

研究用



研究用試薬

YK013 Mouse C - Peptide EIA

取扱説明書

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770 TEL: 0544-22-2771

Website: www.yanaihara.co.jp E-mail: ask@yanaihara.co.jp

目 次

I. はじめに	2~3
II. 特徴	3
III. キットの構成	4
IV. 操作法	5~6
V. 操作上の注意	6
VI. 基本性能	7~8
VII. 貯蔵法および有効期間	8
VIII. 文献	9

YK013 Mouse C-Peptide EIA キット

1. はじめに

C-ペプチドは、インスリン生合成前駆体であるプロインスリンの臍B細胞内でのプロセッシングによって生じるインスリンの副産物です。インスリンと等モル比で血中に放出されるので、血中C-ペプチド濃度を測定することによって、臍B細胞のインスリンの分泌機能を推測することができます。C-ペプチドの半減期はインスリンのそれよりずっと長いという特徴を持っていることから、代謝が速いインスリンの代わりにC-ペプチドを測定することはインスリン分泌量の推測指標となり、臨床上広く利用されています。C-ペプチドの測定は、臨床的にはインスリン治療中の糖尿病患者のB細胞機能の評価(インスリン測定の代用)のみならず、低血糖状態の鑑別診断、高インスリン血症の鑑別診断、インスリン分泌総量の推定、臍摘出後の残存臍の有無の判定などにも応用できます。その他、インスリン受容体異常症や異常インスリン血症等インスリン代謝が大きく影響される病態では、C-ペプチドの測定はインスリンの測定よりはるかに重要となります。

また、C-ペプチドはそれ自身生理的活性を持たず、単なるインスリンの生合成副産物であると長らく考えられていましたが、C-ペプチドは近年の研究では、細胞の表面と特異的に結合し、 Ca^{2+} の細胞内への流入を促進し、MAP kinase、 Na^+ 、 K^+ -ATPase や eNOS を活性化するなどの研究結果が報告されています。動物実験では、糖尿病合併症の予防、心臓の虚血・再灌流傷害の保護効果、1型糖尿病ラットにおける神経再生能力低下の防止、およびインスリン介細胞の成長促進や高濃度グルコースによる細胞アポトーシスの保護などが観測されています。これらの成果から、今後C-ペプチドの生理活性研究はかつてないほど注目されてくるものと思われます。

当研究所ではすでにマウスC-ペプチド I(YK011)及びマウスC-ペプチド II(YK012)の測定キットを開発しています。今回開発したマウスC-ペプチドの簡易測定キットは、前回開発したマウスC-ペプチド Iを特異的に測定できるキット(YK011)とマウスC-ペプチド IIを特異的に測定できるキット(YK012)に対し、マウスC-ペプチド IとIIを同時に認識する抗体を使うことにより、マウスの血清、血漿中のC-ペプチド濃度を特異的に測定することを可能にしました。本 EIA キットはマウス体内のトータルのC-ペプチドレベル の変動を検討する上で、極めて有効に使用できるものです。

YK013 Mouse C-Peptide EIA キット	内容
▼ 0.412～100 ng/mL の範囲で測定できます。	1)測定プレート
▼ 41 未知検体を duplicate でアッセイできます。	2)標準品
▼ 血清、血漿サンプルの測定ができます。	3)標識抗原
▼ 測定は 18～20 時間と 1.5 時間で終了します。	4)特異抗体
▼ プレートは一列(8 ウエル)ずつ取り外しができますので、キットの分割使用が可能です。	5)SA-HRP 溶液
▼ 同時再現性 CV(%) 1.4~3.1	6)酵素基質液
▼ 日差再現性 CV(%) 4.2~8.1	7)緩衝液
	8)酵素反応停止液
	9)濃縮洗浄液
	10) プレート密閉用シール
保存と安定性 2～8℃で保存してください。製造日より 20ヶ月は安定です。	

II. 特徴

本キットはマウスの血清および血漿中に含まれるマウスC-ペプチドを直接的且つ特異的に定量するためのキットです。操作は簡便でしかも特異性・定量性に優れ、共存する他の生理活性物質や体液成分の影響を受けにくいなど多くの利点があります。なお、添付の標準品は高純度合成品(純度 99%以上)であり、表示の重量は絶対量を示しております。

＜特異性＞

本キットはマウスC-ペプチドIと93.9%、マウスC-ペプチドIIと100%、ラットC-ペプチドIと22.9%、ラットC-ペプチドIIと48.2%の交差反応性が認められます。マウスインスリンとの交差反応性 2%以下であります。ヒトとイスおよびブタのC-ペプチドとの交差反応性は認められません。

＜測定原理＞

本アッセイ系は特異性の高いウサギ抗マウスC-ペプチド抗体を用いた競合法に、ビオチンと streptavidine の非常に高い親和性を利用した測定法です。

測定プレート(96 ウエル)の各ウエルには、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体が固定されています。この各ウエルにビオチン化標識抗原、標準品または検体およびウサギ抗マウスC-ペプチド特異抗体を順次加えて競合反応させます。

これに HRP(horse radish peroxidase)結合 SA(streptavidine)を加え、ウエル上に HRP 結合 SA-ビオチン化抗体複合体を形成させます。最後にこの複合体中の HRP 活性を測定することにより、検体中のマウスC-ペプチド濃度を求めることができます。有効測定範囲は 0.412～100ng/mL です。

III. キットの構成

試薬・器具	形状	規格	内容物
1. 測定プレート		96 ウエル プレート 1 枚	ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 固定化プレート
2. 標準品	凍結乾燥品	50ng	1 本 合成マウス C-ペプチド
3. 標識抗原	凍結乾燥品		1 本 ビオチン化マウス C-ペプチド
4. 特異抗体	液状	6 mL	1 本 ウサギ抗マウス C-ペプチド抗体
5. SA-HRP 溶液	液状	12 mL	1 本 トリス塩酸緩衝液に溶解した HRP 結合 SA
6. 酵素基質液	液状	12 mL	1 本 3,3'5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB)
7. 緩衝液	液状	25 mL	1 本 非特異的反応除去剤を含む トリス塩酸/食塩緩衝液
8. 酵素反応停止液	液状	12 mL	1 本 1M 硫酸溶液
9. 濃縮洗浄液	液状	25 mL	1 本 1% Tween 20 を含む 濃縮生理食塩液
10. プレート密閉用シール		3 枚	

IV. 操作法

測定を始める前に必ずお読みください。

(注意:キットに含まれるすべての試薬は室温に戻してから測定を始めてください。)

＜使用器具および装置＞

1. マイクロピペットおよびチップ(25 μ L～1 mL); 8 連または 12 連のマルチチャンネルピペットの使用を薦めます。
2. マイクロプレート用吸光度計(測定波長 450 nm で吸光度 2.5まで測定できる装置)。
3. 標準液の調製に使用するポリプロピレン製の試験管またはガラス試験管。
4. マイクロプレート洗浄装置、用手法の場合は連続分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプの使用を薦めます。
5. メスシリンダー(500 mL)。
6. 蒸留水または脱イオン水。

＜試薬の調製＞

1. 標準液の調製法:標準品の容器に緩衝液 0.5 mL を加え、内容物を充分溶解させ、100 ng/mL の標準液を作製する。この標準液 0.1 mL を取り、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 33.33 ng/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、11.11、3.704、1.235、0.412 ng/mL の各標準液を調製する。0 ng/mL の標準液は緩衝液そのまま使用する。
2. 標識抗原溶液の調製法:標識抗原の容器に緩衝液 8 mL を加え、内容物を充分溶解させてから使用する。
3. 洗浄液の調製法:25 mL (全量)を蒸留水または脱イオン水 475 mL にて希釈し使用する。
4. その他の試薬はそのまま測定操作に従って使用する。

＜測定操作＞

1. キット内容を室温(20～30°C)に戻す。
標準液、標識抗原溶液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. 各ウエルに洗浄液 350 μ L を加え、30 秒以上放置した後、アスピレーターによって吸引するかプレートを反転して液を除く。この操作を 3 回繰り返し、最後に反転したプレートを紙タオルなどに適当にたたきつけるようにして十分液を除く。
3. 各ウエルに標識抗原溶液 50 μ L を加え、ついで標準液または検体 25 μ Lを入れ、さらに特異抗体 50 μ L を加える。
4. 測定プレートをシールで密閉し、室温で 18～20 時間静置する。

5. 各ウエル中の液を除き、洗浄液 350 μL を満たした後、アスピレーターによって吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに適当にたたきつけるようにして十分液を除く。この操作をさらに 2 回繰り返し、合計 3 回の洗浄操作を行なう。
6. 各ウエルに SA-HRP 溶液 100 μL を加える。
7. 測定プレートをシールで密閉し、室温で 1 時間静置する。
8. 各ウエル中の液を除き 5)と同様の洗浄操作を 5 回行なう。
9. 各ウエルに酵素基質液 100 μL を加え、プレートをシールで密閉し、遮光の状態で室温で静置し、30 分間反応させる。
10. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μL を加える。
11. マイクロプレート用吸光度計にて 450 nm の吸光度を測定する。
12. マウス C-ペプチド 標準液の各濃度(6 ポイント)の測定値から標準曲線を作成し、検体の測定値を標準曲線に当てはめ、マウス C-ペプチド濃度を算出する。

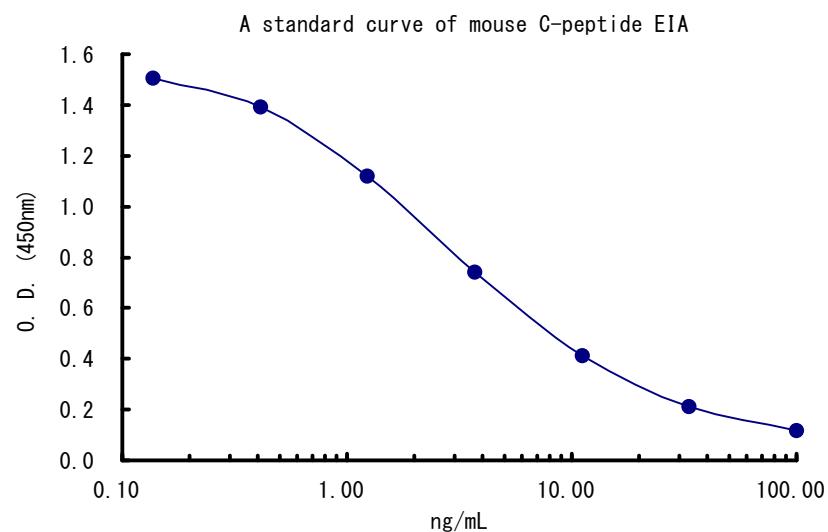
V. 操作上の注意

1. 血漿の場合 EDTA を入れた採血管で採取してください。血液検体は採血分離後直ちに測定して下さい。採血後直ちに測定出来ない場合血清もしくは血漿分離後、適切なサイズに小分けし、-30°C 以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。
2. 試薬は、用時調製(希釀)を原則としてください。
3. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釀調製時に溶解します。また、洗浄中ウエルにほこりなど異物が入らないように十分注意を払う必要があります。
4. 検体をウエルに注入する場合は、検体ごとにかならず新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。標準液を希釀するときは、希釀段階ごとにかならず新しいチップを使ってください。
5. 標準液、検体ともに測定は二重以上の測定で行なってください。
6. キットは分割使用が可能です。溶解された試薬残液(標準品および標識抗原)は-30°C にて凍結保存してください。なお、異なるロットのキットを組み合わせて使用しないでください。
7. 酵素基質の発色レベルは、反応温度、時間などでわずかながら影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定毎に作成してください。
8. 発色反応はかならずプレートを遮光して行なってください。
9. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行なってください。
10. 試薬の保存もしくは使用中は、強い光が当たらないように注意して下さい。

VI. 基本性能

＜測定範囲＞ 有効測定範囲 0.412ng/mL~100ng/mL

0.412ng/mL を下回る低値の検体であると予想されるような場合は、検出限度としてさらに 0.412ng/mL の標準液をさらに 3 倍希釈し 0.137ng/mL の標準液を設け検出限度を下げることができます。この場合、0.137ng/mL~0.412ng/mL の範囲での測定値の精度は上記有効測定範囲ほど精確ではありませんので、概算値として使用してください。



＜再現性＞

同時再現性 CV(%) 1.4~3.1

日差再現性 CV(%) 4.2~8.1

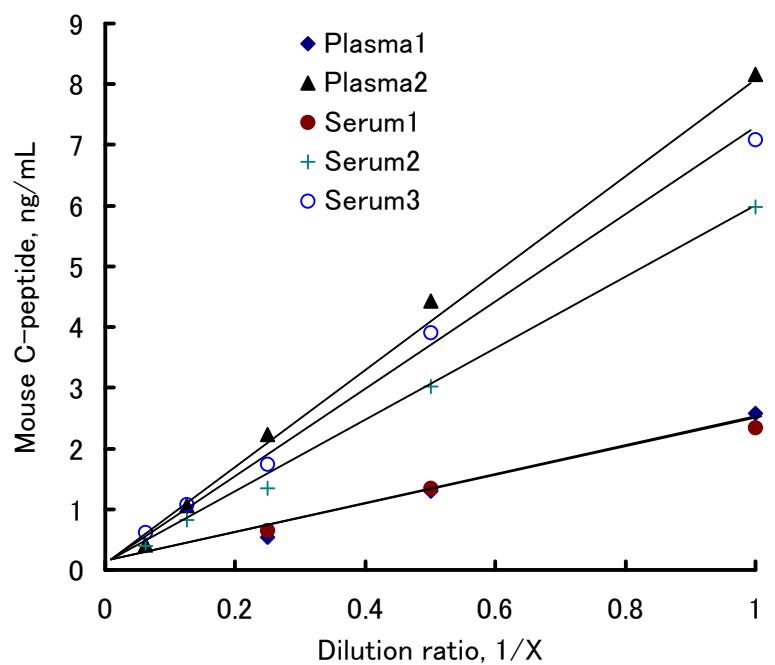
＜添加回収試験＞

マウス血漿 (n=4) 105.7~12.6%

マウス血清 (n=4) 98.4~107.4%

＜希釈試験＞

血清、血漿とも良好な希釈性を示しました。



VII. 貯蔵法および有効期間

＜貯蔵＞

遮光し、2~8°Cにて保存してください。

＜有効期間＞

製造日より20ヶ月（使用期限は外箱ラベル内に表示）

＜包装＞

1 キット 96 テスト分（標準曲線作成用を含む）

VIII. 文献

1. Wahren, J et al: C-peptide makes a comeback. *Diabetes Metab Res Rev*, 19 (5), 345-347, 2003
2. Pierson, CR et al: Proinsulin C-peptide replacement in type 1 diabetic BB/Wor-rats prevents deficits in nerve fiber regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62 (7), 765-79, 2003
3. Li, ZG et al: C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Diabetes Metab Res Rev*, 19 (5), 375-85, 2003
4. Johansson, J et al: Molecular effects of proinsulin C-peptide. *Biochem Biophys Res Comm*, 295, 1035-104, 2002
5. Lindon, H et al: C-peptide exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279 (4), 1453-1459, 2000
6. 松田万幸、岡 芳知:C-ペプチド(CPR)、日本臨床 57巻、1999年増刊号、広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査(4)、313-316、1999
7. Wentworth, BM et al: Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J Mol Evol*, 23 (4), 305-312, 1986

お問い合わせ先:

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770 TEL: 0544-22-2771

<http://www.yanaihara.co.jp> ask@yanaihara.co.jp

2006年11月15日作成

2011年6月20日改訂