



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

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](http://www.yanaihara.co.jp) E-mail: [ask@yanaihara.co.jp](mailto:ask@yanaihara.co.jp)



人と科学のステキな未来へ

# コスモ・バイオ株式会社

## 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	8
VIII. 文献	9



## 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、血清、尿および細胞培養液中の total C-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 細胞内でプロセッシングを受け、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、ラットの血中および尿中の total C-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	内容
▼ 1.56 ~ 50 ng/mL の範囲を測定できます。	1) 抗体固定化プレート
▼ 測定は約 5.5 時間で終了します。	2) ラット C-ペプチド標準品
▼ 41 検体を duplicate で測定できます。	3) ビオチン化ラット C-ペプチド
▼ 血漿、血清、尿サンプル、細胞培養液中の測定が可能です。	4) 抗ラット C-ペプチド抗体溶液
▼ プレートは一行 (8 ウェル) 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。	5) SA-HRP 溶液
▼ 検体量: 50 $\mu$ L	6) 基質溶解液
	7) OPD 錠
	8) 酵素反応停止液
	9) 緩衝液
▼ 再現性	10) 濃縮洗浄液
同時再現性 CV (%) 3.38 ~ 8.83	11) プレート密閉用シール
日差再現性 CV (%) 5.56 ~ 8.41	
保存と安定性	
2~8°C 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、尿および細胞培養液に含まれるラット 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、N<sup>α</sup>-biotinylglycylglycyl rat C-peptide I を使用しています。

### <特異性>

本キットはヒト C-ペプチドおよびマウス C-ペプチド II に対する交差反応性をほとんど認めませんが、マウス C-ペプチド I に対しては 29.8%の交差反応性が認められます。

### <1日法>

測定は約 5.5 時間で終了します。

### <測定原理>

本 EIA は特異性の高いラット C-ペプチド抗体（ポリクロナール抗体）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利用した測定法です。

96 ウェルプレート各ウェルにはヤギ抗ウサギ IgG 抗体が固定化されています。この各ウェルに標準ラット C-ペプチド（または検体）、ビオチン化ラット C-ペプチドおよびウサギ抗ラット C-ペプチド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 (SA-HRP) を加えると、ウェル上に 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ウェルプレート	1枚	ヤギ抗ウサギ IgG
2. ラット C-ペプチド標準品	凍結乾燥品	50 ng	1本	合成ラット C-ペプチド-I
3. ビオチン化ラット C-ペプチド	凍結乾燥品	(8 mL 用)	1本	ビオチン化ラット C-ペプチド-I
4. 抗ラット C-ペプチド抗体溶液	液状	12 mL	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. SA-HRP 溶液	液状	12 mL	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トリス緩衝液
6. 基質溶解液	液状	24 mL	1本	0.015% 過酸化水素を含む 0.1 M 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	12 mL	1本	1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
9. 緩衝液	液状	30 mL	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	50 mL	1本	1% Tween 20 を含む濃縮生理食塩水
11. プレート密閉用シール		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. マイクロタイタープレート用吸光度計（プレートリーダー）、波長 490 nm 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機またはシェーカー
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の使用を薦めます
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の使用を薦めます。）
5. 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製の試験管
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：

ラット C-ペプチド標準品に 1 mL の緩衝液を加えて溶解し、50 ng/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 0.5 mL をとり、これを緩衝液 0.5 mL で希釈し 25 ng/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、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：

使用時にビオチン化ラット C-ペプチドに 8 mL の緩衝液を加えて溶解する。

#### 3. 発色剤溶液の調製法：

使用直前に基質溶解液 11 mL 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 50 mL（全量）を精製水 950 mL 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従って使用する。

## <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従って希釈調製する。
2. 抗体固定化プレートの各ウェルに緩衝液 50  $\mu\text{L}$  を分注し、ついで標準液または検体 50  $\mu\text{L}$  を加える。さらにビオチン化ラット C-ペプチド溶液 50  $\mu\text{L}$  および抗ラット C-ペプチド溶液 100  $\mu\text{L}$  を加える。
3. プレートをシールし、室温 (20~30°C) で 3 時間反応を行なう。反応中はプレート振とう機を用いてゆっくりと振とうする。
4. 各ウェル中の液を除き、350  $\mu\text{L}$  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. 各ウェルに SA-HRP 溶液 100  $\mu\text{L}$  を加える。
6. プレートをシールし、室温 (20~30°C) で 2 時間反応を行なう。反応中はプレート振とう機を用いてゆっくりと振とうする。
7. 6 の反応終了直前に発色剤溶液を上記調製法にて調製する。
8. 各ウェル中の液を除き、4. と同様の洗浄操作を 3 回行う。
9. 各ウェルに調製した発色剤溶液 100  $\mu\text{L}$  を入れ、室温で 10 分間反応する。
10. 各ウェルに酵素反応停止液 100  $\mu\text{L}$  を入れる。
11. マイクロタイタープレート吸光度計にて 490 nm 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 C-ペプチド濃度を算出する。

## V. 操作上の注意

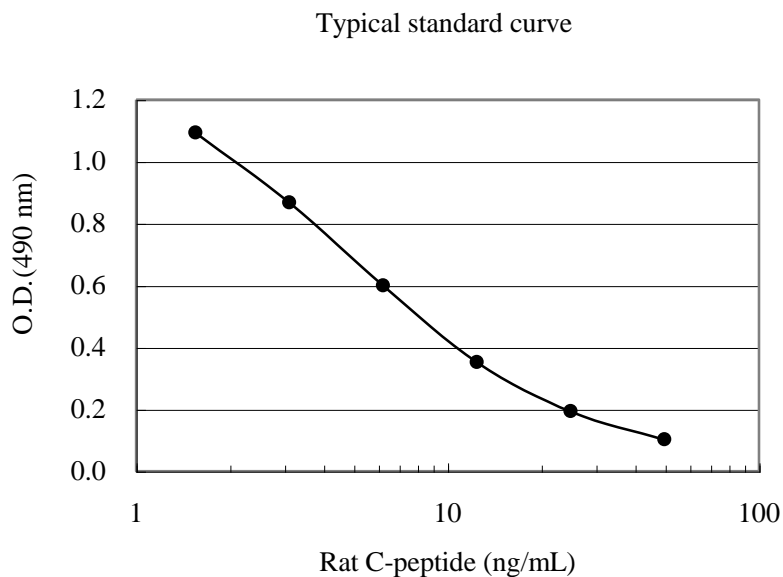
1. 検体採集後、ただちに測定してください。採集後にただちに測定出来ない場合は、最初に小分けして $-30^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。
2. 試薬は用時調製（希釈）を原則としてください。特にラット C-ペプチド標準品およびビオチン化ラット C-ペプチドは調製後、直ちに使用してください。なお、キットを分割使用する場合、調製後の残液（標準液およびビオチン化ラット C-ペプチド溶液）は適宜小分けして、 $-30^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存してください。
3. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。
4. 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。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。各ウェ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。
5.  $50\text{ ng/mL}$  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。
6. 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機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にゆっくりと行ってください。
7. 測定はすべて 2 重測定で行ってください。
8. 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。
9. 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。
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

Rat C-Peptide added (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.0	5.70		
1.0	6.26	6.13	102.20
5.0	10.20	10.10	100.60
25.0	32.20	30.10	106.90

- 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) Rat-proinsulin C-peptides. Amino-acid sequences. *Eur. J. Biochem.* **25**, 153-162.
2. Massey, D. E. and Smyth, D. G. (1975) Guinea pig proinsulin. Primary structure of the C-peptide isolated from pancreas. *J. Biol. Chem.* **250**, 6288-6290
3. Miyachi, Y., Vaitukaitis, J. L., Nieschlag, E. and Lipsett, M. B. (1972) Enzymatic radioiodination of gonadotropins. *J. Clin. Endocr.* **34**, 23-28.
4. Smyth, D. G., Markussen, J. and Sundby, F. (1974) The amino acid sequence of guinea pig C-peptide. *Nature (Lond)*, **248**, 151-152.
5. Tager, H. S., Emdin, S.O., Clark, J. L. and Steiner, D. F. (1973) Studies on the conversion of proinsulin to insulin. *J Biol Chem.* **248**, 3476-3482.
6. Tager, H. S. and Steiner, D. F. (1972) Primary structures of the proinsulin connecting peptides of the rat and the horse. *J. Biol. Chem.* **247**, 7936-7940.
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 Media, 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, Sakura, N., Hashimoto, T. and Nishida, T. (1978) Syntheses of C-peptides and human proinsulin. *Diabetes*, **27**, (Suppl 1) 149-160
10. Yanaihara, C., Ozaki, J., Nishida, T., Iizuka, Y., Sato, H., Yanaihara, N. and Kaneko, T. (1979): p87. Eds. S. Baba, T. Kaneko, N. Yanaihara, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford
11. Luo, W. Q., Kanno, T., Winarto, A., Iwanaga, T., Li, J., Futai, Y., Yanaihara, C. and Yanaihara, N. (1998): An experimental analysis of therapeutic effects of a Chinese herbal prescription in streptozocin-treated rats. *Biomed, Res.* **19**, 127-133

<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](mailto:ask@yanaihara.co.jp)

2019年7月12日改訂