コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

研究用試薬

YK010　Rat　C-Peptide　EIA

取　扱　説　明　書

FOR　RESEARCH　LABORATORY　USE　ONLY

株式会社　　矢内原研究所
〒418-0011　静岡県富士宮市粟倉 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　10

YK010 **Rat C-Peptide EIA キット**

Ⅰ. はじめに

本ラット C-ペプチド EIA キットは、ラットの血漿および尿中のtotalC-ペプチド濃度を測定できる簡便で安定な測定系です。インスリンの前駆体、プロインスリンはB細胞内でプロセシングを受け、インスリンとC-ペプチドを生成した後、ほぼ等モル比で血中に放出されます。したがって、血中 C-ペプチド濃度は血中インスリン濃度を反映していますし、インスリン投与時の膵B細胞機能を C-ペプチドの測定により知ることが出来ます。また、C-ペプチドの半減期はインスリンのそれより長いという特徴をもっています。すでにヒト C-ペプチドRIA系は確立され、膵B細胞機能の診断に広く有効に用いられています。しかし動物種により C-ペプチドのアミノ酸配列が異なるため、ヒト C-ペプチドの測定系により、ラットの C-ペプチドの測定は出来ません。

ラットには2種類のインスリンが存在することを反映し、2種類の C-ペプチドが存在します。本ラット C-ペプチド EIA キットでは、2種類のラット C-ペプチドの間で同一のアミノ酸配列であるC端部を認識するポリクローナル抗体を使用し、ラット C-ペプチド Ⅰ を標準抗原、ビオチン化ラット C-ペプチド Ⅰ を標識抗原とすることにより、ラットの血漿および尿中のtotalC-ペプチド濃度の測定を可能にしました。

本 EIA キットは、ラット膵B細胞機能の変化を検討する上で、きわめて有効に使用できます。

YK010 **Rat C－Peptide EIA キット**

- 1．56 ～ 50ng／mLの範囲を測定できます。
- 測定は約5．5時間で終了します。
- 41検体をduplicateで測定できます。
- 細胞培養液、血漿、血清、尿サンプルの測定が可能です。
- プレートは一列（8ウエル）ずつ取り外しができますので
  キットの分割使用が可能です。

内容

1）抗体固定化プレート
2）凍結乾燥ラットC－ペプチド標準品(50ng)
3）凍結乾燥ビオチン化ラットC－ペプチド
4）ウサギ抗ラットC－ペプチド抗体溶液
5）ストレプトアビジン－HRP（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

保存と安定性

2 ～ 8℃で保存してください。製造日より24ヶ月は安定です。

Ⅱ．特徴

本キットはラットの血漿・血清および尿に含まれるラットC－ペプチドを定量的に測定するためのキットです。本キットによるラットC－ペプチドの測定は簡便にしかも特異性、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があります。なお、添付の標準ラットC－ペプチドは高純度合成品（純度98％以上）であり、表示の重量は絶対量を示しています。　また、として、N^{α}－biotinylglycylglycyl rat C－peptide Ⅰを使用しています。

＜特異性＞

本キットはラット C－ペプチドに特異的であり、ヒトや他の動物の C－ペプチドとの交差反応性を認めません。

＜1日法＞

測定は約5．5時間で終了します。

＜測定原理＞

本EIAは特異性の高い2次抗体法を用いた競合法に、ビオチンとストレプトアビジンの非常に高い親和性を応用した発色を組み合わせた測定法です。

96ウエルプレートの各ウエルにはヤギ抗ウサギIgG抗体が固定化されています。この各ウエルに標準ラットC－ペプチド（または検体）、ビオチン化ラットC－ペプチドおよび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結合ストレプトアビジンを加えると、ウエル上にHRP結合ストレプトアビジン－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HRP活性を測定することにより、検体中のラット C－ペプチド濃度を求めることができます。

Ⅲ．キットの構成

試薬	形状	規格	内容物
1. 抗体固定化プレート	ドライプレート	96ウエルプレート 1枚	ヤギ抗ウサギIgG抗体
2. 凍結乾燥ラット C－ペプチド標準品	凍結乾燥品	1本	合成ラットC－ペプチド Ⅰ（50ng）
3. 凍結乾燥ビオチン化 ラットC－ペプチド	凍結乾燥品(8mL 用)	1本	ビオチン化ラットC－ペプチド Ⅰ
4. ウサギ抗ラットC－ペプチド 抗体溶液	12mL	1本	ウサギ抗ラットC－ペプチド抗体溶液 および非特異反応除去剤を含むリン酸緩衝液
5. ストレプトアビジン－HRP 溶液	12mL	1本	ストレプトアビジン－HRPおよび非特異反応除去剤を含む
6. 基質溶解液	液状	24mL 1本	0.015%過酸化水素を含む 0.1M リン酸 ナトリウム－クエン酸緩衝液
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	12mL 1本	2N H_2SO_4
9. 緩衝液	液状	30mL 1本	非特異反応除去剤を含むリン酸緩衝液
10. 濃縮洗浄液	濃縮液	50mL 1本	1%Tween20を含む濃縮生理食塩水
11. プレート密閉用シール		3枚	

Ⅳ. 操作法

＜使用器具および装置＞

1）マイクロタイタープレート用吸光度計（プレートリーダー）、波長490nmで吸光度2．5まで測定できる装置

2）マイクロタイタープレート振とう器またはシェーカー

3）マイクロタイタープレート洗浄器、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

4）マイクロピペットおよびチップ（8連または12連のマルチチャンネルピペットを使用する。）

5）標準液の調製に使用するポリエチレンまたはポリプロピレン製等の試験管

6）メスシリンダー（1000mL）

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：
凍結乾燥ラットC－ペプチド標準液に1mLの緩衝液を加えて溶解し、50ng／mLの標準液とする。 これを緩衝液にて2倍連続段階希釈する。 すなわち、この標準液0．5mLをとり、これを緩衝液0．5mLで希釈し25ng／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、25、12．5、6．25、3．12、1．56、ng／mLの各標準液を調製する。 0 ng／mLの標準液は緩衝液をそのまま用いる。

2）ビオチン化ラットC－ペプチド溶液の調製法：
使用時に凍結乾燥ビオチン化ラットC－ペプチドを8mLの緩衝液を加えて溶解する。

3）発色剤溶液の調製法：
使用時に基質溶解液11mLにOPD錠1錠を加え溶解し使用する。

4）洗浄液の調製法：
濃縮洗浄液50mL（全量）を精製水950mLで希釈し、プレート洗浄用に使用する。

5）その他の試薬はそのまま測定操作にしたがって使用する。

＜測定操作＞

1. キットの内容を室温にもどす。
ラットC－ペプチド標準液、ビオチン化ラットC－ペプチド溶液および洗浄液を上記調製法にしたがって希釈調製する。

2. 抗体固定化プレートの各ウエルに緩衝液50μＬを分注し、ついで標準液または検体50μＬを加える。さらにビオチン化ラットC－ペプチド溶液50μLおよび抗ラットC－ペプチド溶液100μＬを加える。

3. マイクロタイタープレートをシールし、室温（20～30℃）で3時間反応を行なう。反応中はプレート振とう器を用いてゆっくりと振とうする。

4. 各ウエル中の液を除き、350μＬの洗浄液を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいは液を捨てて、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにしてか完全に液を除く。
この操作をさらに2回繰り返し、合計3回の洗浄操作を行なう。

5. 各ウエルにストレプトアビジン－HRP（SA－HRP）溶液100μＬを加える。

6. マイクロタイタープレートをシールし、室温（20～30℃）で2時間反応を行なう。反応中はプレート振とう器を用いてゆっくりと振とうする。 その間に発色剤溶液を上記調製法にて調製する。

7. 各ウエル中の液を除き、4. と同様の洗浄操作を3回行う。

8. 各ウエルに調製した発色剤溶液100μLを入れ、室温で10分間反応する。

9. 各ウエルに酵素反応停止液100μLを入れる。

10. マイクロタイタープレート吸光度計にて490nmの吸光度を測定する。ラットC－ペプチド標準液の測定値から標準曲線を作成し、検体中のラットC－ペプチド測定値を標準曲線にあてはめ、ラットレC－ペプチド濃度を算出する。

Ⅴ. 操作上の注意

1. 被検血漿、血清は採血後、ただちに測定してください。 採血後ただちに測定出来ない場合は血清・血漿分離後、最初に小分けして－30℃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（希釈）を原則とし、また調製ごとに新しい容器をお使いください。ただし、洗浄液は希釈した状態で2～8℃で6ヶ月間保存できます。

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、この沈殿は希釈調製時に溶解します。

4. キットは分割使用が可能です。 溶解された試薬の残り（標準品および凍結乾燥ﾋﾞｵﾁﾝ化ﾗｯﾄC-ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ）は適宜小分けして、－30℃以下で凍結保存してください。

5. 各ウエル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、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、希釈段階ごとにかならず新しいチップを使ってください。

6. 50ng／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ください。

7. 反応液を静置したままで抗原抗体反応を行いますと反応性が低下しますので、抗原抗体反応中は必ずマイクロタイタープレート用振とう器を用いて振とうしてください。なお、振とうはプレートシールに反応液がはねないようゆっくりと行ってください。

8. 測定はすべて2重測定で行ってください。

9. 発色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。

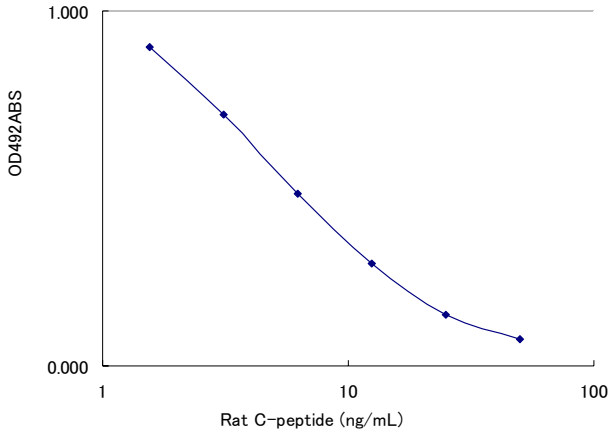
10. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、マイクロタイタープレートの振とうの程度などでわずかですが影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごとに作成してください。

11. 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。

12. 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

標準曲線



添加回収試験

Sample No.	C-Peptide added ng／mL	Observed ng／mL	Expected ng／mL	Recovery (%)
1		5．7	5．7	－
2	1	6．26	6．13	102．2
3	5	10．2	10．1	100．6
4	25	32．2	30．1	106．9

- 同時再現性 CV(%) 3．38 ～ 8．83
- 日差再現性 CV(%) 5．56 ～ 8．41

Ⅶ. 貯蔵法および有効期間

＜貯蔵＞　　遮光して、2 ～ 8℃にて保存してください。

＜有効期間＞　　製造日より24ヶ月

＜包装＞　　1キット96テスト分（標準曲線作成用も含む）

Ⅷ. 文献

1. Markussen, J. and Sundby, F. (1972): Eur. J. Biochem., **25**: 153.

2. Massey, D. E. and Smyth, D. G. (1975): J. Biol. Chem., **250**: 6288.

3. Miyachi, Y., Vaitukatis, J. L., Nieschlag, E. and Lipsett, M. B. (1972): J. Clin. Endocr., **34**: 23.

4. Smyth, D. G. ,Markussen, J. and Sundby, F. (1974): Nature(Lond), **248**: 151.

5. Tager, H. S., Emdin. S. O., Clark, J. L. and Steiner, D. F. (1973): J. Biol. Chem., **248**, 3476.

6. 6. Tager, H. S. and Steiner, D. F. (1972): J. Biol. Chem., **247**, 7936.

7. Yanaihara, N., Sakagami, M.., Sakura N., Iizuka,, Y., Nishida, T., Hashimoto, T. and Yanaihara, C. (1977): In: Diabetes, p116. Ed J. S. Bajaj. Excerpta Medica, Amsterdam.

8. Yanaihara, N. ,Nishida, T., Sakagami, M.. and Yanaihara, C. (1977): In: Peptide Chemistry 1976, p85. Ed T. Nakajima. Protein Research Foundation, Osaka.

9. Yanaihara, N., Yanaihara, C., Sakagami, M.., Sakura, Hashimoto, T. N. and Nishida, T. (1978): Diabetes, **27**,(Suppl. 1) 149.

10. Yanaihara, C., Ozaki, J. ,Nishida, T., Iizuka,, Y., Sato, H., Yanaihara, N and Kaneko, T. (1979): Eds. S. Baba, T. Kaneko, N. Yanaihara, p87. Excerpta Medica, Amsterdam－Oxford.

11. Luo, W. Q., Kanno, T., Winarto, A., Iwanaga, T., Li, J., Futai, Y. ,Yanaihara, C., and Yanaihara, N. (1998) : Biomed, Res. ,**19**, 127

＜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

2008 年 5 月 29 日改訂