



一般研究用キット

2-Deoxyglucose (2DG) Uptake Measurement Kit

2- デオキシグルコース (2DG) 代謝速度測定キット

Cat. No. OKP-PMG-K01H

2019年12月20日作成

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³H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っています。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。

本製品は、非放射性物質である2-デオキシグルコースを用いて細胞内に取込ませた後、細胞抽出液を2段階の酵素反応および酵素サイクリング法で糖取込み量を測定するキットです。

この測定方法の特徴は以下の通りです。

- non-RI法なので通常の実験室レベルで測定できる。
- 2DG6Pを測定するので細胞内の糖取り込み量を定量することができ、細胞外に存在する2DGの影響を受けない。
- 酵素サイクリング法で高感度に検出できる。

本製品は、大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 生理学研究所 箕越教授からのライセンス品です。

細胞内に取り込まれた2DGは、ヘキソキナーゼによって2DG6Pにリン酸化されるが、次の酵素反応に進まずに細胞内に留まります。そのため細胞内には内因性G6Pと2DG6Pが含んでいる状態になりますが、本キットの第1段階で試料中に含まれる内因性G6Pを分解させた後に、第2段階で細胞内に取り込まれた2DG6P量に比例してNADPHを産生し、酵素サイクリング法で高感度に検出します。

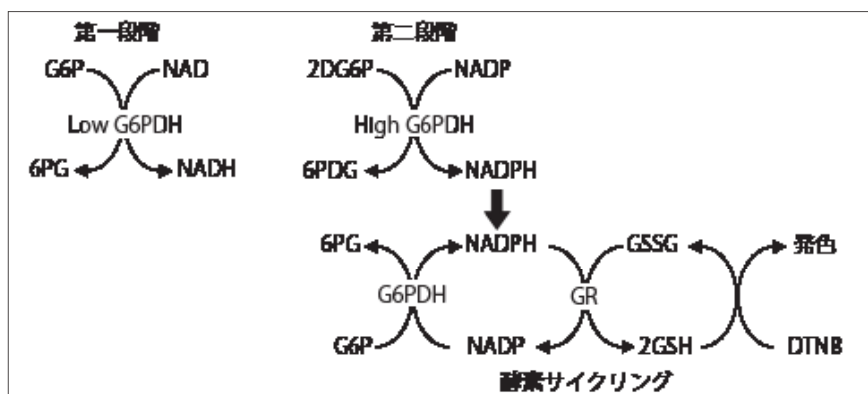


図1 キットの測定原理



【1-2】キット構成

本製品は 25 検体を測定できます。

保存温度：-20℃、ただし※印がついている構成は、解凍後 4℃保存してください。

内 容	容 量	数 量	取扱上の注意
反応基質液 A [※] (Solution A)	1,800 μL	1 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。
反応液 B [※] (Solution B)	500 μL	1 本	
反応液 C [※] (Solution C)	500 μL	1 本	
反応基質液 D [※] (Solution D)	850 μL	1 本	
反応液 E [※] (Solution E)	500 μL	1 本	
反応液 F [※] (Solution F)	500 μL	1 本	
反応基質液 G [※] (Solution G)	1,100 μL	1 本	
1 mM 2DG6P [※]	250 μL	1 本	
検体希釈原液 [※] (Sample Diluent Buffer Concentrate)	1.5 mL	1 本	
発色基質液 [※] (Substrate Buffer)	6.5 mL	1 本	
DTNB (粉末) (DTNB Substrate)	2 mL 分 (10 検体用)	3 本	
Low G6PDH (赤キャップ)	13 μL	1 本	
High G6PDH (黒キャップ)	130 μL	1 本	
GR (青キャップ)	10 μL	1 本	

【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。

【II - 2】 標準液の調製

- 標準液は、1 mM 2DG6P を検体希釈液で希釈します。
- 0 μ M 2DG6P から 5 μ M 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。

【II - 3】 反応液 A の調製

- 1 検体あたり反応液 A は 60 μ L 使用します
- 10 検体分の反応液 A の調製は、下表のように混合してください (用時調製、使用時まで氷上保管)。

反応基質液 A	650 μ L
Low G6PDH ※チューブのキャップは赤色	3 μ L

- ※ Low G6PDH 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。
- ※ Low G6PDH 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。
- ※ 調製後の反応液 A は、溶液が均一になるように混合して下さい。

【II - 4】 反応液 D の調製

- 1 検体あたり反応液 D は 30 μ L 使用します
- 10 検体分の反応液 D の調製は、下表のように混合してください (用時調製、使用時まで氷上保管)。

反応基質液 D	290 μ L
High G6PDH ※チューブのキャップは黒色	30 μ L

- ※ High G6PDH 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。
- ※ High G6PDH 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。
- ※ 調製後の反応液 D は、溶液が均一になるように混合して下さい。

【II - 5】 発色液の調製

- 発色基質液と DTNB (粉末) を下表のように混合し、粉末を完全に溶かして発色液を調製します。

DTNB (粉末)	バイアル 1 本
発色基質液	2 mL

- 発色液は、遮光下冷蔵で 7 日間保存可能です。



【II - 6】 酵素サイクリング液の調製

- 1 検体あたり酵素サイクリング液は 70 μL 使用します。
- 10 検体分の酵素サイクリング液の調製は、下表のように使用直前に混合して使用してください (用時調製、使用時まで氷上保管)。

反応基質液 G	360 μL
発色液	360 μL
High G6PDH ※チューブのキャップは黒色	10 μL
GR ※チューブのキャップは青色	2 μL

※ High G6PDH および GR 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。

※ High G6PDH および GR は 50 % グリセロールが含まため、粘性があります。

※調製後の酵素サイクリング液は、溶液が均一に混合されるようにして下さい。

【III】 測定方法

測定をおこなう前に下記の注意事項を読んでください。

- 各試薬を添加する前 (蓋をあける前)、各試薬を添加し混合した後は、必ずフラッシュ遠心等で壁面および蓋に付着した液を十分に落として下さい。壁面に試薬が付着した状態で操作を続けた場合、測定結果に大きな誤差が生じますのでご注意ください。
- マイクロプレートでアッセイする場合は、反応中はプレートシール等で密閉状態にしてください。

下記の液量は 1 検体あたりの添加量を記載しています。

- 1 試料または標準液 20 μL に反応液 A 60 μL を混合し、室温 (20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$) で一晩 (16 時間以上) 静置してください。試料の調製は、《IV. 糖取込の方法例》をご覧ください。
- 2 反応液 B を 5 μL 加えて、十分に混合してください。
- 3 38 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間保温してください。
- 4 反応液 C を 5 μL 加えて十分に混合し、室温で 5 ~ 10 分間静置してください。
※この間に反応液 D を調製してください。
- 5 反応液 D を 30 μL 加えて、穏やかに混合してください。
- 6 38 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間保温してください。
- 7 反応液 E を 5 μL 加えて、十分に混合してください。
- 8 70 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間保温します。
- 9 反応液を氷上で 5 分程度放置し、反応液を冷却してください。
- 10 反応液 F を 5 μL 加えて、十分に混合してください。
- 11 室温で 5 ~ 15 分間静置します。
※この間に酵素サイクリング液を調製してください。
- 12 酵素サイクリング液 70 μL を同時に加えて、穏やかに混合してください。
速やかに反応液を、波長 420 nm (もしくは ~ 430 nm) における吸光度変化を室温 (25 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$) で経時的に測定してください。
反応液中に含まれる 2DG6P 量に依存して黄色に発色し、反応時間にも比例して発色が進むため、同時に測定できる機器 (マイクロプレートリーダー) で測定することが好ましいです。
やむを得ずマイクロキュベットを使用した分光光度計で測定する場合は、発色させた反応液に 5 M 塩化ナトリウム溶液を 50 μL 同時に添加して発色を停止してください。その後、速やかに吸光度測定してください。

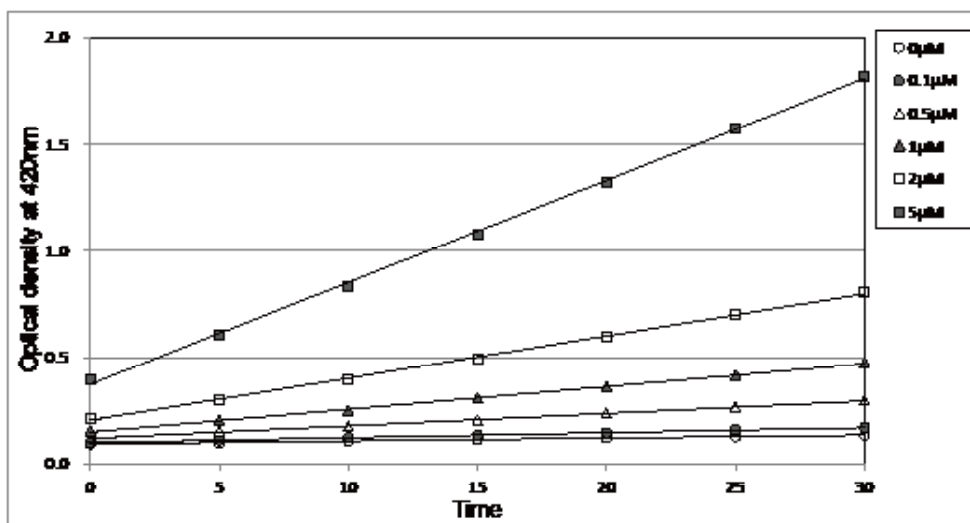


図2 2DG6Pの各濃度における吸光度の経時的変化

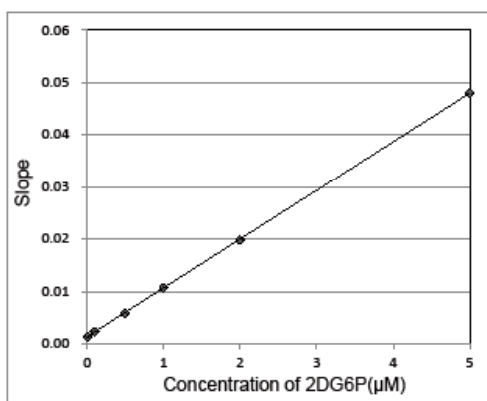


図3 カイネティック法による検量線 (発色後 30 分)

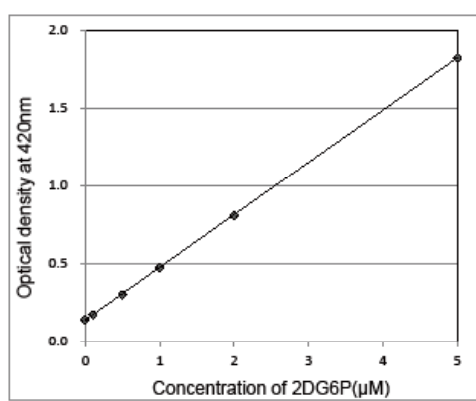


図4 エンドポイント法による検量線 (発色後 30 分)

【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

- ・ 6 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 KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 1.3 mM CaCl₂, 118 mM NaCl, 5 mM 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 (カルシウム、マグネシウム不含)
- ・ Phloretin (もしくは Cytochalasin B などの糖取込み阻害剤)
- ・ 10 mM Tris-HCl バッファー (pH8.0)

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3 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3 mL 加えます。
※これ以降のインスリン、Phloretin、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 μM になるように添加し、37°Cで培養してください。
- 6 Phloretin 溶液は、インスリンを添加してから16分後に200 ~ 1000 μM になるように添加してください。
- 7 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。
- 8 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 μM Phloretin を含むPBS(カルシウム、マグネシウム不含)でウェル内を3回洗浄します。
- 9 1ウェルあたり3 mL の10 mM Tris-HCl バッファー (pH8.0) 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。
- 10 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。
- 11 熱処理をおこなった後、冷却遠心(15,000 x g、20分間)で上清を回収します。
- 12 回収した上清の一部を検体希釈液で5倍またはそれ以上希釈し、その溶液を《III. 測定方法》の試料とします。
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 検体希釈液の調製》をご覧ください。

※ 細胞の抽出液に2-メルカプトエタノールやジチオスレイトールのような還元剤、プロテアーゼ阻害剤は添加しないでください。

※ 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。

実施例

3T3-L1 細胞の培養は、方法例に従い下記のスケジュールにて行った。3T3-L1 細胞を抽出し測定した結果を図 5 に示します (※一測定例になります)。

添加物	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D
インスリン	-	-	-	+
2DG	-	+	+	+
Phloretin	-	-	+	-

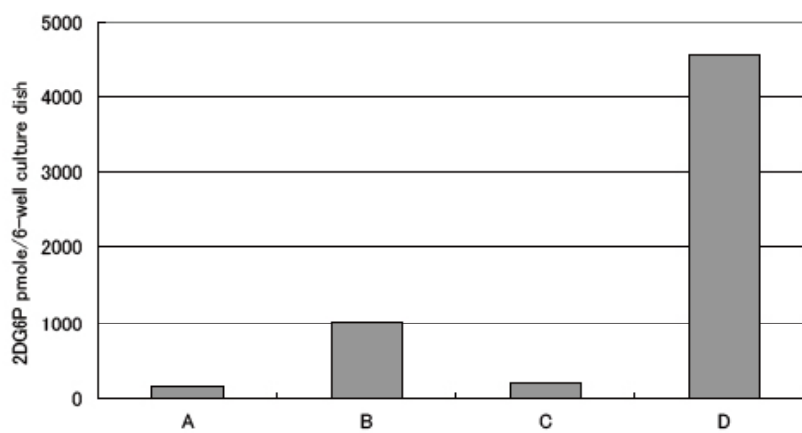


図 5 測定結果



2-Deoxyglucose (2DG) Uptake Measurement Kit
— 2-デオキシグルコース (2DG) 代謝速度測定キット —
Cat. No. OKP-PMG-K01H

【V】参考文献

- (1) Monden M, et. al., Diabetes. 2013 Feb;62(2):478-89. PMID : 23011593
- (2) Wang X, et. al., Diabetes. 2013 Feb;62(2):444-56. PMID : 23086038
- (3) Woo MS, et. al., Phytother Res. 2013 Jul;27(7):1102-5. PMID : 22991308
- (4) Saito K, et.al., Anal Biochem. 2011 May 1;412(1):9-17. PMID : 21262191
- (5) Bo M. Jørgensen, et. al., Anal Biochem. 1979 Nov 1;99(2):297-303

(1)～(3)はキットを使用した論文です。

(4)、(5)はキットの原理が記載されている論文です。

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。

12292



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