

一般研究用キット

# Glucose Cellular Uptake Measurement Kit (Broad Range, Fluorometric)

## グルコース細胞内取込量測定キット（広範囲、蛍光法）

Cat. No. MBR-PMG-K01

2019年12月19日作成

[www.cosmobio.co.jp](http://www.cosmobio.co.jp)

### 【1-1】背景と測定原理

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。

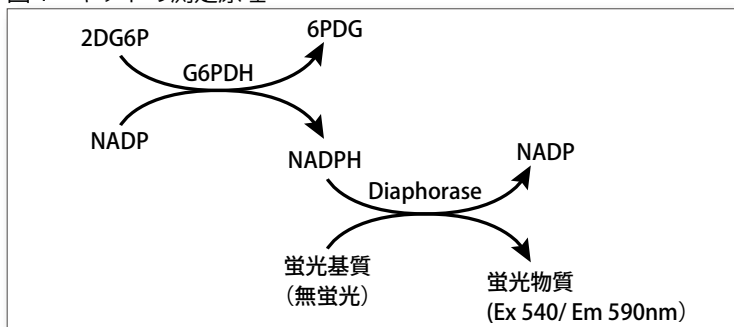
糖取込み量を測定するには、一般的に<sup>3</sup>Hなどで放射性ラベルした3-O-メチル-D-グルコースや2-デオキシグルコース(2DG)を用いる方法でおこなわれています。この方法では放射性同位体を使用するためRI管理区域内のみしか使用することができず、使用する上で厳しい制限があるため通常の実験室レベルでは使用することができません。

本キットは、安全性や規制の問題がないnon-RI法によって細胞内に取り込まれた糖取込み量を簡便に測定できるキットです。

細胞内に取り込まれた2DGは、ヘキソキナーゼによって2-デオキシグルコース-6-リン酸(2DG6P)にリン酸化されますが、次の酵素反応に進まずに細胞内に留まります。

本キットでは、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PDH)による酵素反応によって2DG6P量に比例してNADPHを産生し、さらにNADPHの酸化に伴って蛍光基質から生じる蛍光物質の蛍光強度を測定します。

図1 キットの測定原理



### 【1-2】キットの特長

	本キット	関連製品： 2-デオキシグルコース(2DG)代謝速度測定キット Cat.No. OKP-PMG-K01
測定方法	Non-RI法	Non-RI法
操作時間	3時間	5～7時間(2日間)
検出方法	蛍光(Ex 540nm/Em 590 nm)	発色(420 nm)
特徴	広範囲な測定範囲(0～50 μM)で迅速に測定できる。 ハイスループットアッセイにも対応可能な1ステップ法。	高感度(0～5 μM)で定量できる測定キット。

**【I-3】キット構成**

本製品は 100 検体を測定できます。

保存温度：-20℃

内容	容量	数量	取扱上の注意
反応基質液 ※ピンク色キャップ (Substrate buffer)	9 mL	3 本	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	500 μL	1 本	
検体希釈原液 (Sample Diluent Buffer Concentrate)	5 mL	1 本	
蛍光基質液 ※黄色キャップ (Fluorescent Substrate)	120 μL	1 本	
酵素溶液 ※緑色キャップ (Enzyme solution)	270 μL	1 本	

**ご準備いただくもの (その他必要なもの)**

- 超純水 (精製水)
- 蛍光プレートリーダー (励起波長 540 nm、蛍光波長 590 nm)
- 96 well ブラックプレート

**【II-1】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。
- 使用後の検体希釈原液は、-20℃に再凍結し保存してください。

**【II-2】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 μM 2DG6P から 50 μM 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。
- 使用後の 1 mM 2DG6P は、-20℃に再凍結し保存してください。

**【II-3】反応液の調製**

- 1 検体あたり反応液は 200 μL 使用します
- 10 検体分の反応液の調製は、下表のように添加し、溶液が均一になるように混合してください (用時調製、使用時まで遮光下で氷上保管)。

反応基質液 ※チューブのキャップはピンク色	2500 μL
酵素溶液 ※チューブのキャップは緑色	25 μL
蛍光基質液 ※チューブのキャップは黄色	10 μL

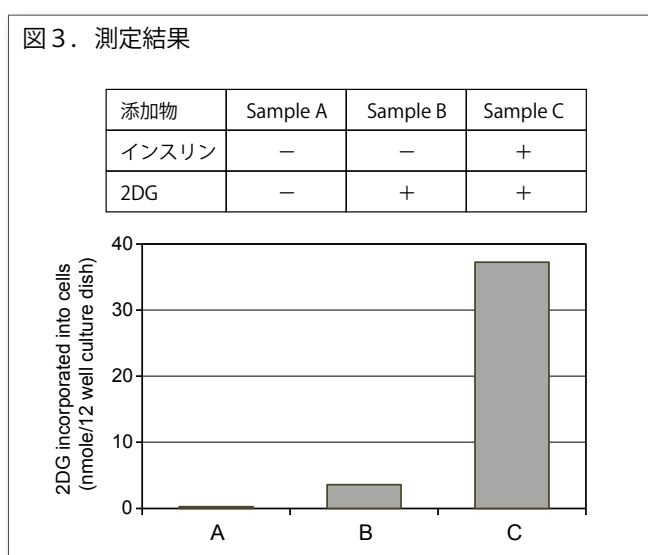
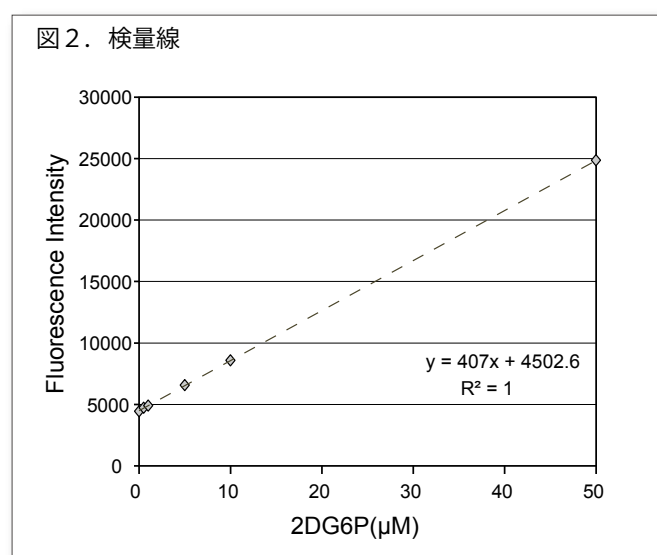
- 酵素溶液および蛍光基質液のチューブをあける前に、必ずフラッシュ遠心等で壁面に付着した溶液を落としてから使用下さい。
- 酵素溶液は 50%グリセロールが含まれているため、溶液に粘性があります。
- 使用後の反応基質液と酵素溶液、蛍光基質液は、-20℃に再凍結し保存してください。

### 【III-1】測定方法

- 1 96well ブラックプレートに試料または標準液 20  $\mu$ L に反応液 200  $\mu$ L を混合してください。  
試料の調製は、《IV. 糖取込の方法例》をご覧ください。
- 2 プレートにプレートカバーをして、遮光下 37°C で 2 時間保温してください。
- 3 蛍光プレートリーダーで励起波長 540 nm、蛍光波長 590 nm での蛍光強度を測定してください。  
標準液の各濃度に対応する蛍光強度から検量線を作成し、試料の蛍光強度を検量線に当てはめ 2DG6P 濃度を算出してください。

### 【III-2】実測例

検量線の結果を図 2、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 3 に示しています (※一測定例になります)。



### 【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

- ・ 12 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  
(1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 118 mM  $\text{NaCl}$ , 5 mM  $\text{KCl}$ , 30 mM 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)



Glucose Cellular Uptake Measurement Kit (Broad Range, Fluorometric)

— グルコース細胞内取込量測定キット (広範囲、蛍光法) キット —

Cat. No. MBR-PMG-K01

www.cosmobio.co.jp

## 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 1.5 mL 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 1.5 mL 加えます。  
※これ以降のインスリン、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  $\mu$ M になるように添加し、37°C で培養してください。
- 6 2DG 溶液は、インスリンを添加してから 18 分後に 1 mM になるように添加してください。
- 7 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  $\mu$ M Phloretin を含む PBS(-) でウェル内を3回洗浄します。
- 8 1 ウェルあたり 1.5 mL の検体希釈液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 (細胞抽出液) を作成してください。
- 9 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。
- 10 熱処理をおこなった後、冷却遠心 (15,000 $\times$ g、20 分間) で上清を回収します。
- 11 回収した上清を《III -1. 測定方法》の試料とします。
- 12 細胞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 -1. 標準液の調製》をご覧ください。

※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。

## 【V】参考文献

[1] Yamamoto N, *et al.*,(2006). A nonradioisotope, enzymatic assay for 2-deoxyglucose uptake in L6 skeletal muscle cells cultured in a 96-well microplate. *Anal. Biochem.* 351: 139-145.

## 本商品をご利用になられた文献、発表データを募っております。

本商品をご利用いただいて投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

## 送付方法

## 郵 送

〒047-0261 北海道小樽市銭函3丁目513番2  
コスモ・バイオ株式会社 札幌事業所宛

## E-mail

primarycell@cosmobio.co.jp ※ PDF ファイルにてお送りください。

12197

コスモ・バイオ株式会社  
COSMO BIO CO., LTD.〒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● 札幌事業部 (技術的なお問い合わせ)  
TEL : (0134) 61-2301 FAX : (0134) 61-2295  
E-mail : [primarycell@cosmobio.co.jp](mailto:primarycell@cosmobio.co.jp)