

soluble (Pro)renin Receptor Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

(プロ)レニン受容体 ; (Pro)renin Receptor / (P)RRはレニンとプロレニンに共通の受容体で、プロレニンは(P)RRと結合することで、アンジオテンシンノーゲンとの結合能を獲得し、レニンと同程度にアンジオテンシンノーゲンからアンジオテンシンIへの変換を触媒する活性を持つようになります。また、この(P)RRがプロレニンとの結合で刺激されると、細胞内シグナル伝達が促進します。このことから、過剰に活性化した組織RAA (Renin-Angiotensin-Aldosterone) 系を抑制する新たな治療戦略構築のために、(P)RR研究は重要な意味を持つと考えられています。

(P)RRは39kDaの1回膜貫通型受容体タンパクですが、furinにより分解され約29kDaの遊離型(可溶性/soluble)を産生することが報告されており、疾患機序の解明および新薬開発において血中および尿中の可溶性(P)RRの定量は新しい知見を生み出すことが期待されます。

本キットは、血中および尿中の可溶性(プロ)レニン受容体タンパク質濃度を定量することができます。

* 分解されていない全長の(P)RRも同様に検出しますので、組織抽出液やlysateサンプルではtotalの(P)RR量を測ることになります。

2. 原理および測定方法

本製品は、サンドイッチ法によるELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)キットです。1次抗体は、プレートに固相されていますので、検体および標準物質を加え、1次反応をおこない洗浄後HRP 標識された2次抗体を加え2次反応をおこないます。反応後、過剰の2次抗体を洗浄除去します。Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させます。この発色は、soluble (Pro)renin Receptor の量に比例します。

3. 測定範囲

125 ~ 8,000 pg/mL

4. 使用目的

- ヒト、マウス、ラットの血清、EDTA-血漿、ヒトの尿および培養上清中の soluble (Pro)renin Receptor を測定できます。
- 尿検体につきましては、採尿直後に添付の希釈用緩衝液で10倍程度に希釈してから測定に使用してください。(検体の保存については7-1をご参照ください)
- ウシ血清由来の(P)RRにも交差しますので、FBS含有の培養液を測定する場合はご注意ください。陰性コントロールをおくことを推奨します。

5. 構成試薬

1 抗体プレート (抗 (Pro)renin receptor Rabbit IgG A.P. 固相)	96Well x 1
2 標識抗体濃縮液 (30倍濃度 HRP 標識抗 (Pro)renin receptor (93A1B) Mouse IgG Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3 標準物質 (Recombinant Human soluble (Pro)renin Receptor)	0.5mL x 2
4 希釈用緩衝液 *	30mL x 1
5 標識抗体用溶解液 *	12mL x 1
6 TMB 基質液	15mL x 1
7 停止液 *	12mL x 1
8 濃縮洗浄液 *	50mL x 1

6. 用法および用量 (操作方法)

(1) 必要な器具・器材

プレートリーダー (測定波長: 450nm)	マイクロピペットおよびチップ
希釈用テストチューブ	メスシリンダーおよびビーカー
精製水	グラフ用紙 (両対数)
ペーパータオル	洗浄ピン
冷蔵庫 (4°C として)	採取用容器 (清潔な試験管など)

(2) 準備

濃縮洗浄液の希釈方法

濃縮洗浄液は、40倍濃度です。使用前に常温に戻し十分に転倒混和します。濃縮洗浄液 50mL に対して精製水を 1,950mL 加え混和します。これを洗浄液とします。冷蔵保存し2週間以内に使用してください。

標識抗体濃縮液の希釈方法

標識抗体濃縮液は30倍濃度です。別に用意した採取用容器にて、必要量に応じて標識抗体濃縮液を標識抗体用溶解液で30倍希釈してください。これを標識抗体とします。

希釈例)

1スリット (8ウェル) 使用する場合=800 μL 必要(最低量)
(標識抗体濃縮液を30 μL とし、標識抗体用溶解液 870 μL を加え良く混和し、100 μL ずつ使用します。)

この操作は、標識抗体添加の直前におこなってください。

標識抗体濃縮液の残りは、蓋をしっかりと閉め冷蔵にて保存してください。有効期限内に再度使用できます。

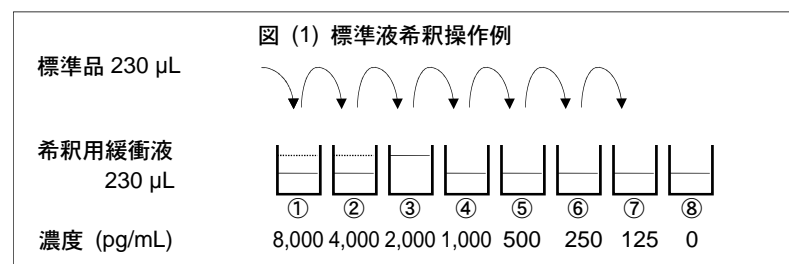
標準物質の希釈方法

標準物質バイアル瓶に精製水を0.5 mL 加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は16,000 pg/mL となります。溶解後の標準物質は凍結保存することができます。凍結融解の繰り返しはできません。

希釈用テストチューブを8本用意し希釈用緩衝液を230 μL ずつ量り取ります。各々のテストチューブに

8,000 pg/mL, 4,000 pg/mL, 2,000 pg/mL, 1,000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 0 pg/mL の表示をします。

8,000 pg/mL の希釈用テストチューブに16,000 pg/mL の標準物質溶液を230 μL 加え混和し、その溶液230 μL を4,000 pg/mL の希釈用テストチューブに加えて混和します。順次2倍連続希釈をおこない8,000 pg/mL ~ 125 pg/mL までの7点を希釈標準品とし、0 pg/mL を検体ブランクとします。(図(1) 参照)



検体の希釈方法

検体は必要に応じて希釈用緩衝液で適宜希釈し測定してください。尿検体は採取直後に希釈用緩衝液で10倍程度に希釈してください。

(3) 測定操作方法

試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し変化のない事を確かめてください。

検体の測定と同時に希釈標準品を測定し検量線を設定してください。

- 1 ブランクの添加 (以降図 (2) 参照)
試薬ブランクを設定し希釈用緩衝液を100 μL 入れます。
- 2 検体、希釈標準品の添加
検体100 μL および希釈標準品各100 μL ならびに検体ブランク100 μL を入れます。
- 3 プレートカバーをして4°C 一晩反応
- 4 ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。*
- 5 標識抗体の添加
検体、標準、検体ブランクに標識抗体を各々100 μL 添加します。
- 6 プレートカバーをして4°C 60分間反応
- 7 ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。*
- 8 TMB 基質液の添加
あらかじめ必要量を採取用容器にとり、そこからすべてのウェルにTMB 基質液を100 μL 添加します。TMB 基質液添加後、反応液は徐々に青色になります。この時の反応は遮光してください。また、採取用容器に残ったTMB 基質液は、コンタミの原因になりますので元に戻さないでください。
- 9 遮光をして常温30分間反応
- 10 停止液の添加
すべてのウェルに停止液を100 μL 添加します。プレートの側面を軽くたたいて混和します。反応液は青色から黄色に変化します。
- 11 吸光度測定
プレート底面のよごれや水滴を拭き取り液面に気泡がないことを確認した後、30分以内に試薬ブランクを対照として検体および標準ならびに検体ブランクの波長450nmにおける吸光度を測定してください。

図 (2) 測定操作一覧

試料	検体	標準	検体ブランク	試薬ブランク
	検体	希釈標準品	希釈用緩衝液	希釈用緩衝液
	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
プレートカバーをして4°C 一晩反応				
4回 (洗浄液 350 μL 以上)*				
標識抗体	100 μL	100 μL	100 μL	-
プレートカバーをして4°C 60分間反応				
5回 (洗浄液 350 μL 以上)*				
TMB 基質液	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
遮光常温30分間反応				
停止液	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
プレートをたたいて反応液を混和し、30分以内に試薬ブランクを対照として450 nmにおける検体、標準、検体ブランクの吸光度を測定				

7. 操作上の注意事項

- 1 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。
* 尿検体の場合は、採取直後に希釈用緩衝液で10倍程度に希釈してから凍結保存してください。
- 2 検体は必要に応じて希釈用緩衝液で希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定することをおすすめします。
- 4 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 5 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 6 洗浄液は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完全に除去してください。ペーパータオルをウェルの中に入れる事はしないでください。
- 7 TMB 基質液は、光に対して敏感です。遮光保存してください。金属との接触も避けてください。
- 8 吸光度測定は、停止液添加後30分間以内におこなってください。

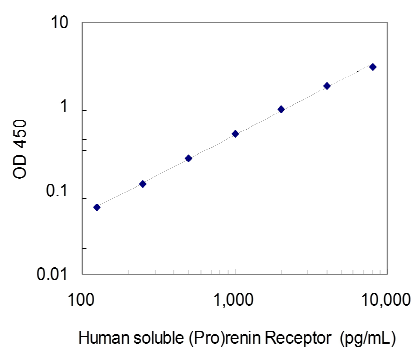
8. 測定結果の算出方法

対数グラフの縦軸に吸光度を、横軸に検体濃度を取り各標準物質濃度の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値をとり検量線を設定します。

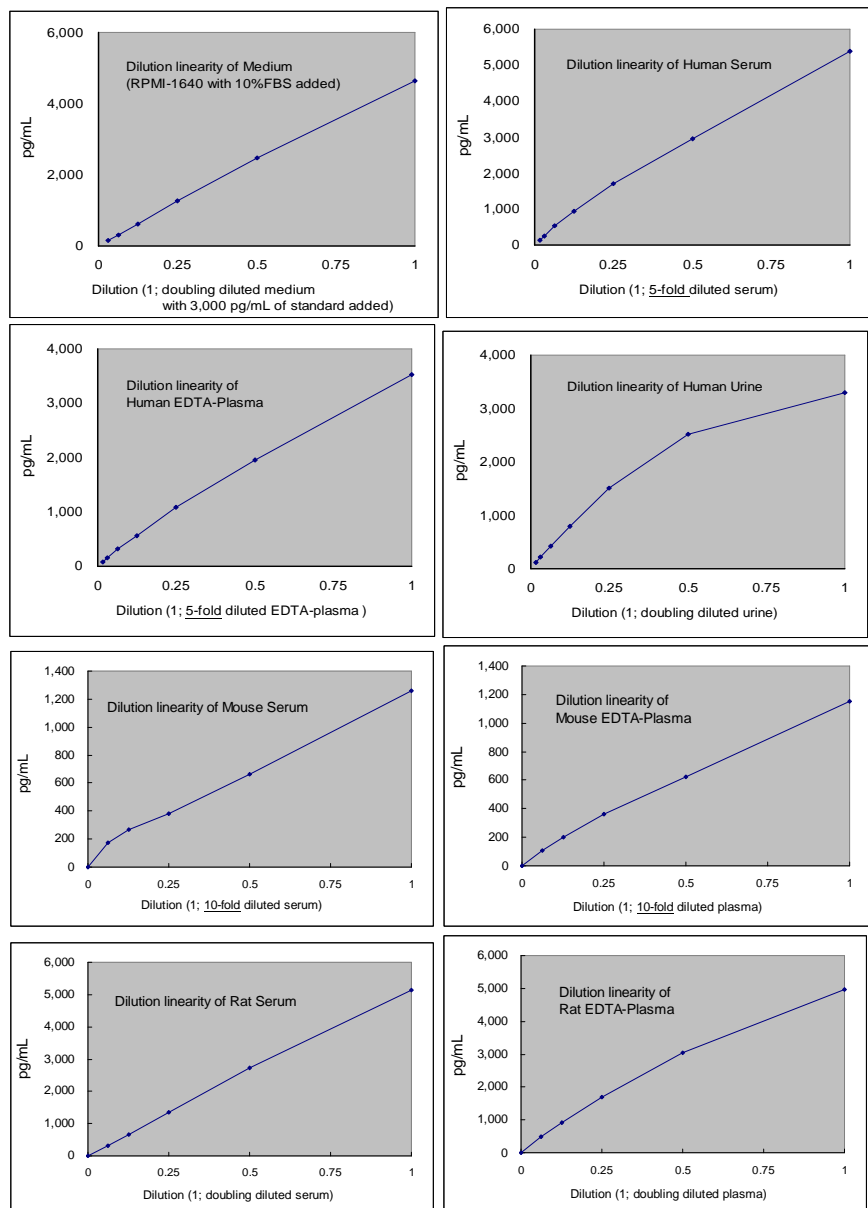
試料検体の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値を検量線に当てはめ、検体濃度を読みとります。

9. 測定値と検量線作成例

標準品濃度 (pg/mL)	吸光度 (450nm)
8,000	3.004
4,000	1.775
2,000	0.951
1,000	0.501
500	0.267
250	0.146
125	0.091
0 (検体ブランク)	0.028



上記検量線は作成例です。測定に当たってはその都度検量線を作成してください。

10. キットの性能
(1) 希釈直線性

(2) 添加回収試験

検体	添加量 (pg/mL)	理論値 (pg/mL)	測定値 (pg/mL)	%
10 % FBS 添加 *TIL Media I (x4)	1,500	2,489	2,496	100.3
	750	1,739	1,667	95.9
	375	1,364	1,331	97.6
血清 (健常人) (x50)	4,000	4,495	4,143	92.2
	2,000	2,495	2,342	93.9
	1,000	1,495	1,364	91.2
血漿 (健常人) (EDTA) (x50)	4,000	4,462	3,957	88.7
	2,000	2,462	2,136	86.8
	1,000	1,462	1,286	88.0
尿 (健常人) (x10)	1,500	2,576	2,345	91.0
	750	1,826	1,702	93.2
	375	1,451	1,351	93.1
血清 (BALB/c マウス) (x50)	750	1,169	1,014	86.7
	188	606	590	97.4
	23	442	450	101.8
血漿 (EDTA) (BALB/c マウス) (x50)	750	926	807	87.1
	188	364	323	88.7
	23	200	195	97.5
血清 (ラット) (x50)	750	1,107	855	77.2
	188	544	469	86.2
	23	380	379	99.7
血漿 (EDTA) (ラット) (x50)	750	924	780	84.4
	188	362	304	84.0
	23	198	169	85.4

* TIL Media I ; IBL code 33640

(3) 同時再現性

測定値 (pg/mL)	SD (pg/mL)	CV (%)	n
3,418	106	3.1	21
880	48	5.5	21
253	14	5.5	21

(4) 測定間再現性

測定値 (pg/mL)	SD (pg/mL)	CV (%)	n
3,497	106	3.0	6
888	22	2.5	6
259	20	7.7	6

(5) 感度

24 pg/mL

本キットの感度は、NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)の評価方法に従い求めました。(National Committee for Clinical Laboratory Standards Evaluation Protocols, SC1, (1989) Villanova, PA : NCCLS 参照)

11. 使用上または取り扱い上の注意

- 1 保存は、2~8°Cとしてください。使用前に全ての試薬は常温に戻してください。
- 2 標準物質は、凍結乾燥品です。開封は、十分注意しゆっくりとおこなってください。
- 3 停止液は強酸性 (1N 硫酸) です。衣服・皮膚等への接触および廃棄には十分注意してください。
- 4 使用後の抗体プレートや試薬は、多量の水で洗い流してから廃棄してください。
- 5 希釈用緩衝液、標識抗体濃縮液および濃縮洗浄液は、まれに析出を認める場合がありますが、性能に問題はありません。
- 6 構成試薬には動物血液成分を含む物があります。取り扱いに注意し使用後は手洗いなどをおこなってください。
- 7 ロットが異なる製品の構成試薬や他のキットの構成試薬を混ぜたり、交換したりして使用することは避けてください。
- 8 期限切れの試薬は、使用しないでください。
- 9 本キットは、研究用試薬です。診断等に用いることはできません。

12. 保存方法および有効期限

2~8°C 保存

使用期限は外箱に記載

13. 包装単位および製品番号

96 Well

製品番号 27782

14. 参考文献

1. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest.* 2002 Jun;109(11):1417-27.
2. Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y, Suzuki F, Nakagawa T, Tada Y, Koura Y, Nishiyama A, Okada H, Uddin MN, Nabi AH, Ishida Y, Inagami T, Saruta T. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest.* 2004 Oct;114(8):1128-35.
3. Cousin C, Bracquart D, Contrepas A, Corvol P, Muller L, Nguyen G. Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma. *Hypertension.* 2009 Jun;53(6):1077-82.
4. Cruciat CM, Ohkawara B, Acebron SP, Karaulanov E, Reinhard C, Ingelfinger D, Boutros M, Niehrs C. Requirement of prorenin receptor and vacuolar H⁺-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling. *Science.* 2010 Jan 22;327(5964):459-63.
5. Kinouchi K, Ichihara A, Sano M, Sun-Wada GH, Wada Y, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, Narita T, Oshima Y, Sakoda M, Tamai Y, Sato H, Fukuda K, Itoh H. The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H⁺-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circ Res.* 2010 Jul 9;107(1):30-4.

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

Version 3.

2016年9月更新 *