

研究用試薬

YK270 Human GH(1-43) 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

・ はじめに	2
・ 特 徴	3
・ キットの構成	4
・ 操作法	5～6
・ 操作上の注意	7
・ 基本性能	8～9
・ 貯蔵法および有効期間	10
・ 文献	10

YK270 Human GH(1-43) ELISA キット

はじめに

ヒト成長ホルモン(GH)は脳下垂体より分泌され、成長および代謝のコントロールに作用し、睡眠時の他に運動などの刺激によっても血中濃度が上昇する事が知られています。ヒト GH にはいくつかのアイソフォームが存在し、各アイソフォームはその分子量によって 22kDa、20kDa、27kDa、5kDa、17kDa 等と表記され、中にはヒト GH の作用とは全く異なる作用を示すアイソフォームも存在します。

ヒト GH(1-43)は、これらアイソフォームの中でほぼ 9 割を占める分子量 22kDa であるヒト GH(1-191)の分解によって、ヒト GH(44-191)とともに生成されるのではないかと推測されているフラグメントで、これら 2 つのフラグメント、分子量 5kDa のヒト GH(1-43)および分子量 17kDa のヒト GH(44-191)は、それぞれ異なる生理的作用を示すとの報告がされています。

このうちヒト GH(1-43)は *in-vivo* においてインスリン様活性を持つ事が示唆されています。ヒト GH(1-43)の高感度測定 ELISA キットは、グルコース恒常性と関連を持つとされるヒト GH(1-43)の生体内における生成過程を知る上で、有用な手段であると考えられます。

YK270 Human GH(1-43) ELISA キット

ヒト GH(1-43)測定用です。
0.156 ~ 10 ng/mL の範囲で測定できます。
測定は 3+2+1 時間+30 分で終了します。
40 検体を duplicate でアッセイできます。
血漿サンプルの測定が可能です。
検体量は 20 μ L です。
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。
同時再現性 CV(%) 2.73-6.32
日差再現性 CV(%) 5.51-9.83

保存と安定性

2 ~ 8 で保存してください。
製造日より 3 ヶ月間は安定です。

- 1) 測定プレート
- 2) 標準品
- 3) 標識特異抗体溶液
- 4) SA-HRP 溶液
- 5) 基質溶解液
- 6) OPD 錠
- 7) 酵素反応停止液
- 8) 緩衝液
- 9) 濃縮洗浄液
- 10) プレート密閉用シール

． 特 徴

本キットはヒト血漿に含まれるヒト GH(1-43)を定量的に測定するものです。本キットによるヒト GH(1-43)の測定は簡便で、しかも特異性、定量性にすぐれ、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。

<特異性>

本キットにおけるヒト GH(1-191)との交差反応性は 0.1% 以下です。

<測定原理>

本キットによるヒト GH(1-43)の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）の各ウエルにはウサギ抗ヒト GH(1-43)ポリ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、抗原抗体複合体を形成させ、さらにビオチン化ウサギ抗ヒト GH(1-43)ポリクローナル抗体と反応させ、サンドイッチ複合体を形成させます。その複合体に HRP 結合ストレプトアビジンを反応させます。最後にこの複合体中の HRP 活性を測定することにより、検体中のヒト GH(1-43)濃度を求めることができます。

． キットの構成

試薬・器具	形状	規格	内容物
1) 測定プレート		1 枚(96 ウエル)	ウサギ抗ヒト GH(1-43)抗体 固定化プレート
2) 標準品	凍結乾燥品	1 本(10ng)	ヒト GH(1-43)
3) 標識特異抗体溶液	液状	1 本(11mL)	ビオチン化ウサギ抗ヒト GH(1-43)抗体および非特異 的反応除去剤を含むリン酸 緩衝液
4) SA-HRP 溶液	液状	1 本(11mL)	HRP 標識ストレプトアビ ジンおよび非特異的反応 除去剤を含むリン酸緩衝液
5) 基質溶解液	液状	1 本(26mL)	0.015% 過酸化水素を含む リン酸ナトリウム-クエン 酸緩衝液
6) OPD 錠	錠剤	2 錠	o-フェニレンジアミン
7) 酵素反応停止液	液状	1 本(11mL)	1M H ₂ SO ₄
8) 緩衝液	液状	1 本(30mL)	非特異的反応除去剤を含む リン酸緩衝液
9) 濃縮洗浄液	液状	1 本(50mL)	1% Tween 20 を含む 濃縮生理食塩液
10) プレート密閉用シール		4 枚	

． 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もど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(20 ~ 1,000 μ L) ; 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 490nm 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ガラス製の試験管
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(1,000mL)
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 に緩衝液を 1mL 加え内容物を溶解させ、10ng/mL の標準液を調製する。この標準液から 0.2mL をとり、これを緩衝液 0.2mL で希釈し、5ng/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、2.5、1.25、0.63、0.31、0.16ng/mL の各標準液を調製する。0ng/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
2. 発色剤溶液の調製法：SA-HRP 反応終了直前に基質溶解液 12mL に OPD 錠 1 錠を加え溶解させ使用する。
3. 洗浄液の調製法：濃縮洗浄液 50mL(全量)を 950mL の蒸留水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 >

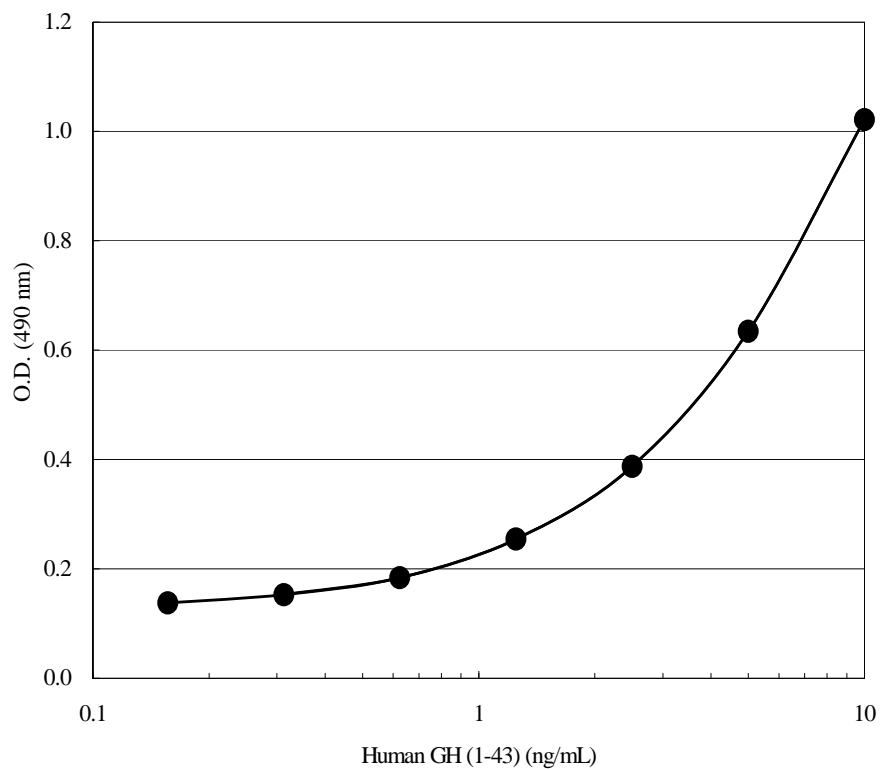
1. キット内容を室温（20～30℃）に戻す。
標準液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. 各ウエルに、洗浄液 300μL を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに 2 回繰り返し、合計 3 回の洗浄操作を行う。
3. 各ウエルに緩衝液 200μL を入れ、ついで標準液または検体 20μL を加える。標準液の分注を始めてから検体の分注を終えるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください(30 分以内)。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 3 時間振とうする（約 100rpm）。
5. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 4 回行う。
6. 各ウエルに標識特異抗体溶液 100μL を加える。標識特異抗体溶液は浮遊物質が生じることがありますので、使用前に転倒攪拌で充分攪拌を行ってください。
7. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 2 時間振とうする（約 100rpm）。
8. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 4 回行う。
9. 各ウエルに SA-HRP 溶液 100μL を加える。
10. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 1 時間振とうする（約 100rpm）。
11. 10) の反応終了直前に OPD 錠 1 錠を基質溶解液 12mL に加え溶解し、発色剤溶液を調製する。
12. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を 5 回行う。
13. 各ウエルに上記調製した発色剤溶液 100μL を入れ、室温で静置し 30 分間反応させる。
14. 各ウエルに酵素反応停止液 100μL を入れる。
15. マイクロプレート用吸光度計で 490nm の吸光度を測定する。
16. 市販のソフトウェアを用いて、4 (or 5) - Parameter、もしくは Log-Logit の回帰式を使用し、ヒト GH(1-43)標準液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、検体のヒト GH(1-43)濃度を求める。片対数方眼紙を用いる場合は、横軸（Log 側）に標準液の濃度を、縦軸(Linear 側)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、ヒト GH(1-43)の濃度を読み取る。

． 操作上の注意

1. 血液検体は採取後、血漿を分離し、直ちに測定してください。直ちに測定できない場合は血漿を適宜小分けして、 -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。血液は EDTA-2Na (1mg/mL) 添加採血管で採取してください。
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。キットを分割使用する場合、溶解後の標準品の保存にはガラス製の容器(バイアル瓶等)をお使いください。分割使用の際は 10ng/mL の標準液から新たに希釈調製を行ってください。溶解後の標準品 (10ng/mL) は 4 週間の冷蔵保存および -30°C 以下の凍結保存で約 4 週間安定です。
3. 標準液の分注を始めてから検体の分注を終えるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください(30 分以内)。
4. 標識特異抗体溶液は浮遊物質を生じることがありますので、使用前に転倒攪拌により充分攪拌を行ってください。なお浮遊物質による測定系への影響はございません。
5. 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。
6. 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。標準液を希釈するときは、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。
7. 10ng/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。
8. 室温での反応には必ずマイクロプレート用振とう機を用い、測定プレートを振とうしてください(呈色反応の場合を除く)。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ってください(約 100rpm)。
9. 測定はすべて 2 重測定で行ってください。
10. 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。
11. 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。
12. 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。
13. 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使用しないでください。

． 基本性能

< 標準曲線の一例 >



< 添加回収試験 >

< ヒト血漿 A >

Added hGH(1-43) (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.39		
0.30	0.68	0.69	98.55
1.00	1.23	1.39	88.49
4.00	3.52	4.39	80.18

< ヒト血漿 B >

Added hGH(1-43) (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.14		
0.30	0.49	0.44	111.36
1.00	1.16	1.14	101.75
4.00	3.57	4.14	86.23

< ヒト血漿 C >

Added hGH(1-43) (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.96		
0.30	1.25	1.26	99.21
1.00	2.01	1.96	102.55
4.00	4.98	4.96	100.40

< ヒト血漿 D >

Added hGH(1-43) (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.57		
0.30	0.99	0.87	113.79
1.00	1.74	1.57	110.83
4.00	4.91	4.57	107.44

< 希釈試験 >

	Dilution ratio	Observed (ng/mL)	Estimated (ng/mL)	Recovery (%)
ヒト血漿 A	× 1.0	0.42		
	× 1.5	0.28	0.42	100.00
	× 2.0	0.22	0.44	104.76
ヒト血漿 B	× 1.0	1.10		
	× 1.5	0.78	1.17	106.36
	× 3.0	0.30	0.90	81.82
ヒト血漿 C	× 1.0	0.59		
	× 1.5	0.44	0.66	107.02
	× 3.0	0.21	0.63	102.33
ヒト血漿 D	× 1.0	0.55		
	× 1.5	0.50	0.75	136.36
	× 3.0	0.24	0.72	130.91

< 再現性試験 >

同時再現性：CV(%) 2.73 ~ 6.32

日差再現性：CV(%) 5.51 ~ 9.83

． 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 3 ヶ月

< 包装 >

1 キット 96 テスト分(標準曲線作成用を含む)

． 文献

1. Maren S. Fragala, Growth hormone: understanding the endocrinology and ergogenics (NSCA)
2. Jansson C, Boguszewski C, Rosberg S, Carlsson L, Albertsson-Wikland K. (1997) hormone (GH) assays: influence of standard preparations, GH isoforms, assay characteristics, and GH-binding protein. Clin Chem. 43(6 Pt 1):950-6.
3. Kraemer WJ, Nindl BC, Marx JO, Gotshalk LA, Bush JA, Welsch JR, Volek JS, Spiering BA, Maresh CM, Mastro AM, Hymer WC.(2006) Chronic resistance training in women potentiates growth hormone in vivo bioactivity: characterization of molecular mass variants. Am J Physiol Endocrinol Metab. 291(6):E1177-87. Epub 2006 Jul 11.
4. López-Guajardo CC, Armstrong LS, Jordan L, Staten NR, Krivi GG, Martinez AO, Haro LS. (1998) Generation, characterization and utilization of anti-human growth hormone 1-43, (hGH1-43), monoclonal antibodies in an ELISA. J Immunol Methods. 215(1-2):179-85.

< お問い合わせ先 >

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉 2480-1

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

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

2013 年 4 月 19 日作成