酸の酸化と体重減少を引き起こすことが示されました(16, 17)。一方、全長の組換え型のアディポネクチンはそれほど強くこれらの効果を発揮することができません(16, 17)。

測定原理

CircuLexラット・アディポネクチン ELISA キットは、ラット血清/血漿、ラット脂肪細胞またはその培地中のラット・アディポネクチン濃度を測定するように設計されています。希釈したサンプルと倍々希釈したスタンダード(組換え型ラット・アディポネクチン)をマイクロプレートのウェルに添加し、抗原 - 抗体反応を開始します(1次反応)。サンプル中のラット・アディポネクチンはウェルに固定された抗アディポネクチン抗体によって捕捉されます。洗浄後に、ペルオキシダーゼ標識抗アディポネクチン抗体を各ウェル添加し、反応を行います(2次反応)。1次反応時にウェルに捕捉されたラット・アディポネクチンにペルオキシダーゼ標識抗アディポネクチン抗体が結合します(抗体 - 抗原 - 標識抗体の複合物を形成します)。洗浄後に、ペルオキシダーゼの発色基質を、すべてのウェルに添加し、反応を行います。停止液の添加により反応停止させ、吸光度 (A_{450}) を測定します。サンプル中のラット・アディポネクチン濃度は、同時に行うラット・アディポネクチンスタンダードの吸光度を用いて計算します。

測定の概要



キット構成

すべてのサンプルとスタンダードは二重測定して下さい。以下に記載する構成は96-ウェルマイクロプレート1枚をアッセイするのに十分量の試薬です。

Microplate: 抗体感作マイクロカップ (8-well strip x 12strips)

10X Wash Buffer: 10倍濃縮洗浄バッファー (100 mL x 1)

Dilution Buffer: サンプル希釈バッファー (50 mL x 1)

Rat Adiponectin Standard: ラット・アディポネクチンスタンダード
(リコンビナント・ラット・アディポネクチン(144 ng 凍結乾燥品) x 1)

HRP conjugated Detection Antibody: ペルオキシダーゼ標識抗ラット・アディポネクチン抗体
(12 mL x 1)

Substrate Reagent: テトラメチルベンチジン(TMB)溶液 (20 mL x 1)

Stop Solution: 反応停止液(1 N H₂SO₄) (20 mL x 1)

その他準備するもの

- オービタルマイクロプレートシェイカー
- マイクロプレートリーダー：450 nm/620 nmの2波長測定が可能な機種 (450/550 nm または 450/595 nmでも可)
- データ解析用ソフトウェア
- マイクロプレートウォッシャーまたは洗浄ビン
- マイクロピペット
- マルチチャンネルマイクロピペット
- 1次反応準備用マイクロプレート
- マイクロカップ専用ホルダー
- ダミーのマイクロカップ (自動洗浄機使用時)
- リザーバー
- ボルテックスミキサー
- ペーパータオル
- 1000 mLシリンダー
- 精製水

操作上の留意点

1. キットの構成成品は、室温（20℃～25℃）に戻してから使用して下さい。
2. 抗体感作マイクロカップは湿気をきらいますので、十分室温（20℃～25℃）に戻してから開封して下さい。また、開封後はアルミ袋のジップロックを確実に閉めて保存してください。
3. 有効期限を過ぎたキットは使用しないで下さい。
4. キット内の microplate のみを使用して下さい。
5. 異なるロットの構成成品を混ぜて使用しないで下さい。
6. 洗剤を完全に除去したガラス器具を使用して下さい。
7. 高純度の精製水を使用して下さい。
8. サンプルは新鮮なものを用いてください。検体を保存する場合は、小分けにして-20℃以下（1ヵ月以内）または-70℃以下（1ヵ月以上）で凍結保存して下さい。また、凍結融解の繰り返しは避けて下さい。
9. 口を用いるピペットを使用しないで下さい。
10. 実験中に喫煙、飲食をしないで下さい。
11. Wash Buffer は、2～8℃に保存したとき、白濁が認められる場合がありますが、試薬性能に影響はありません。Wash Buffer 調製時、十分に溶解してから使用してください。
12. 本試薬の構成成品のうち、Dilution Buffer には 0.1%アジ化ナトリウム (NaN₃) を添加してあります。濃度は 0.09 % ですので毒物には該当しませんが、誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば、医師の手当てを受けて下さい。また、アジ化ナトリウムは、配管中で爆発性のアジ化銅やアジ化鉛を形成することが報告されています。これらの物質の形成を防ぐため、アジ化ナトリウムを含んだ廃液は十分量の水で洗い流して下さい。
13. 本試薬の構成成品のうち、Stop Solution には、1N 硫酸(H₂SO₄)を用いています。使用の際には、十分注意して取り扱って下さい。
14. 本試薬の構成成品のうち、Substrate Solution は過酸化水素(H₂O₂)を含みますので、使用の際には、十分注意して取り扱って下さい。
15. 血清や血漿などのラット由来のサンプルは、ウイルスなどの感染の恐れがありますので、取り扱いには十分注意して下さい。またこれらのサンプルを扱う場合は、必ずディスポーザブル手袋と防御メガネを使用して下さい。さらに、これらのサンプルの廃棄には、各施設で定められた手続きにしたがって、感染防止に努めて下さい。
16. 本試薬は研究用試薬です。ヒトの診断の目的に使用しないで下さい。

サンプルの採取と保存

血清：分離剤入り採血管を用いて採血し、30～60分放置後、遠心（1,000 x g, 15分, 4°C）して血清を採取します。ただちにアッセイを行って下さい。ただし、氷上で6時間までの保存は可能です。長期保存する場合は分注して-70°Cに保存して下さい。凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

血漿：抗凝固剤(EDTA-Na₂)入り採血管を用いて採血し、ただちに遠心（1,000 x g, 15分, 4°C）して血漿を採取します。ただちにアッセイを行って下さい。ただし、氷上で6時間までの保存は可能です。長期保存する場合は分注して-70°Cに保存して下さい。凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

※注意：クエン酸Naを抗凝固剤として用いないで下さい。

その他の生物学的サンプル：不溶性画分を遠心（10,000 x g, 15分, 4°C）により取り除いた後、ただちにアッセイを行って下さい。ただし、氷上で6時間までの保存は可能です。長期保存する場合は分注して-70°Cに保存して下さい。凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

アッセイプロトコール

CircuLexラット・アディポネクチン ELISA キットは、リムーバブルストリップを用いていますので、アッセイに必要な量だけ使用することができますが、ラット・アディポネクチンの定量には、アッセイ毎にキット内のラット・アディポネクチンスタンダードを使用して、検量線を作成して下さい。

試薬の調製法

すべての試薬はアッセイの前に室温に戻しておいて下さい。10X Wash BufferとRat Adiponectin Standard 以外の試薬はそのまま使用して下さい。

1) Wash Buffer の調製

10X Wash Buffer 100 mLに精製水 900mLを加えて希釈し、**Wash Buffer**とします。Wash Bufferは4°Cで4週間安定です。

2) Rat Adiponectin Standard の調製（操作直前に実施）

1. **Rat Adiponectin Standard**（凍結乾燥品）を精製水 **1 mL**で溶解します。この時のラット・アディポネクチンの濃度は **144 ng/mL**となります。これをマスタースタンダードとします。

2. スタンダード溶液の調製法

以下の表に示すようにマスタースタンダードを希釈してゆきます。各チューブを良く混和したのち、次のチューブに加えて下さい。**36 ng/mL (Std.1)**が最も高い濃度のスタンダード溶液になります。Dilution Bufferを **0 ng/mL (Blank)**として下さい。

	容量	Dilution Buffer	アディポネクチン濃度
Std.1	150 µL of Master Standard	450 µL	36.00 ng/mL
Std.2	300 µL of Std. 1 (36.00 ng/ml)	300 µL	18.00 ng/mL
Std.3	300 µL of Std. 2 (18.00 ng/ml)	300 µL	9.00 ng/mL
Std.4	300 µL of Std. 3 (9.00 ng/ml)	300 µL	4.50 ng/mL
Std.5	300 µL of Std. 4 (4.50 ng/ml)	300 µL	2.25 ng/mL
Std.6	300 µL of Std. 5 (2.25 ng/ml)	300 µL	1.13 ng/mL
Std.7	300 µL of Std. 6 (1.13 ng/ml)	300 µL	0.57 ng/mL
Blank	-	300 µL	0 ng/mL

※注意：Rat Adiponectin Standardは、操作直前に溶解して使用して下さい。

溶解後のRat Adiponectin Standard (マスタースタンダード)を保存する場合には、適当に小分けして-70°C以下で凍結保存して下さい。また、凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

サンプルの希釈

- 血清と血漿は**Dilution Buffer**を用いて2段階希釈することにより、**1,000倍希釈**して下さい。
例：20倍希釈（サンプル**5 µL** + Dilution Buffer **95 µL**）、1,000倍希釈（20倍希釈済みサンプル**6 µL** + Dilution Buffer **294 µL**）
- その他の濃度が推定できない生物学的サンプルは無希釈と10倍、100倍、1000倍希釈して測定して下さい。

操作法

1. アッセイに使用する**Microplate**（抗体感作マイクロカップ：リムーバブルストリップ）をアルミ袋から取り出し、ウェルホルダーに装着します。（使用しない抗体感作マイクロカップはアルミ袋に戻し、ジップロックした後、4°Cに保存して下さい）
2. 希釈調製した**スタンダード溶液**および**希釈したサンプル**を120-150・ μL ずつ、1次反応準備用マイクロプレートに実際のアッセイと同じ配置に添加します。
3. マルチチャンネルピペットを用い、1次反応準備用マイクロプレートに添加した**スタンダード溶液**および**希釈したサンプル**を100・ μL ずつ抗体感作マイクロカップに移します。

※注意：抗体感作マイクロカップにサンプルを添加した時点から反応が始まりますので、操作は短時間のうちに行ってください。

4. オービタルマイクロプレートシェイカーを用いて約300 rpmの速度で振盪させながら、室温（20～25°C）で1時間反応させます。
5. マイクロプレートウォッシャーまたは洗浄ビンを用いて**Wash Buffer**でマイクロカップを洗浄します。

※洗浄回数：自動洗浄機4回、洗浄ビン4回

※注意：自動洗浄機を用いた場合、使用する自動洗浄機によって最適洗浄回数異なる場合があります。あらかじめ各施設で用いる自動洗浄機の最適洗浄回数を確認することをお勧めします。

※注意：Wash Bufferは必ず室温（20～25°C）のものを使用して下さい。

5. マイクロカップをペーパータオル上に軽くたたくようにして、残った**Wash Buffer**を完全に除去した後、リザーバーに移した**HRP conjugated Detection Antibody**をマルチチャンネルピペットを用いて100・ μL ずつ添加します。
6. オービタルマイクロプレートシェイカーを用いて約300 rpmの速度で振盪させながら、室温（20～25°C）で1時間反応させます。
7. マイクロプレートウォッシャーまたは洗浄ビンを用いて**Wash Buffer**でマイクロカップを洗浄します。
8. マイクロカップをペーパータオル上に軽くたたくようにして、残った**Wash Buffer**を完全に除去した後、**Substrate Reagent**をリザーバーに移し、マルチチャンネルピペットを用いて100・ μL ずつ添加します。

- ※注意：Substrate Reagentは必ず室温（20～25℃）に戻した後、使用して下さい。
- ※注意：HRP conjugated Detection Antibodyを入れたリザーバーとSubstrate Reagentを入れるリザーバーは、必ず別のものを使用して下さい。
- ※注意：Substrate Reagentは金属イオンにより酸化されやすいのでディスポーザブルの新しい器具を使用して下さい。金属イオンや微生物などによるコンタミネーションを防ぐため、試薬ボトルからリザーバーへSubstrate Reagentを移す際にもディスポーザブルのピペットを使用して下さい。また、一度リザーバーに移したSubstrate Reagentは試薬ボトルへ戻さないで下さい。
9. オービタルマイクロプレートシェイカーを用いて約300 rpmの速度で振盪させながら、室温（20～25℃）で15～20分間反応させます。
10. リザーバーに移した**Stop Solution**をマルチチャンネルピペットで100 μ Lずつ添加し、反応を停止します。
11. マイクロプレートリーダー（垂直透過型）にマイクロカップをセットして、波長 450nm の吸光度（副波長 620nm）を測定します。
- ※注意：吸光度測定は反応停止後30分以内に行ってください。
- ※注意：信頼性のあるスタンダードカーブは、0 ng/mL (Blank)のOD450の値が0.2を超えず、最も高い濃度のスタンダードであるStd.1のOD450の値が2.8を超えない時に得られます。
- ※注意：もし、最も高い濃度のスタンダードであるStd.1のOD450が高すぎて測定できない時には、OD405を測定して、スタンダードカーブ（検量線）を描くことができます。

濃度算出法

1. 片対数グラフ用紙の横軸にラット・アディポネクチンの濃度 (ng/mL)、縦軸に吸光度をとりますこの標準曲線を用いてサンプルの吸光度の平均値から濃度を読み取り、サンプルの希釈倍率を乗じた値を測定結果とします。
- ※サンプルの吸光度が、Std.1の吸光度を超えた場合、あるいは分光光度計の信頼範囲を超えた場合には、サンプルをさらに希釈して再測定してください。
2. 多くのマイクロプレートリーダーでは ELISA 用濃度算出プログラムが使用できます。このプログラムを用いて希釈したサンプル中のラット・アディポネクチンの濃度 (ng/mL) を求めることができます。ここで求められた濃度にサンプルの希釈倍率を乗じた値を測定結果とします。

測定範囲

本キット求められた濃度にサンプルの希釈倍率を乗じた値を測定結果とします。サンプルのラット・アディポネクチンの濃度が36 µg/mL以上の場合は更に希釈した後、再測定して下さい。

トラブルシューティング

1. すべてのサンプルとスタンダードは二重測定して下さい。反応時間または反応温度が大きく異なりますと誤った結果が出るおそれがありますので、指定の条件を厳守して下さい。
2. 二重測定においてバラツキが見られる場合は、洗浄操作が十分でない可能性がありますので、「操作法」の指示を忠実に守って下さい。マイクロプレートウォッシャーの保守が悪いことが原因で洗浄操作が不十分になることが良くあります。十分な保守を心がけて下さい。
3. 全体的に発色が低い場合は、最後の洗浄後Substrate Reagentを入れる前にマイクロカップを乾燥させてしまった可能性がありますので、マイクロカップを乾かさないうただちにSubstrate Reagentを添加して下さい。
4. オービタルマイクロプレートシェイカーによる振盪は非常に重要ですが、使用する機種により最適な振盪速度が異なります。反応液が他のウェルに飛びでない程度で、最大の振盪速度に設定して下さい。

試薬保存性

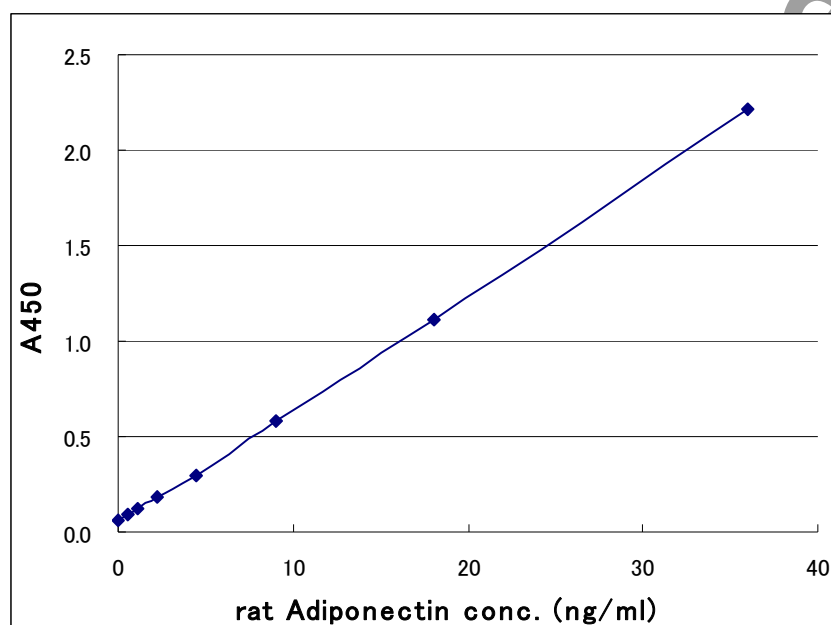
CircuLex 研究用試薬ラット・アディポネクチン ELISA キットに含まれるすべての構成試薬は4°C に保存した場合、有効期限内において高い安定性を持つことが保存テストにより確認されています。しかしながら、有効期限を過ぎたキットは使用しないで下さい。溶解した Rat Adiponectin Standard (マスタースタンダード)は、分注して-70°C に保存して下さい。その他の構成試薬は4°C に保存して下さい。

有効期間：製造後 12 か月

試薬性能

1. 感度

最小検出感度は、0.249 ng/mL です（最小検出感度は Blank の吸光度の平均値+3S.D を示すリコンビナント・ラット・アディポネクチンの濃度と定義した場合）。



2. 再現性

1. 同時再現性試験

血清3例を用いて、同時に12回測定したところ、下表の結果が得られました。血清サンプルのラット・アディポネクチン濃度は「濃度算出法」で示されている方法に従って求めました。

rat Adiponectin conc. (ug/ml)			
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
1	16.72	9.27	2.63
2	18.28	8.57	2.89
3	17.93	8.34	2.98
4	18.29	8.78	2.74
5	17.35	9.21	3.00
6	16.64	8.47	3.02
7	16.75	8.80	2.67
8	16.86	8.27	2.72
9	17.60	8.40	2.88
10	17.68	8.54	2.99
11	17.16	9.03	2.78
12	18.32	8.00	2.70
MAX.	18.32	9.27	3.02
MIN.	16.64	8.00	2.63
MEAN	17.46	8.64	2.83
S.D.	0.644	0.388	0.144
C.V.	3.7%	4.5%	5.1%

2. 日差再現性試験

血清3例を用いて、測定日を変えて5回測定したところ、下表の結果が得られました。血清サンプルのラット・アディポネクチン濃度は「濃度算出法」で示されている方法に従って求めました。

rat Adiponectin conc. (ug/ml)			
Day	Serum 1	Serum 2	Serum 3
1	16.90	11.14	3.31
2	18.92	12.22	3.33
3	17.95	12.42	3.28
4	18.25	12.20	3.46
5	17.48	11.98	3.30
MAX.	18.92	12.42	3.46
MIN.	16.90	11.14	3.28
MEAN	17.90	11.99	3.34
S.D.	0.764	0.502	0.072
C.V.	4.27%	4.19%	2.15%

3. 添加回収試験

血清3例を用いて、添加回収試験を行ったところ、下表の結果が得られました。
(測定結果は、検体希釈倍数を乗じた後の値です。)

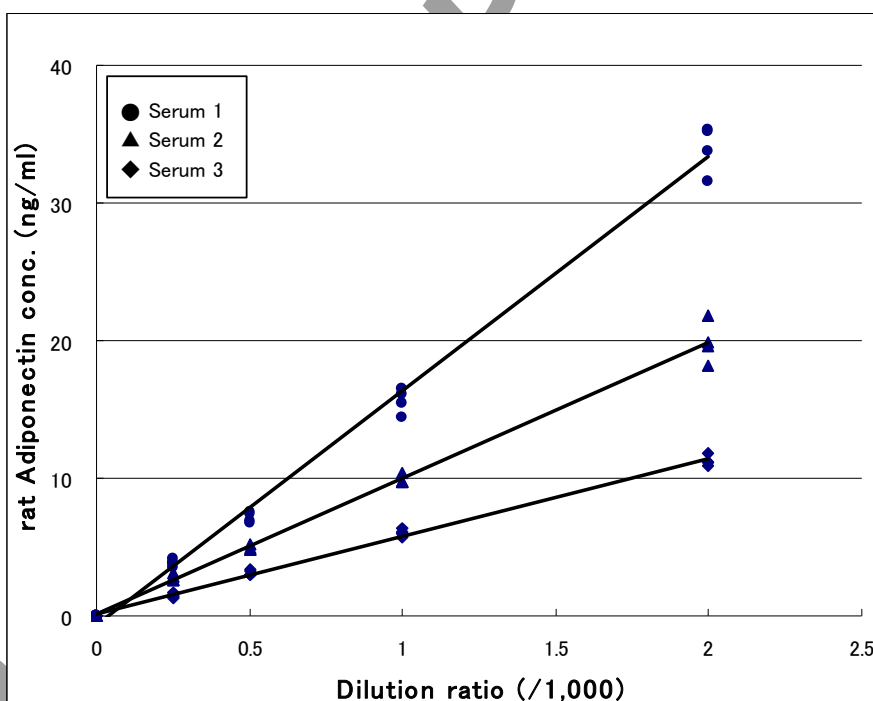
Serum 1				
	None	+ 10 ug/ml	+ 3 ug/ml	+ 1 ug/ml
Average (ug/ml)	13.51	24.97	16.66	14.52
Recovery rate (%)	-	114.57	104.93	100.80

Serum 2				
	None	+ 10 ug/ml	+ 3 ug/ml	+ 1 ug/ml
Average (ug/ml)	7.47	17.42	10.55	8.53
Recovery rate (%)	-	99.54	102.64	106.40

Serum 3				
	None	+ 10 ug/ml	+ 3 ug/ml	+ 1 ug/ml
Average (ug/ml)	3.22	13.17	5.83	4.14
Recovery rate (%)	-	99.50	87.01	92.03

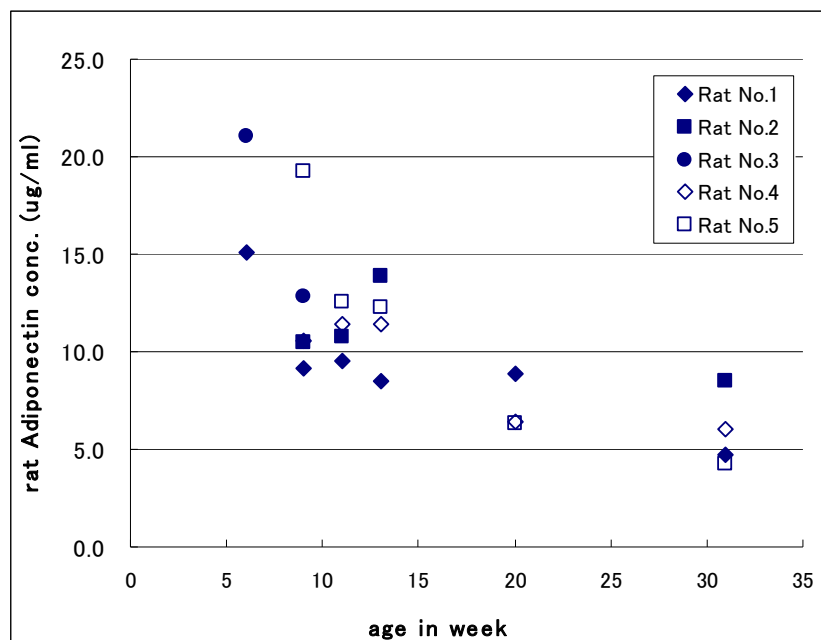
4. 希釈試験

血清を反応用緩衝液で希釈し測定したところ、下表の結果が得られました。
(測定結果は、検体希釈倍数を乗じた後の値です。)



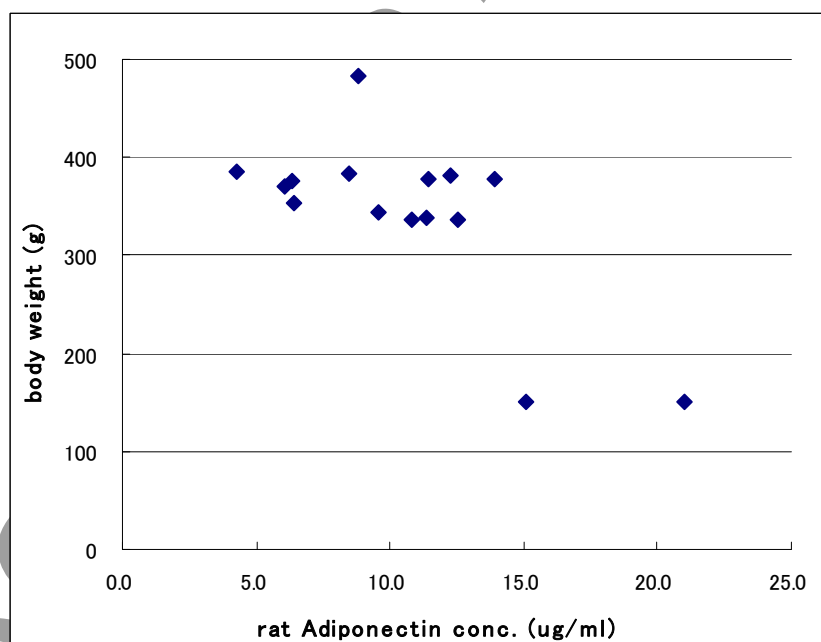
5. ラットアディポネクチン濃度と週齢との相関

ラット 5 個体を用いて、週齢毎のアディポネクチン濃度の測定を行いました。
(測定結果は、検体希釈倍数を乗じた後の値です。)



6. ラットアディポネクチン濃度と体重との相関

血清 15 例を用いて、アディポネクチン濃度の測定を行い採血時の体重との関係を示します。
(測定結果は、検体希釈倍数を乗じた後の値です。)



参考文献

1. Maeda, K. et al.(1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. **221**:286.
2. Kishore, U. and K.B. Reid (2000) Immunopharmacology **49**:159.
3. Shapiro, L. and P.E. Scherer (1998) Curr. Biol. **8**:335.
4. Nakano, Y. et al.(1996) J. Biochem. (Tokyo) **120**:803.
5. Scherer, P.E. et al. (1995) J. Biol. Chem. **270**:26746.
6. Fruebis, J. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**:2005.
7. Berg, A.H. et al. (2002) Trends Endocrinol. Metab. **13**:84.
8. Arita, Y. et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. **257**:79.
9. Yamauchi, T. et al.(2003) Nature **423**:762.
- 10 Stefan, N. et al.(2002) J. Clin. Endocrinol. Metab. **87**:4652.
11. Matsubara, M. et al.(2002) Eur. J. Endocrinol. **147**:173.
12. Weyer, C. et al. (2001) J. Clin. Endocrinol. Metab. **86**:1930.
13. Hotta, K. et al. (2000) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **20**:1595.
14. Tomas, E. et al.(2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**:16309.
15. Berg, A.H. et al.(2001) Nat. Med. **7**:947.
16. Fruebis, J. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**:2005.
17. Yamauchi, T. et al.(2001) Nat. Med. **7**:941.

関連製品

- *CircuLex Human Adiponectin ELISA Kit: Cat# CY-8050
- *CircuLex Mouse Adiponectin ELISA Kit: Cat# CY-8051
- *CircuLex Human Adiponectin Rabbit Polyclonal antibody: Cat# CY-P1017
- *CircuLex Mouse Adiponectin Rabbit Polyclonal antibody: Cat# CY-P1018
- *CircuLex Human Adiponectin Polyclonal antibody (17-36 aa): CY-P1031

製造元

株式会社 サイクレックス
〒396-0002 長野県伊那市手良沢岡 1063-103
Fax: 81-265-76-7618
e-mail: info@cyclex.co.jp
URL: <http://www.cyclex.co.jp>