



人と科学のステキな未来へ
コスモ・バイオ株式会社

研究用試薬

YK091 Glucagon-HS ELISA

取扱説明書

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉 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
II. 特 徴	2~3
III. キットの構成	3
IV. 操作法	4~5
V. 操作上の注意	5~6
VI. 基本性能	6~11
VII. 貯蔵法および有効期間	11
VIII. 文献	12



YK091 Glucagon-HS ELISA キット

I. はじめに

グルカゴンは、膵ランゲルハンス島の α 細胞から分泌される 29 アミノ酸からなるペプチドホルモンです。グルカゴンの主な生理作用は、肝臓に作用しグリコーゲンをグルコースへ分解し血糖値を上昇させ、インスリンとともに血糖値を一定に保つ作用をする重要なホルモンです。

本キットは、グルカゴンの N 末端認識モノクローナル抗体と C 末端認識モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA で、グリセンチン、オキシントモジュリン、GLP-1、GLP-2 などのグルカゴン関連ペプチドとの交差反応性をほとんど認めません。

YK091 Glucagon-HS ELISA キット

- | | |
|--|-------------------------------------|
| ▼ Glucagon 測定用です。 | 内容 |
| ▼ 2.2~143.6 pmol/L の範囲で測定できます（感度 0.3 pmol/L）。 | 1) 測定プレート |
| ▼ 40 検体を duplicate で測定できます。 | 2) 標準品 |
| ▼ 測定は約 18~20 hr. + 0.5 hr. で終了します。 | 3) 標識特異抗体液 |
| ▼ 血清、血漿および培養液の測定ができます。 | 4) 酵素基質液 |
| ▼ 検体量は 10 μ L です。 | 5) 酵素反応停止液 |
| ▼ プレートは 1 列（8 ウエル）毎に取り外しできます
のでキットの分割使用が可能です。 | 6) 緩衝液
7) 濃縮洗浄液
8) プレート密閉用シール |

保存と安定性 2~8°Cで保存してください。
製造日より 12 ヶ月間は安定です。

II. 特 徴

本キットはマウス、ラットおよびヒトの血清、血漿および培養液中に含まれる Glucagon 濃度を測定するためのものです。本キットによる Glucagon の測定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を備えています。なお、添付の標準品 Glucagon は高純度の合成品であり、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 Glucagon に特異的であり、グリセンチン、オキシントモジュリン、GLP-1、GLP-2 に対する交差反応性をほとんど認めません。

<測定原理>

本キットによる測定はサンドイッチ法に基づいて行います。測定プレート（96 ウエル）の各ウエルにはマウス抗 Glucagon C 末端特異的モノクローナル抗体が固定化されています。この各ウエルに標準液または検体を入れ、同時に HRP 標識化マウス抗 Glucagon N 末端特異的抗体を反応させ、サンドイッチ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 Glucagon を特異的に測定することができます。

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1枚 プレート	マウス抗 Glucagon モノクローナル抗体
2.標準品	凍結乾燥品	0.287pmol	1 本 合成 Glucagon
3.標識特異抗体液	液状	12 mL	1 本 HRP 標識マウス抗 Glucagon モノクローナル抗体
4.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)
5.酵素反応停止液	液状	12 mL	1 本 1M 硫酸溶液
6.緩衝液	液状	12 mL	1 本 反応促進試薬を含む緩衝液
7.濃縮洗浄液	液状	50 mL	1 本 1% Tween 20 を含む濃縮生理食塩液
8.プレート密閉用シール			2 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>

- マイクロピペットおよびチップ（ $10 \mu\text{L} \sim 1 \text{ mL}$ ）；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
- マイクロプレート用吸光度計（測定波長 450 nm で吸光度 3.0 まで測定できる装置）
- 標準液の調製に使用するガラス試験管
- マイクロプレート洗浄装置、用手法の場合は連續分注器、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
- メスシリンダー（1000 mL）
- 蒸留水または脱イオン水

<試薬の調製>

- 標準液の調製法：標準品の容器に緩衝液 1 mL を加え約 5 分静置後、内容物をよく攪拌し溶解させ、287 pmol/L の標準液を調製する。この標準液 0.2 mL をとり、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 143.6 pmol/L の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、71.8, 35.9, 17.9, 9.0, 4.5, 2.2 pmol/L の各標準液を調製する。0 pmol/L の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
<測定範囲>有効測定範囲 2.2 pmol/L ~ 143.6 pmol/L (7.8 pg/mL ~ 500 pg/mL)
- 洗浄液の調製法：濃縮洗浄液 50 mL (全量) を蒸留水 950 mL にて希釈し使用する。
- 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>

- キット内容を室温（20~30°C）に戻す。
標準液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
- 各ウエルに、洗浄液 350 μL を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに 2 回繰り返し、合計 3 回の洗浄操作を行う。
- 各ウエルに標準液 (0, 2.2, 4.5, 9.0, 17.9, 35.9, 71.8, 143.6 pmol/L) または検体 10 μL を入れ、ついで標識特異抗体液 100 μL を加える。
- 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、4°C で 18~20 時間静置する。



5. 必要量の酵素基質液を使用する約 1 時間前に分取し、遮光しながら室温に戻す。
6. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 6 回行う。
7. 各ウエルに酵素基質液 100 μL を加え、遮光の状態で室温で静置し 30 分間反応させる。
8. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μL を加える。
9. マイクロプレート用吸光度計にて 450 nm/620 nm の吸光度を測定する。
10. 市販のソフトウェアを用いて、5 (or 4) –Parameter の回帰式を使用し、Glucagon 標準液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、検体の Glucagon 濃度を求める。両対数方眼紙を用いる場合は、横軸に標準液の濃度を、縦軸に標準液各濃度の吸光度をプロットし、標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、Glucagon の濃度を読み取る。

V. 操作上の注意

1. 血液は、血清の場合は凝固後遠心分離し上清を採取してください。血漿の場合は EDTA-2Na 添加採血管（血液に対して最終濃度 1mg/mL）で採取してください。なお、アプロチニンを添加する場合は、血液に対して最終濃度 500KIU/mL を加えてください（ただし、血清を調製する場合は、血清を分離採取した後添加してください）。また、DPP-4 inhibitor を添加する場合は、血液に対して 0.01mL/mL を加えてください。真空採血管には、BDTM P800 GLP-1, GIP, Glucagon, Ghrelin 保存用真空採血管（日本ベクトン・ディッキンソン）も使用できます。直ちに測定できない場合は適宜小分けして、-80°C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. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品は調製後、直ちに使用してください。なお、キットを分割使用する場合、調製後の標準品は適宜小分けして、-80°Cで凍結保存してください（約 1 ヶ月は安定です）。
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。
4. 各ウエルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行ってください。また検体をウエルに注入する場合は、検体ごとに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、希釀段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。
5. 143.6 pmol/L を超える高値検体の場合は、検体を本キット添付の緩衝液にて希釀して測定してください。
6. 測定はすべて 2 重測定で行ってください。
7. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
8. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度などでわずか

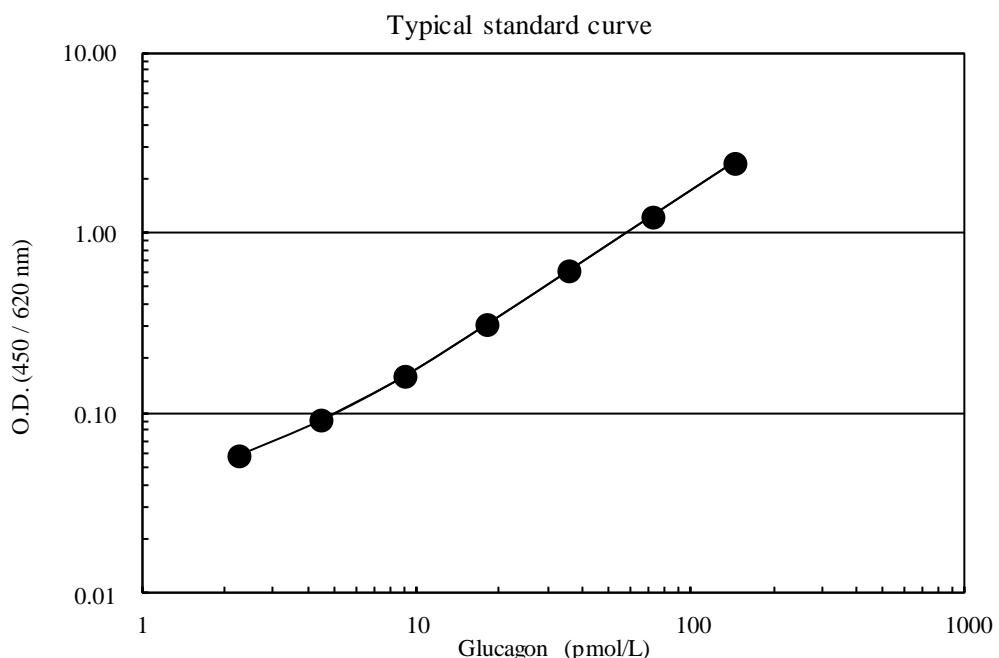


ですが影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごとに作成してください。

9. 各試薬の保存中もしくは使用中には、これらに強い光が当たらないように注意してください。
10. 本法による測定には、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。
11. 酵素基質液は遮光しながら室温に戻し、使用してください。
12. 標識特異抗体液中にまれにわずかな浮遊物が見られることがありますが、性能上問題ありません。室温に戻した後、使用前に軽く攪拌してください。

VI. 基本性能

<標準曲線の一例>



<添加回収試験>

<ヒト血清 A>

Added Glucagon (pmol/L)	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	Recovery (%)
0	10.80		
2.9	14.05	13.67	102.8
14.4	25.67	25.16	102.0
57.4	68.39	68.22	100.2



<ヒト血清 B>

Added Glucagon (pmol/L)	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	Recovery (%)
0	4.31		
2.9	6.89	7.18	95.9
14.4	18.62	18.67	99.8
57.4	57.71	61.73	93.5

<ヒト血漿 A>

Added Glucagon (pmol/L)	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	Recovery (%)
0	12.51		
2.9	16.04	15.38	104.3
14.4	26.89	26.87	100.1
57.4	68.83	69.93	98.4

<ヒト血漿 B>

Added Glucagon (pmol/L)	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	Recovery (%)
0	10.97		
2.9	14.21	13.84	102.7
14.4	23.95	25.33	94.6
57.4	62.38	68.39	91.2

<マウス血清 A>

Added Glucagon (pmol/L)	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	Recovery (%)
0	8.11		
2.9	10.92	10.98	99.4
14.4	20.48	22.47	91.2
57.4	53.75	65.53	82.0

<マウス血清 B>

Added Glucagon (pmol/L)	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	Recovery (%)
0	5.60		
2.9	8.17	8.47	96.4
14.4	18.10	19.96	90.7
57.4	54.54	63.02	86.5



<マウス血漿 A>

Added Glucagon (pmol/L)	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	Recovery (%)
0	18.24		
2.9	21.82	21.11	103.4
14.4	31.64	32.60	97.1
57.4	65.06	75.66	86.0

<マウス血漿 B>

Added Glucagon (pmol/L)	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	Recovery (%)
0	6.55		
2.9	9.13	9.42	96.9
14.4	18.71	20.91	89.5
57.4	54.69	63.97	85.5

<ラット血清 A>

Added Glucagon (pmol/L)	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	Recovery (%)
0	6.46		
2.9	8.86	9.33	94.9
14.4	20.08	20.82	96.5
57.4	56.71	63.88	88.8

<ラット血清 B>

Added Glucagon (pmol/L)	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	Recovery (%)
0	5.46		
2.9	8.12	8.33	97.5
14.4	19.57	19.82	98.8
57.4	50.75	62.88	80.7

<ラット血漿 A>

Added Glucagon (pmol/L)	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	Recovery (%)
0	18.73		
2.9	22.10	21.60	102.3
14.4	34.36	33.09	103.8
57.4	69.72	76.15	91.6

<ラット血漿 B>

Added Glucagon (pmol/L)	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	Recovery (%)
0	13.25		
2.9	16.32	16.12	101.2
14.4	27.61	27.61	100.0
57.4	69.51	70.67	98.4



<希釈試験>

<ヒト血清 A>

Sample dilution	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	% of Expected (%)
X1	11.51	11.51	
X2	5.66	5.76	98.4
X4	2.68	2.88	93.2

<ヒト血清 B>

Sample dilution	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	% of Expected (%)
X1	12.14	12.14	
X2	6.23	6.07	102.6
X4	2.91	3.04	95.9

<ヒト血漿 A>

Sample dilution	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	% of Expected (%)
X1	15.94	15.94	
X2	8.19	7.97	102.7
X4	4.11	3.99	103.1

<ヒト血漿 B>

Sample dilution	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	% of Expected (%)
X1	14.93	14.93	
X2	7.35	7.47	98.5
X4	3.63	3.73	97.2

<マウス血清 A>

Sample dilution	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	% of Expected (%)
X1	8.60	8.60	
X2	5.01	4.30	116.5
X4	2.39	2.15	111.1
X8	0.90	1.07	83.9

<マウス血清 B>

Sample dilution	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	% of Expected (%)
X1	6.46	6.46	
X2	3.48	3.23	107.7
X4	1.53	1.62	94.7



<マウス血漿 A>

Sample dilution	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	% of Expected (%)
X1	8.38	8.38	
X2	4.22	4.19	100.9
X4	1.85	2.09	88.1

<マウス血漿 B>

Sample dilution	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	% of Expected (%)
X1	14.70	14.70	
X2	8.38	7.35	113.9
X4	4.22	3.68	114.8
X8	1.83	1.84	99.3

<ラット血清 A>

Sample dilution	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	% of Expected (%)
X1	10.26	10.26	
X2	6.00	5.13	116.9
X4	2.79	2.57	108.6
X8	1.30	1.28	101.3

<ラット血清 B>

Sample dilution	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	% of Expected (%)
X1	10.37	10.37	
X2	5.89	5.18	113.6
X4	2.78	2.59	107.3
X8	1.20	1.30	92.8

<ラット血漿 A>

Sample dilution	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	% of Expected (%)
X1	24.69	24.69	
X2	12.26	12.35	99.3
X4	5.97	6.17	96.7
X8	2.88	3.09	93.2

<ラット血漿 B>

Sample dilution	Observed (pmol/L)	Expected (pmol/L)	% of Expected (%)
X1	17.37	17.37	
X2	9.12	8.69	104.9
X4	4.34	4.34	100.0
X8	2.11	2.17	97.0



<交差反応性>

関連ペプチド	交差反応性 (%)
Glicentin (Human)	0.68
Glicentin (Rat)	0.96
Glicentin (Mouse)	0.97
Oxyntomodulin (Human, Rat, Mouse)	0.64
Mini-glucagon	not detected
GLP-1 (7-36) NH ₂ (Human, Rat, Mouse)	not detected
GLP-1 (9-36) NH ₂ (Human, Rat, Mouse)	not detected
GLP-2 (Human)	not detected
GLP-2 (Rat)	not detected
GLP-2 (Mouse)	not detected
GIP (Human)	not detected
GIP (Rat)	not detected
GIP (Mouse)	not detected

<再現性試験>

同時再現性：血清（ヒト、ラット、マウス） CV(%) 1.8～3.5

同時再現性：血漿（ヒト、ラット、マウス） CV(%) 2.1～4.6

日差再現性：血清（ヒト、ラット、マウス） CV(%) 3.5～9.1

日差再現性：血漿（ヒト、ラット、マウス） CV(%) 3.4～7.1

<測定範囲>

2.2 ~ 143.6 pmol/L (7.8 ~ 500 pg/mL)

<感度（検出限界）>

0.3 pmol/L (1.08 pg/mL)

VII. 貯蔵法および有効期間

<貯法>

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 12 ヶ月間（使用期限は外箱に表示）

<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. Unger, R.H., Eisentraut, A.M., McCall, M.S., Keller, S., Lanz, H.C. and Madison, L.L. (1959): Glucagon antibodies and their use for immunoassay for glucagon. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **102**:621 – 623
2. Unger, R.H., Eisentraut, A.M., McCall, M.S. and Madison, L.L. (1961): Glucagon antibodies and an immunoassay for glucagon. *J. Clin. Invest.*, **40**: 1280–1289
3. Nishino, T., Kodaira, T., Shin, S., Imagawa, K., Shima, K., Kumahara, Y., Yanaihara, C. and Yanaihara, N. (1981) : Glucagon radioimmunoassay with use of antiserum to glucagon C-terminal fragment. *Clin. Chem.*, **27**: 1690–1697
4. Jaspan, J.B., and Rubenstein, A.H. (1977) : Circulating glucagon : Plasma profiles and metabolism in health and disease. *Diabetes.*, **26**: 887–902
5. 奥野儀一、大根田昭、島健二 編 (1993) 「グルカゴン関連ペプチド」 pp. 52 – 65. 医歯薬出版、東京

<お問合せ先>

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉 2480-1

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

www.yanaihara.co.jp ask@yanaihara.co.jp

2018年2月2日作成