



V.5/Feb/2023

研究用試薬

モリナガ
マウス/ラットレプチン測定キット
(Cat.# M1305)

共通取扱説明書

【お願い】
製品をご使用になる前に、必ずお読みください。

株式会社森永生科学研究所

横浜市鶴見区下末吉 2-1-1 〒230-8504

URL: <https://www.miobs.com> E-MAIL: info_miobs@morinaga.co.jp

An instruction in English is from page 15.

■ キットの構成

	品 名	容 量	数 量
A	抗体固相化プレート	8 ウェル×6 本	2 パック
B1	凍結乾燥マウスレプチン標準品	2.56 ng	1 本
B2	凍結乾燥ラットレプチン標準品	2.56 ng	1 本
C	検体希釈液	50mL	1 本
D	モルモット抗レプチン抗血清	6 mL	1 本
E	酵素標識抗モルモット IgG 抗体原液	8.4 mL	1 本
F	酵素標識抗体希釈液	3.6 mL	1 本
G	酵素基質溶液(TMB 溶液)	13 mL	1 本
H	反応停止液(1N 硫酸)	13 mL	1 本
I	20 倍濃縮洗浄液(1000mL 用)	50 mL	1 本
	プレート用フレーム		1 個
	プレート用ふた		1 枚

■ その他必要な器具・装置

1. マイクロピペット
5 μ L~1000 μ L の範囲が必要です。
2. メスシリンダー(1000mL)
3. ポリプロピレン製チューブ(1.5mL)
標準曲線用レプチン溶液の調製および検体の希釈に使用します。
4. プレートリーダー
単波長の場合: 450nm
2 波長の場合: 主波長 450nm・副波長 610~650nm が測定できるもの。

■ キットの特長

1. 微量の検体(5 μ L)で測定が可能です。
*注意 検体量が微量ですのでピペティング誤差にご注意ください。
2. マイクロプレートを使用した EIA サンドイッチ法を用いているため特別な施設・設備等を必要とせず、通常の実験室で測定可能です。

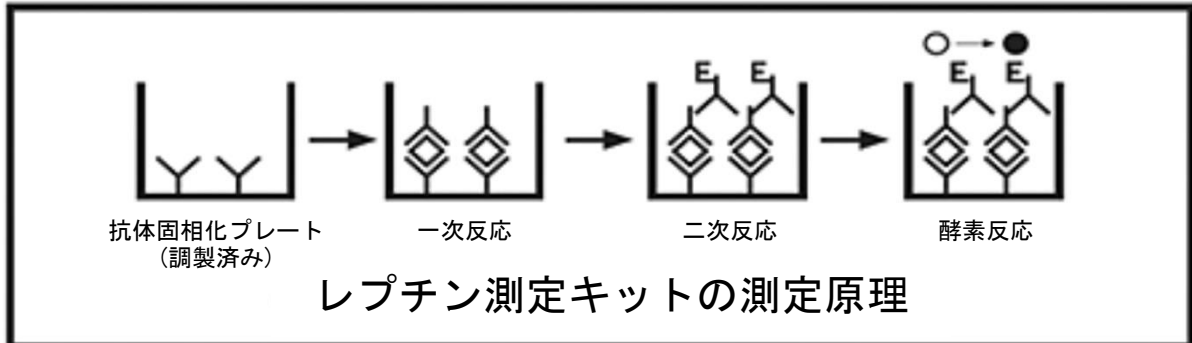
■ 測定原理

一次反応: 検体中のレプチンが、プレート上の固相化抗レプチン抗体とモルモット抗レプチン抗体に結合し、固相化抗レプチン抗体-レプチン-モルモット抗レプチン抗体の複合体を形成する。

二次反応: 酵素標識抗モルモット IgG 抗体がモルモット抗レプチン抗体に結合する。

酵素反応: 酵素基質溶液を加えると、プレート上の複合体に結合した酵素により呈色する。

得られた吸光度に対応するレプチン濃度を標準曲線から算出する。



■ 測定方法

通常測定法(6 ページ～)

短時間測定法(9 ページ～)

の 2 種類があります。

■ 試薬の調製法

試薬は常温に戻してからご使用ください。

A 抗体固相化プレート

常温に戻してから開封してください。開封後は直ちに使用してください。

レプチン標準溶液

検体の動物種に合わせて、マウスレプチン標準品もしくはラットレプチン標準品を選択してください。

B1 凍結乾燥マウスレプチン標準品(もしくは**B2 凍結乾燥ラットレプチン標準品**)に100 μ Lの**C 検体希釈液**を加えて溶解してください。レプチン標準溶液は25.6ng/mLとなります。溶解後は直ちに使用してください。測定を2回に分けて行う場合はレプチン標準溶液を使用後直ちに-20 $^{\circ}$ C以下で凍結保存してください。

標準曲線用レプチン溶液(短時間測定法の場合は 9 ページをご覧ください。)

レプチン標準溶液を **C 検体希釈液**で倍々に希釈し、下記に示しますように 0ng/mL から 12.8ng/mL の標準曲線用レプチン溶液を調製してください。調製後は直ちに使用してください。

	標準曲線用レプチン溶液 (ng/mL)							
	12.8	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0
レプチン標準溶液	50							
検体希釈液	50	50	50	50	50	50	50	50
総液量	100	100	100	100	100	100	100	100

(μL)

C 検体希釈液

そのまま使用してください。標準曲線用レプチン溶液の作製および高濃度のレプチンを含む検体の希釈に用います。

開封後は2～8℃で保存してください。1週間安定です。

D モルモット抗レプチン抗血清

そのまま使用してください。開封後は2～8℃で保存してください。

1週間安定です。

酵素標識抗モルモットIgG 抗体溶液

E 酵素標識抗モルモットIgG 抗体原液にF 酵素標識抗体希釈液を全量加えてください。混合後は2～8℃で保存してください。1週間安定です。

G 酵素基質溶液(TMB 溶液)

そのまま使用してください。開封後は2～8℃で保存してください。

1週間安定です。

H 反応停止液(1N 硫酸)

そのまま使用してください。開封後は2～8℃で保存してください。

1週間安定です。

洗浄液

I 20倍濃縮洗浄液を蒸留水またはイオン交換水で20倍に希釈し、1,000mLになるように調製してください。使用後は密封できる容器に移して2～8℃で保存してください。1週間安定です。

■ 通常測定法操作手順

測定は二重測定以上をおすすめします。

全ての試薬は常温に戻してから使用してください。

標準曲線用レプチン溶液および検体を分注する際、ピペッティング容量にばらつきが生じないように注意してください。

[1 日目]

- 一次反応:
1. A 抗体固相化プレートを付属のプレート用フレームにセットします。
 2. 各ウェルに洗浄液を 300 μ L ずつ分注し、アスピレーター等で洗浄液を除去してウェルの洗浄を行います。
この操作をもう一度繰り返します。
 3. 各ウェルに C 検体希釈液を 45 μ L ずつ分注します。
 4. 各ウェルに D モルモット抗レプチン抗血清を 50 μ L ずつ分注します。
 5. 各ウェルに標準曲線用レプチン溶液(4 ページの「試薬の調製法」に従い調製したもの)または検体を 5 μ L ずつ分注します。検体中のレプチン濃度が高い場合は検体量を減らし、その分検体希釈液を加えてください。(一次反応の全液量は 100 μ L/ウェルとなります。)
 6. 付属のプレート用ふたをして 4 $^{\circ}$ Cで一晩(16~20 時間)静置して反応させます。

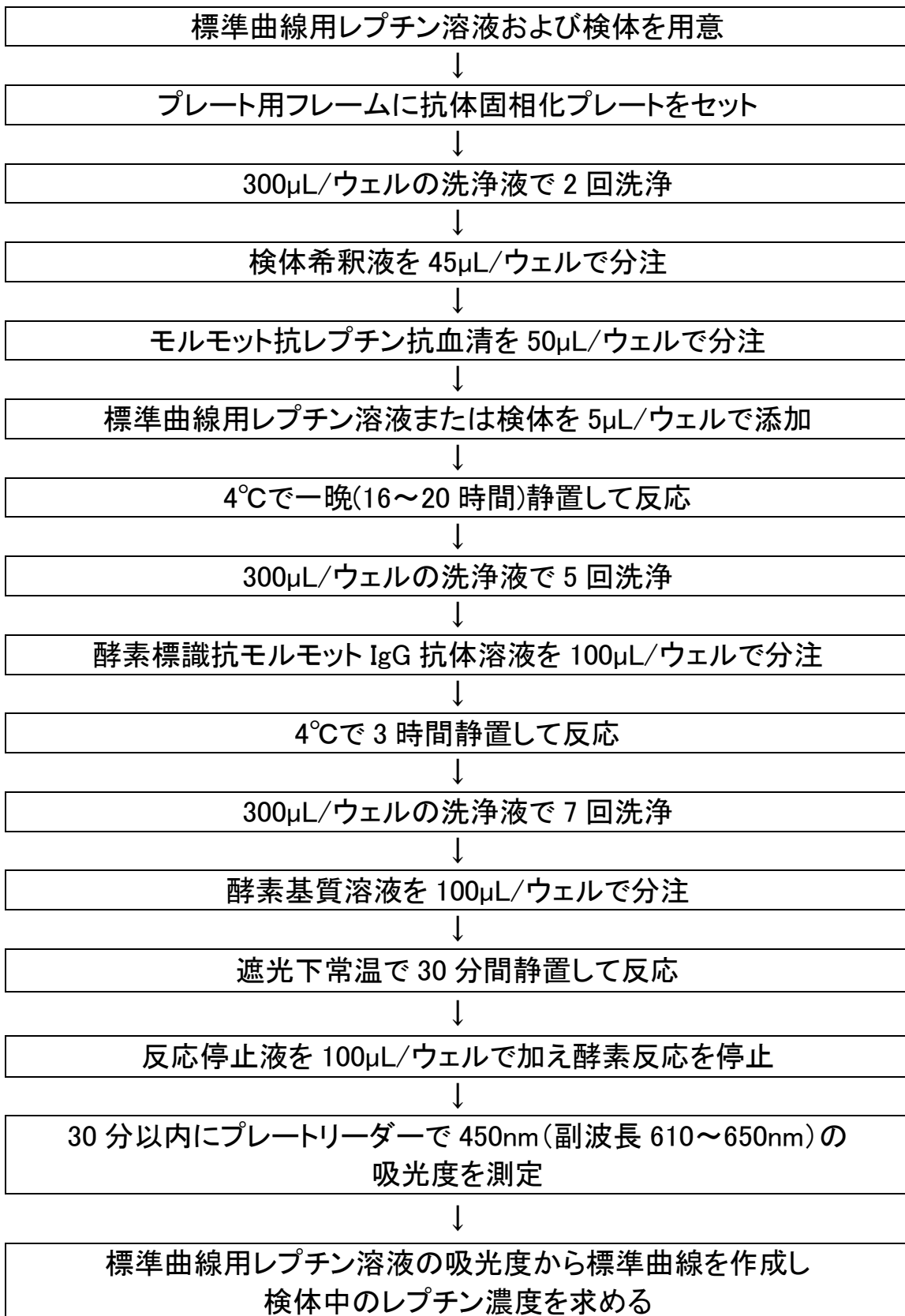
[2 日目]

- 二次反応:
7. ウェル内の溶液を完全に除去します。次に各ウェルあたり 300 μ L ずつの洗浄液で 5 回洗浄します。最後の洗浄でウェル内に残った溶液を完全に除くため、プレートを清潔なペーパータオルなどに押しつけるようにして水分を除いてください。
 8. 各ウェルに酵素標識抗モルモット IgG 抗体溶液(4 ページの「試薬の調製法」に従い調製したもの)を 100 μ L ずつ分注します。
 9. プレート用ふたをして 4 $^{\circ}$ Cで 3 時間静置して反応させます。

- 酵素反応:**
10. ウェル内の溶液を完全に除去します。次に各ウェルあたり300 μ Lずつの洗浄液で7回洗浄します。最後の洗浄でウェル内に残った溶液を完全に除くため、プレートを清潔なペーパータオルなどに押しつけるようにして水分を除いてください。
 11. 各ウェルにG **酵素基質溶液**を100 μ Lずつ分注します。
 12. プレート用ふたをして遮光下常温で正確に30分間静置して反応させます。
 13. 各ウェルにH **反応停止液**を100 μ Lずつ分注して酵素反応を停止させます。
 14. プレートリーダー(主波長450nm、副波長610~650nm)で各ウェルの吸光度を測定します。
 15. 標準曲線用レプチン溶液の吸光度より標準曲線を作成し、検体中のレプチン濃度を求めます。レプチン濃度の算出法については、12 ページを参照してください。
- *注意** 酵素反応停止後は30分以内に吸光度を測定してください。

■ 通常測定法操作手順の概略

測定は二重測定以上をおすすめします。



■ 短時間測定法操作手順

測定は二重測定以上をおすすめします。

全ての試薬は常温に戻してから使用してください。

標準曲線用レプチン溶液および検体を分注する際、ピペティング容量にばらつきが生じないように注意してください。

標準曲線用レプチン溶液

レプチン標準溶液をC 検体希釈液で倍々に希釈し、下記に示しますように0ng/mL から25.6ng/mL の標準曲線用レプチン溶液を調製します。調製後は直ちに使用してください。

	標準曲線用レプチン溶液 (ng/mL)							
	25.6	12.8	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0
レプチン標準溶液	50	50						
検体希釈液		50	50	50	50	50	50	50
総液量	50	100	100	100	100	100	100	100

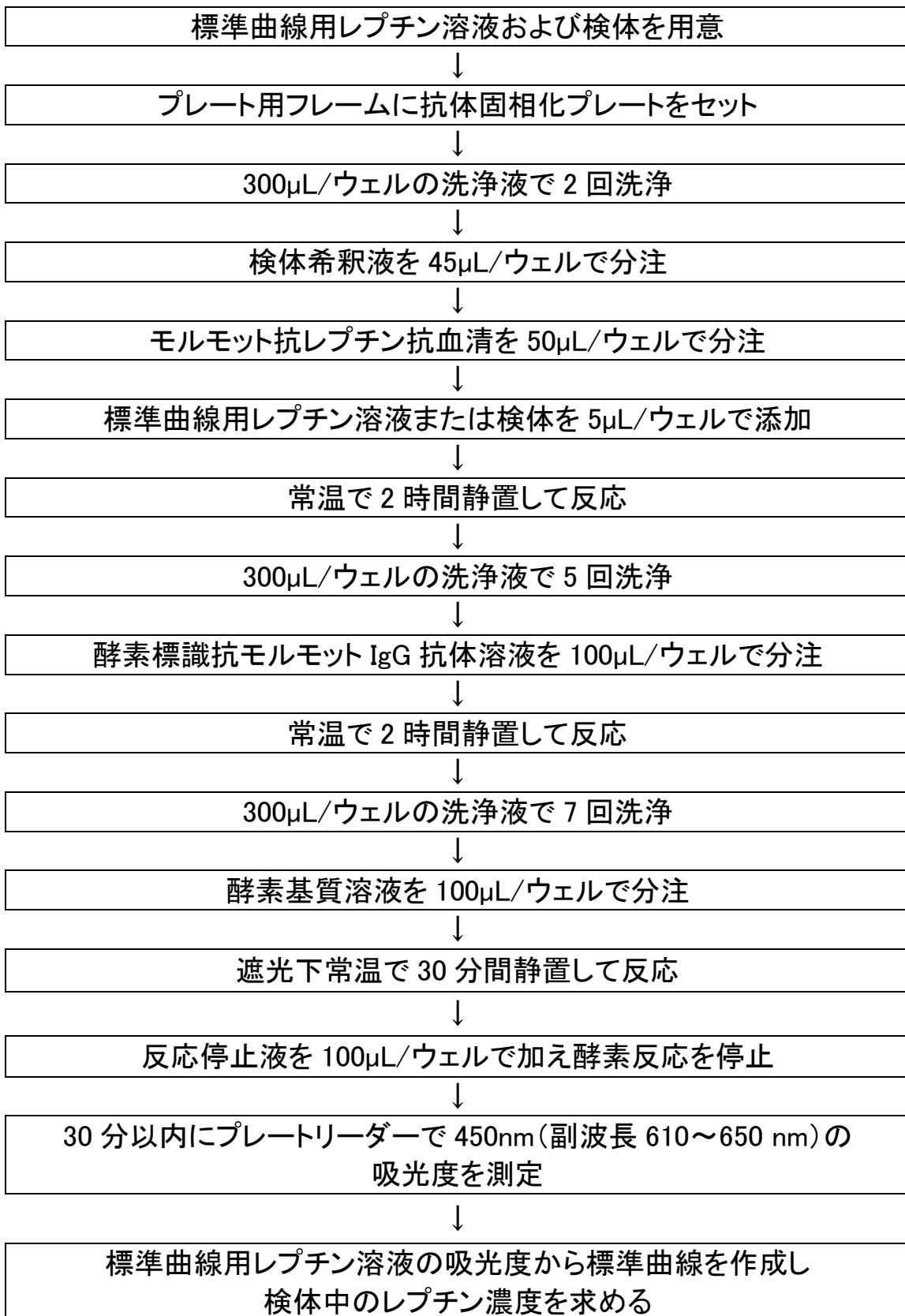
(μL)

- 一次反応:
1. A 抗体固相化プレートを付属のプレート用フレームにセットします。
 2. 各ウェルに洗浄液を 300μL ずつ分注し、アスピレーター等で洗浄液を除去してウェルの洗浄を行います。この操作をもう一度繰り返します。
 3. 各ウェルに C 検体希釈液を 45μL ずつ分注します。
 4. 各ウェルに D モルモット抗レプチン抗血清を 50μL ずつ分注します。
 5. 各ウェルに標準曲線用レプチン溶液または検体を 5μL ずつ分注します。検体中のレプチン濃度が高い場合は検体量を減らし、その分検体希釈液を加えてください。(一次反応の全液量は 100μL /ウェルとなります)。
 6. 付属のプレート用ふたをして常温で 2 時間静置して反応させます。

- 二次反応:**
7. ウェル内の溶液を完全に除去します。
次に各ウェルあたり 300 μ L ずつの洗浄液で 5 回洗浄します。最後の洗浄でウェル内に残った溶液を完全に除くため、プレートを清潔なペーパータオルなどに押しつけるようにして水分を除いてください。
 8. 各ウェルに**酵素標識抗モルモット IgG 抗体溶液**(4 ページの「試薬の調製法」に従い調製したものを)を 100 μ L ずつ分注します。
 9. プレート用ふたをして常温で 2 時間静置して反応させます。
- 酵素反応:**
10. ウェル内の溶液を完全に除去します。
次に各ウェルあたり300 μ L ずつの洗浄液で7回洗浄します。最後の洗浄でウェル内に残った溶液を完全に除くため、プレートを清潔なペーパータオルなどに押しつけるようにして水分を除いてください。
 11. 各ウェルに**G 酵素基質溶液**を100 μ Lずつ分注します。
 12. プレート用ふたをして遮光下常温で正確に30分間静置して反応させます。
 13. 各ウェルに**H 反応停止液**を100 μ Lずつ分注して酵素反応を停止させます。
 14. プレートリーダー(主波長450nm、副波長610~650nm)で各ウェルの吸光度を測定します。
 15. 標準曲線用レプチン溶液の吸光度より標準曲線を作成し、検体中のレプチン濃度を求めます。レプチン濃度の算出法については、12 ページを参照してください。
- *注意** 酵素反応停止後は30分以内に吸光度を測定してください。

■ 短時間測定法操作手順の概略

測定は二重測定以上をおすすめします。

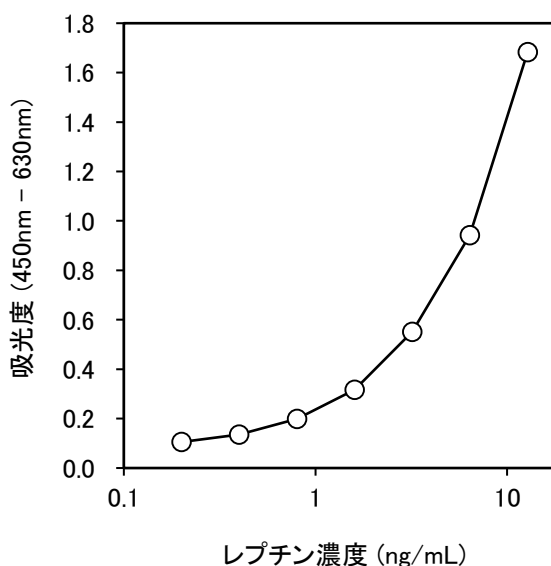


■ レプチン濃度の算出法

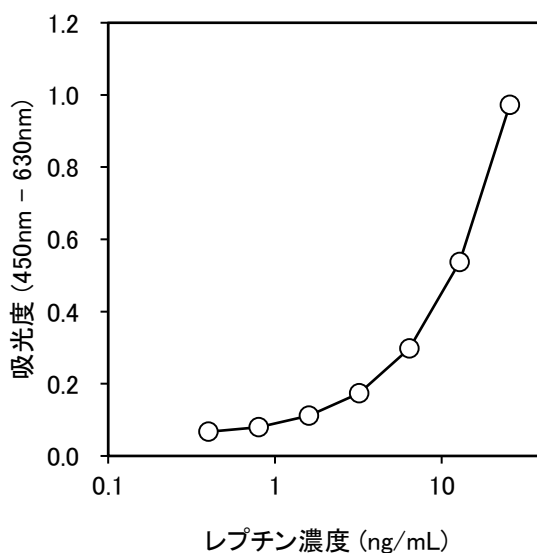
1. 測定した各ウェルの吸光度の平均値を算出します。
2. 標準曲線用レプチン溶液の各レプチン濃度を横軸に、標準曲線用レプチン溶液のそれぞれの吸光度を縦軸にプロットし、標準曲線を作成します。グラフ描画ソフトウェアを用いて標準曲線を作成する場合は、4-パラメーターロジスティック回帰をお勧めします。
3. 標準曲線より各検体中のレプチン濃度を読みとります。
4. 検体の吸光度が、標準曲線の吸光度より外れた場合は、検体を検体希釈液で希釈し再度測定してください。

標準曲線例

通常測定法



短時間測定法



■ キットの保存条件および有効期限

1. 2～8℃で光の当たらない場所に保管してください。
(凍結厳禁)
2. キットは有効期限内に使用してください。
有効期限はラベルに記載してあります。
3. 本取扱説明書には、開封または調製した試薬を安定に使用できる日数が記載されています(4ページの「試薬の調製法」をご参照ください)。開封した試薬等については、記載されている日数以上経過したものは測定誤差の原因となりますので、有効期限内であっても使用しないでください。

■ 使用上または取扱い上の注意

1. ロット番号の異なる試薬を組み合わせ使用しないでください。
2. 測定の際は必ず標準曲線用レプチン溶液を同時に測定し、測定の都度標準曲線を作成してください。
3. 反応停止液、酵素基質溶液を取り扱う場合、溶液と接触する部分に金属が使用されていないものを使用してください。
4. 反応停止液は1N 硫酸であり、酵素基質溶液は過酸化水素を含むのでこれらの試薬の取扱いの際は手や粘膜につかないようご注意ください。
5. 試薬が誤って手や粘膜についた場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。
6. 一部の試薬には動物の血清が使用されていますので、取扱いにご注意ください。

