



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

研究用試薬

YK111 Rat Glicentin 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	3
III.	キットの構成	4
IV.	操作法	5~6
V.	操作上の注意	7
VI.	基本性能	8
VII.	貯蔵法および有効期間	9
VIII.	文 献	9

YK111: Rat Glicentin EIA キット

I. はじめに

小腸に存在するglucagon-like immunoreactivity (GLI)の分離、精製過程で、GLIの約40%を占める69 アミノ酸残基からなるグリセンチンが単離されました。このグリセンチン分子には、グルカゴンの全アミノ酸配列が含まれ、そのグルカゴン配列のC末端に6 アミノ酸残基が、一方、そのN末端に30 アミノ酸残基が、それぞれ塩基アミノ酸対(-Lys-Arg-)配列を介して連結しています。その後、遺伝子構造解析法の発展により、各種動物由来のグルカゴン前駆体の全アミノ酸配列が明らかにされましたが、いずれも小腸抽出物から単離されたグリセンチンに相当するアミノ酸配列をそのN端部に含んでおり、膵グルカゴンとそれより大分子型の腸管グルカゴン(GLI)は同一構造の前駆体に由来し、そのプロセッシングの相違により生成することが明らかにされました。さらにそのプロセッシングの違いにより、膵と腸管で異なる分子量のグルカゴン関連ペプチドが生成されることが分かりました。膵では主としてグルカゴンが生成されますが、腸ではグリセンチンのほか、GLP-1 やGLP-2 の生成が知られています。

矢内原研究所では同じ前駆体に由来する膵および腸管グルカゴン関連物質のすべてを網羅し、それらを分別測定できる一連のキットの開発に取り組んでいますが、既にグルカゴン、GLP-1、GLP-2 の測定キットの確立に成功し販売しています。このたびはラットグリセンチン測定系の開発を進めた結果、簡便で、特異性、定量性に優れたアッセイ系を確立することができました。

YK111 Rat Glicentin EIA キット

ラットグリセンチン測定用です。

0.206～50 pmol/mL の範囲で測定できます。

▼ 測定は 16～18 時間と 1.5 時間で終了します。

▼ 41 検体を duplicate で測定できます。

▼ 血漿サンプルの測定ができます。

▼ プレートは 1 列(8 ウェル)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。

▼ 同時再現性

ラット血漿 CV(%) 4.56→7.82

▼ 日差再現性

ラット血漿 CV(%) 3.16→5.59

保存と安定性 2～8℃で保存してください。

製造日より12ヶ月間は安定です。

内容

1) 測定プレート

2) 標準品

3) 標識抗原

4) 特異抗体

5) SA-HRP 溶液

6) 基質溶解液

7) OPD 錠

8) 酵素反応停止液

9) 緩衝液

10) 濃縮洗浄液

11) プレート密閉用シール

II. 特 徴

本キットはラット血漿中に含まれるグリセンチンを定量的に測定します。本キットによるラットグリセンチン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の多くの利点を備えています。なお、添付の標準 Rat Glicentinは矢内原研究所において作製した高純度の合成品であり、表示の重量は絶対量を示しています。

< 特異性 >

本キットはラットグリセンチンに特異的であり、ラット、マウスおよびヒト GLP-1、ラット GLP-2、ヒトグリセンチン並びにラット、マウスおよびヒトグルカゴンとの交差反応性は認めません。

< 測定原理 >

本アッセイ系は特異性の高いウサギ抗 Rat Glicentin 抗体(ポリクローナル抗体)を用いた競合法に、ビオチンとstreptavidinの高い親和性を利用した測定法です。測定プレート(96 ウェル)の各ウェルにはヤギ抗ウサギ IgG 抗体が固定化されており、この各ウェルに標準 Rat Glicentin(または検体)、ビオチン化 Rat Glicentin 及び上記ポリクローナル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streptavidinを加え、ウェル上に HRP 結合streptavidin-ビオチン化抗原-抗体複合体を形成させます。最後にこの複合体中の酵素(HRP)活性を測定することにより、検体中のラットグリセンチン濃度を求めることができます。測定範囲は、0.206 ～ 50 pmol/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 ウェルプレート 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	50 pmol	1 本	合成 Rat Glicentin
3. 標識抗原	凍結乾燥品		1 本	ビオチン化 Rat Glicentin
4. 特異抗体	液状	6 mL	1 本	ウサギ抗 Rat Glicentin 抗体
5. SA-HRP 溶液	液状	12 mL	1 本	安定剤を含むトリス塩酸緩衝 液に溶解した HRP 結合スト レプトアビジン
6. 基質溶解液	液状	26 mL	1 本	0.015% 過酸化水素を含む 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.0)
7. OPD 錠	錠剤		2 錠	o-フェニレンジアミン
8. 酵素反応停止液	液状	12 mL	1 本	1M 硫酸溶液
9. 緩衝液	液状	10 mL	1 本	非特異的反応除去剤を含む リン酸緩衝液
10. 濃縮洗浄液	液状	50 mL	1 本	1% Tween 20 を含む 濃縮生理食塩液
11. 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 \sim 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 492 nm で吸光度 2.5 まで測定できる装置)
3. マイクロプレート用振とう機またはシェーカー
4. 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
5. 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
6. メスシリンダー(1000 mL)
7. 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 1 mL を加え内容物を溶解させ、50 pmol/mL の標準液を作製する。この標準液 0.1 mL をとり、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 16.67 pmol/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、50、16.67、5.556、1.852、0.617、0.206 pmol/mL の各標準液を調製する。0 pmol/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
2. 標識抗原溶液の調製法:標識抗原の容器に蒸留水 8 mL を加え内容物を溶解させ使用する。
3. 発色剤溶液の調製法:使用直前に基質溶解液 12 mL 全量に OPD 錠 1 錠を加え溶解させ使用する。
4. 洗浄液の調製法:50 mL (全量)を蒸留水 950 mL にて希釈し使用する。
5. 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 \sim 30 $^{\circ}$ 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. 各ウェルに標識抗原溶液 70 μ L を入れ、ついで標準液または検体 30 μ L を加え、さらに特異抗体 50 μ L を加える。
3. 測定プレートをシールし、室温で 16 \sim 18 時間振とうする。

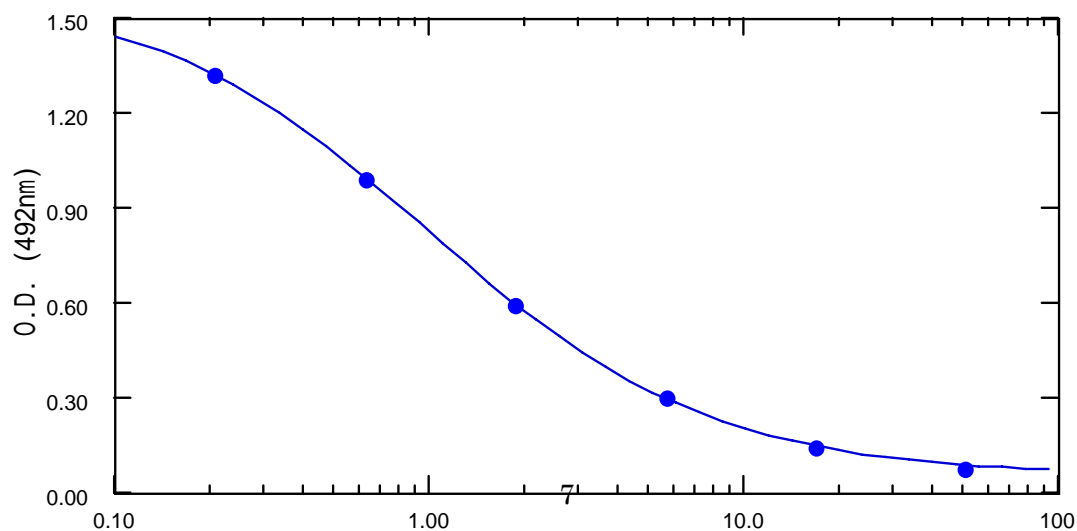
4. 各ウェル中の液を除き、洗浄液 350 μL を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに 3 回繰り返し、合計 4 回の洗浄操作を行なう。
5. 各ウェルに SA-HRP 溶液 100 μL を加える。
6. 測定プレートをシールし、室温で 1 時間振とうする。
7. 6.の反応終了直前に OPD 錠を基質溶解液で溶解し、発色剤溶液を調製する。
8. 各ウェル中の液を除き 4)と同様の洗浄操作を 5 回行なう。
9. 各ウェルに発色剤溶液 100 μL を加え、室温で 30 分間反応させる。
- 10.各ウェ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 492 nm の吸光度を測定する。
Rat Glicentin 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、ラットグリセンチン濃度を算出する。

V. 操作上の注意

1. 血液検体はただちに測定して下さい。採血後ただちに測定出来ない場合は血漿分離後、最初に小分けして -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、この沈殿は希釈調製時に溶解します。

4. 各ウェ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なってください。
また検体をウェルに注入する場合は、各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。標準液を希釈するときは、希釈段階ごとにならず新しいチップを使ってください。
5. 50 pmol/mL 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釈して測定してください。
6. 室温で反応中は必ずマイクロプレート用振とう器を用い振とうしてください(呈色反応は除く。)。なお振とうはプレート密閉用シールに反応液がはねないようにゆっくりと行なってください。
7. 測定はすべて2重測定で行なってください。
8. 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。
9. 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。
10. 各試薬の保存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。
11. 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。

VI. 基本性能



Rat Glicentin (pmol/mL)

< 添加回収試験 >

< ラット血漿A >

Added Glicentin pmol/mL	Observed pmol/mL	Expected pmol/mL	Recovery (%)
10.0	10.24	10.70	95.72
5.0	5.37	5.70	94.25
2.5	3.28	3.20	102.36
0.0	0.70		

< ラット血漿B >

Added Glicentin pmol/mL	Observed pmol/mL	Expected pmol/mL	Recovery (%)
10.0	9.20	10.85	84.80
5.0	5.51	5.85	94.13
2.5	3.09	3.35	92.34
0.0	0.85		

< 再現性試験 >

同時再現性

ラット血漿 CV(%) 4.56→7.82

日差再現性

ラット血漿 CV(%) 3.16→7.59

VII. 貯蔵法および有効期間

< 貯法 >

遮光し、2-8℃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. Ohneda, A. et al. : Effect of glicentin-related peptides on glucagon secretion in anaesthetized dogs. DIABETOLOGIA 29: 397-401, 1986
2. Ohneda, A. et al. : Effect of intraluminal administration of amino acids upon plasma glicentin. DIABETES RESEARCH AND CLINICAL PRACTICE 5: 265-270, 1988
3. Ohneda, A. et al.: Insulinotropic action of human glicentin in dogs. METABOLISM, CLINICAL AND EXPERIMENTAL 44: 47-51, 1995
4. Ishihara, S. et al. : Helicobacter pylori infection accelerates gene expression of glicentin in gastric mucosa. DIABETES 32: 460-464, 1997
5. Shibata, C. et al. : Effect of glucagon, glicentin, glucagon-like peptide-1 and -2 on interdigestive gastroduodenal motility in dogs with a vagally denervated gastric pouch. SCANDINAVIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 36: 1049-1055, 2001

<お問合せ先>

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

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

2005 年 9 月 27 日改訂