

2-デオキシグルコース(2DG)代謝速度測定キット

平成 23 年 3 月 18 日改定

※本品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。

インスリンは血糖を下げるホルモンで、その作用は脂肪細胞や骨格筋などインスリン感受性臓器を中心に糖輸送活性を促進し、細胞外から細胞内へ糖を取り込ませることが知られています。

糖取り込み量を測定するには、一般的に放射性ラベルした 3-O-メチル-D-グルコースや 2-デオキシグルコース(2-DG)を用いる方法でおこなっています。この方法では放射性物質を使用するため RI 管理区域内のみしか使用することができず、使用する上で厳しい制限があるため通常の実験室レベルでは使用することができません。さらに細胞間隙に残された 2-DG を区別するためには、2DG と 2DG6P を分離して測定する、または放射性ラベルしたスクロースを同時に添加し組織中のスクロース量から細胞間隙に残された 2-DG 量を推定する必要があります。

一方、非放射性で測定する方法として、蛍光もしくは色素標識したグルコースで取り込ませ定量する方法もありますが、標識化合物を付加させたグルコースでは構造がグルコースと比べて大きく変化するため糖輸送の定量的評価にはやや難がありました。

本製品は、非放射性物質である 2-デオキシグルコースを用いて細胞内に取り込ませた後、細胞抽出液を 2 段階の酵素反応および酵素サイクリング法で糖取り込み量を測定するキットです。

この測定方法の特徴は以下の通りです。

- ・non-RI 法なので通常の実験室レベルで測定できる。
- ・2DG6P を測定するので細胞内の糖取り込み量を定量することができ、細胞外に存在する 2DG の影響を受けない。
- ・酵素サイクリング法で高感度に検出できる。

本製品は、大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 生理学研究所 箕越教授からのライセンス品です。

測定原理

細胞内に取り込まれた 2DG は、ヘキソキナーゼによって 2DG6P にリン酸化されるが、次の酵素反応に進まずに細胞内に留まります。そのため細胞内には内因性 G6P と 2DG6P が含まれている状態になりますが、本キットの第 1 段階で試料中に含まれる内因性 G6P を分解させた後に、第 2 段階で細胞内に取り込まれた 2DG6P 量に比例して NADPH を産生し、酵素サイクリング法で高感度に検出します。

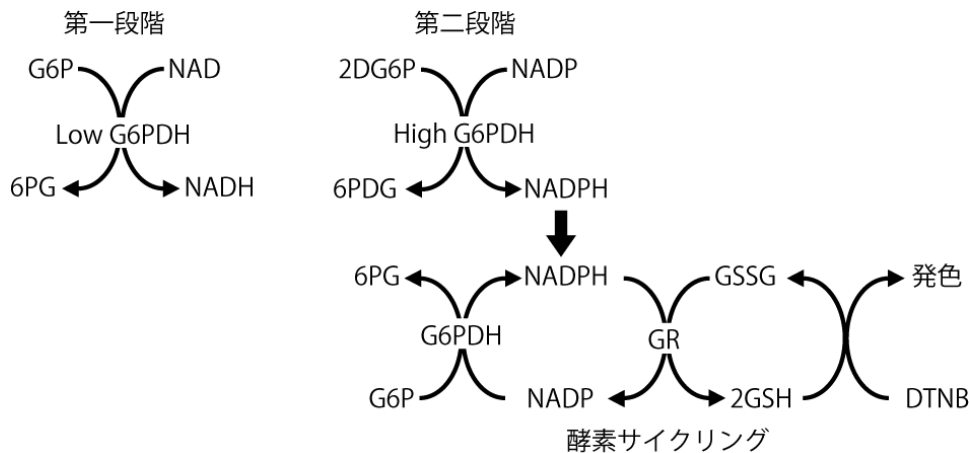






図1. 測定原理

《 I. キット構成》

内容	容量	本数	保存温度	危険表記および取扱上の注意
反応基質液 A	1,800 μ L	1 本	-20 $^{\circ}$ C (解凍後は 4 $^{\circ}$ C)	成分は労働安全衛生法に非該当ですが、取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。
反応液 B	500 μ L	1 本		(成分として塩化水素を 3.6%含む) 労働安全衛生法 第 57 条の 2 に該当 危険  飲み込むと有毒 (経口) 吸入すると有毒 (気体) 吸入すると生命に危険 (粉じん及びミスト) 重篤な皮膚の薬傷・眼の損傷 重篤な眼の損傷 吸入するとアレルギー、喘息又は呼吸困難を起こすおそれ 呼吸器系の障害 長期又は反復ばく露による歯、呼吸器系の障害 水生生物に非常に強い毒性
反応液 C	500 μ L	1 本		(成分として水酸化ナトリウムを 4%含む) 労働安全衛生法 第 57 条の 2 に該当 危険  重篤な皮膚の薬傷・眼の損傷 呼吸器の障害 水生生物に有害
反応基質液 D	850 μ L	1 本		成分は労働安全衛生法に非該当ですが、取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。
反応液 E	500 μ L	1 本		(成分として水酸化ナトリウムを 4%含む) 労働安全衛生法 第 57 条の 2 に該当 危険  重篤な皮膚の薬傷・眼の損傷 呼吸器の障害 水生生物に有害
反応液 F	500 μ L	1 本		(成分として塩化水素を 4.5%含む) 労働安全衛生法 第 57 条の 2 に該当 危険  飲み込むと有毒 (経口) 吸入すると有毒 (気体) 吸入すると生命に危険 (粉じん及びミスト) 重篤な皮膚の薬傷・眼の損傷 重篤な眼の損傷 吸入するとアレルギー、喘息又は呼吸困難を起こすおそれ 呼吸器系の障害 長期又は反復ばく露による歯、呼吸器系の障害 水生生物に非常に強い毒性
反応基質液 G	1,100 μ L	1 本	-20 $^{\circ}$ C	成分は労働安全衛生法に非該当ですが、取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。
1mM 2DG6P	250 μ L	1 本		
検体希釈原液	1.5mL	1 本		
発色基質液	6.5mL	1 本		
DTNB(粉末)	2mL 分 (10 検体用)	3 本		
Low G6PDH ※赤キャップ	13 μ L	1 本		
High G6PDH ※黒キャップ	130 μ L	1 本		
GR ※青キャップ	10 μ L	1 本		

※本キットで 25 検体(3 回分)測定することができます。

※G6PDH: Glucose-6-phosphate dehydrogenase

※GR: Glutathione Reductase

《Ⅱ. 各反応液の調製》

検体希釈液の調製

- ・検体希釈原液を超純水で 100 倍希釈したものを検体希釈液とします。
- ・検体希釈液は冷蔵で 3 ヶ月間安定です。

標準液の調製

- ・標準液は、1mM 2DG6P を検体希釈液で希釈します。
- ・0 μ M 2DG6P から 5 μ M 2DG6P の範囲内で複数の濃度を標準液として用意します。
- ・標準液は冷蔵で 1 週間保存可能です。

反応液 A の調製

- ・1 検体あたり反応液 A は 60 μ L 使用します
- ・10 検体分の反応液 A の調製は、下表のように混合してください(用時調製、使用時まで氷上保管)。

反応基質液 A	650 μ L
Low G6PDH ※チューブのキャップは赤色	3 μ L

※Low G6PDH のチューブをあける前に、必ずフラッシュ遠心等で壁面に付着した溶液を落としてから使用下さい。

※Low G6PDH は 50%グリセロールが含まれているため、溶液に粘性があります。

※調製後の反応液 A は、溶液が均一になるように混合して下さい。

反応液 D の調製

- ・1 検体あたり反応液 D は 30 μ L 使用します。
- ・10 検体分の反応液 D の調製は、下表のように混合してください(用時調製、使用時まで氷上保管)。

反応基質液 D	290 μ L
High G6PDH 溶液 ※チューブのキャップは黒色	30 μ L

※High G6PDH のチューブをあける前に、必ずフラッシュ遠心等で壁面に付着した溶液を落としてから使用下さい。

※High G6PDH は 50%グリセロールが含まれているため、溶液に粘性があります。

※調製後の反応液 D は、溶液が均一になるように混合して下さい。

発色液の調製

- ・発色基質液と DTNB(粉末)を下表のように混合し、粉末を完全に溶かして発色液を調製します。

DTNB(粉末)	バイアル 1 本
発色基質液	2mL

- ・発色液は、遮光下冷蔵で 7 日間保存可能です。

酵素サイクリング液の調製

- ・1 検体あたり酵素サイクリング液は 70 μ L 使用します。
- ・10 検体分の酵素サイクリング液の調製は、下表のように使用直前に混合して使用してください(用時調製、使用時まで氷上保管)。

反応基質液 G	360 μ L
発色液	360 μ L
High G6PDH ※チューブのキャップは黒色	10 μ L
GR ※チューブのキャップは青色	2 μ L

※High G6PDH および GR のチューブをあける前に、必ずフラッシュ遠心等で壁面に付着した溶液を落としてから使用下さい。

※High G6PDH および GR は 50%グリセロールが含むため、粘性があります。

※調製後の酵素サイクリング液は、溶液が均一に混合されるようにして下さい。

《Ⅲ. 測定方法》

測定をおこなう前に下記の注意事項を読んでください。

- ・各試薬を添加する前(蓋をあける前)、各試薬を添加し混合した後は、必ずフラッシュ遠心等で壁面および蓋に付着した液を十分に落として下さい。壁面に試薬が付着した状態で操作を続けた場合、測定結果に大きな誤差が生じますのでご注意ください。
- ・マイクロプレートでアッセイする場合は、反応中はプレートシール等で密閉状態にしてください。

下記の液量は1検体あたりの添加量を記載しています。

- (1) 試料または標準液 20 μ L に反応液 A 60 μ L を混合し、室温(20~25 $^{\circ}$ C)で一晩(16 時間以上)静置してください。

試料の調製は、《Ⅳ. 糖取込の方法例》をご覧ください。

- (2) 反応液 B を 5 μ L 加えて、十分に混合してください。
- (3) 38 $^{\circ}$ C で 1 時間保温してください。
- (4) 反応液 C を 5 μ L 加えて十分に混合し、室温で 5~10 分間静置してください。
※この間に反応液 D を調製してください。
- (5) 反応液 D を 30 μ L 加えて、穏やかに混合してください。
- (6) 38 $^{\circ}$ C で 1 時間保温してください。
- (7) 反応液 E を 5 μ L 加えて、十分に混合してください。
- (8) 70 $^{\circ}$ C で 1 時間保温します。
- (9) 反応液を氷上で 5 分程度放置し、反応液を冷却してください。
- (10) 反応液 F を 5 μ L 加えて、十分に混合してください。
- (11) 室温で 5~15 分間静置します。

※この間に酵素サイクリング液を調製してください。

- (12) 酵素サイクリング液 70 μ L を同時に加えて、穏やかに混合してください。

速やかに反応液を、波長 420nm (もしくは~430nm)における吸光度変化を室温(25~30 $^{\circ}$ C)で経時的に測定してください。

反応液中に含まれる 2DG6P 量に依存して黄色に発色し、反応時間にも比例して発色が進むため、同時に測定できる機器(マイクロプレートリーダー)で測定することが好ましいです。

やむを得ずマイクロキュベットを使用した分光光度計で測定する場合は、発色させた反応液に 5M 塩化ナトリウム溶液を 50 μ L 同時に添加して発色を停止してください。その後、速やかに吸光度測定してください。

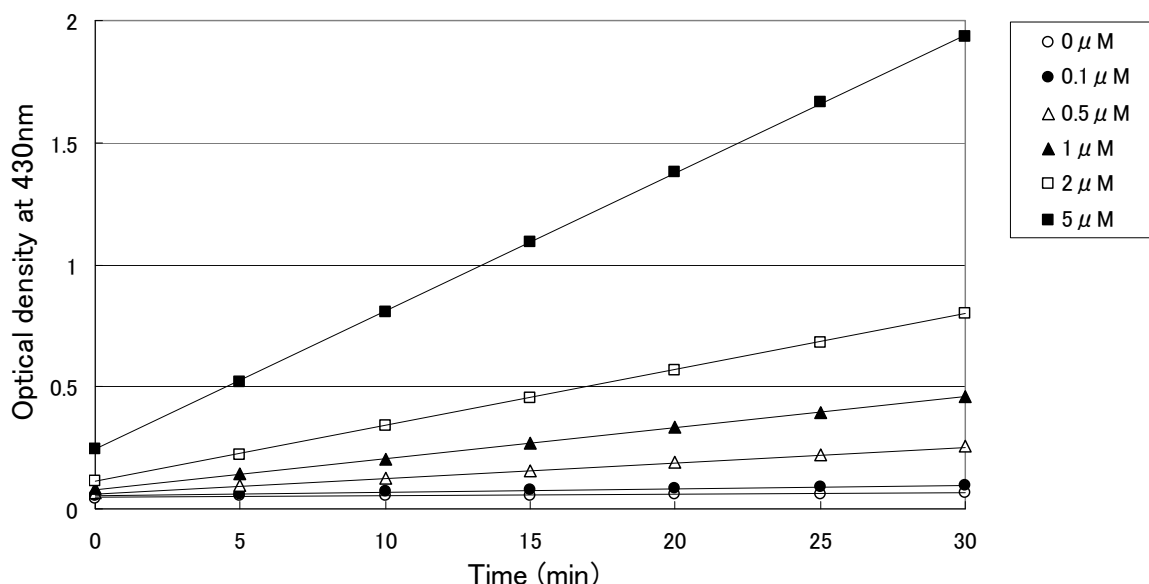


図 2. 2DG6P の各濃度における吸光度の経時的変化

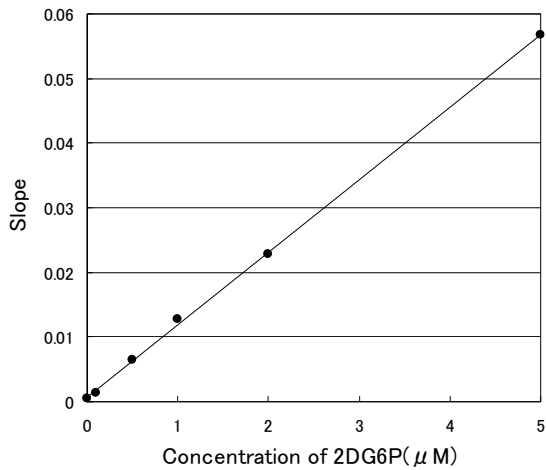


図 3. カイネティック法による検量線(発色後30分)

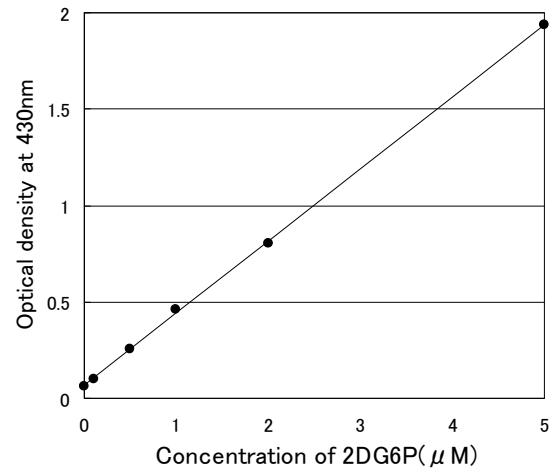


図 4. エンドポイント法による検量線(発色後30分)

《Ⅳ. 糖取込の方法例 -脂肪細胞を用いた糖取込み方法の場合》

必要な試薬類

- ・6 ウェルプレートで培養させた 3T3-L1 細胞などの脂肪細胞
- ・無血清培地
- ・37°Cに保温した Krebs Ringer Phosphate Hepes(KRPH)バッファー
(1.2mM KH₂PO₄、1.2mM MgSO₄、1.3mM CaCl₂、118mM NaCl、5mM KCl、30mM Hepes、pH7.5)
- ・BSA (essentially fatty acid free 及び globulin free グレード、例えば Sigma Ca. No. A0281 同等品を使用)
- ・2-Deoxy-D-glucose (2DG)溶液
- ・インスリン溶液
- ・PBS(-)
- ・Phloretin (もしくは Cytochalasin B などの糖取込み阻害剤)
- ・10mM Tris-HCl バッファー(pH8.0)

方法例

- (1) 脂肪分化させた培養細胞を用意してください。
- (2) 培地を除去し、無血清培地で 6 時間培養してください。
- (3) KRPH バッファーで 1 ウェルあたり 3mL 加えて、ウェル内を 3 回洗浄してください。
- (4) 2% BSA を含む KRPH バッファーで 1 ウェルあたり 3mL 加えます。
※これ以降のインスリン、Phloretin、2DG の添加は、測定目的によって使用してください。
- (5) インスリン溶液を最大 1 μM になるように添加し、37°Cで培養してください。
- (6) Phloretin 溶液は、インスリンを添加してから 16 分後に 200~1000 μM になるように添加してください。
- (7) 2DG 溶液は、インスリンを添加してから 18 分後に 1mM になるように添加してください。
- (8) 2DG を添加し 37°Cで 20 分間培養した後、培養液を除き、冷却した 200 μM Phloretin を含む PBS(-)でウェル内を 3 回洗浄します。
- (9) 1 ウェルあたり 3mL の 10mM Tris-HCl バッファー(pH8.0)でチューブに細胞を回収し、直ちに超音波処理によって細胞溶解液を作成してください。
- (10) 細胞抽出液を回収し、80°Cで 15 分間熱処理をおこないます。
- (11) 熱処理をおこなった後、冷却遠心(15,000g、20 分間)で上清を回収します。
- (12) 回収した上清の一部を検体希釈液で 5 倍またはそれ以上希釈し、その溶液を《Ⅲ. 測定方法》の試料とします。
抽出液を保存する場合は冷凍保存してください。
検体希釈液については《Ⅱ. 各反応液の調製》をご覧ください。

※細胞の抽出液に 2-メルカプトエタノールやジチオスレイトールのような還元剤、プロテアーゼ阻害剤は添加しないでください。

※細胞溶解には水酸化ナトリウム溶液を使用できませんので注意してください。

※細胞の種類・分化の程度によって、添加濃度や反応時間を調整してください。

実測例

3T3-L1 細胞を方法例および下記の添加スケジュールに従っておこなった 3T3-L1 細胞を抽出し測定した結果を図 5 に示します(※一測定例になります)。

添加物	SampleA	SampleB	SampleC	SampleD
インスリン	未添加	未添加	未添加	添加
2DG	未添加	添加	添加	添加
Phloretin	未添加	未添加	添加	未添加

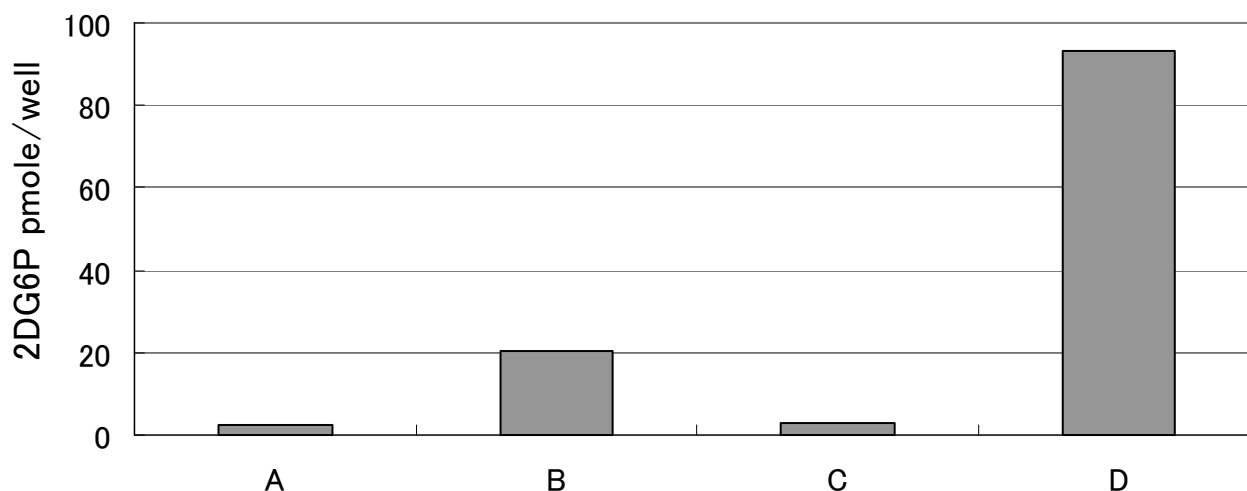


図 5. 測定結果

《V. 参考文献》

- (1) Kumiko Saito, Suni Lee, Tetsuya Shiuchi, Chitoku Toda, Masahiro Kamijo, Kyoko Inagaki-Ohara, Shiki Okamoto, Yasuhiko Minokoshi (2011). An enzymatic photometric assay for 2-deoxyglucose uptake in insulin-responsive tissues and 3T3-L1 adipocytes. *Anal.Biochem.*, 412, 9-17.
- (2) Bo M. Jørgensen and Hans N. Rasmussen (1979). Recycling analysis of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphates (NADP and NADPH). *Anal.Biochem.*, 99, 297-303.



〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)
TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620