



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

研究用試薬

YK012 Mouse C - Peptide II 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	2~3
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	6~7
VI. 基本性能	7~8
VII. 貯蔵法および有効期間	9
VIII. 文献	9

YK012 Mouse C-Peptide II EIA キット

I. はじめに

C-ペプチドは、インスリン生合成前駆体であるプロインスリンの膵B細胞内でのプロセッシングによって生じる副産物です。インスリンと等モル比で血中に放出されるので、血中C-ペプチド濃度を測定することによって、膵B細胞のインスリンの分泌機能を推測することができます。C-ペプチドの半減期はインスリンのそれよりかなり長いという特徴を持っていることから、代謝が速いインスリンの代わりにC-ペプチドを測定することはインスリン分泌量をより正確に知るための指標となるところから、臨床上広く利用されています。特にC-ペプチドの測定は臨床的にはインスリン治療中の糖尿病患者のB細胞機能の評価(インスリン測定の代用)のみならず、低血糖状態の鑑別診断、高インスリン血症の鑑別診断、インスリン分泌総量の推定、膵摘出後の残存膵の有無の判定などにも応用されています。その他、インスリン受容体異常症や異常インスリン血症等インスリン代謝が大きく影響される病態では、C-ペプチドの測定はインスリンの測定よりはるかに重要となります。

また、長らく生理的活性がなく、ただインスリンの生合成副産物と考えられていたC-ペプチドについて近年の研究では、細胞の表面と特異的に結合し、 Ca^{2+} の細胞内への流入を促進し、MAP kinase、 Na^+ 、 K^+ -ATPaseやeNOSを活性化するなどの結果が報告されています。動物実験ではさらに糖尿病合併症の予防、心臓の虚血・再灌流傷害の保護効果、1型糖尿病ラットにおける神経再生能力低下の防止、およびインスリン仲介細胞の成長促進や高濃度グルコースによる細胞アボトーシスの保護などが観測されています。これらの成果から、今後C-ペプチドの生理活性研究はかつてないほど注目されてくるものと予測されます。

当研究所ではすでにラットC-ペプチド及びマウスC-ペプチドの測定キットを開発しています。マウスもラットと同様、2種類のC-ペプチドが存在します。今回開発したマウスC-ペプチド II の簡易測定キットは、前回開発したマウスC-ペプチドを特異的に測定できるキット(YK011)に続き、マウスC-ペプチド I とは反応しない II にのみを認識する抗体を用い、ビオチン化マウスC-ペプチド II を標識抗原とすることにより、マウスの血清、血漿および尿中のC-ペプチド II 濃度を特異的に測定することを可能にしました。本 EIA キットはマウス体内のC-ペプチド II の変動を検討する上で、極めて有效地に使用できます。

YK012 Mouse C-Peptide II EIA キット	内容
▼ 0.412～100 ng/mL の範囲で測定できます。	1)測定プレート
▼ 測定は 16～18 時間と 2.5 時間で終了します。	2)標準品
▼ 41 未知検体を <i>duplicate</i> でアッセイできます。	3)標識抗原
▼ 血清・血漿・尿サンプルの測定ができます。	4)特異抗体
▼ 検体量は 25 μ L です。	5)SA-HRP 溶液
▼ 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。	6)基質溶解液
▼ 同時再現性 血清 CV(%) 4.12~5.66	7)OPD 錠
▼ 日差再現性 血清 CV(%) 2.72~10.62	8)酵素反応停止液
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。	9)緩衝液 10)濃縮洗浄液 11)プレート密閉用シール

II. 特徴

本キットはマウスの血清・血漿および尿に含まれるマウスC-ペプチド II を直接的且つ特異的に定量するためのキットです。操作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、添付の標準マウスC-ペプチド II は高純度合成品(純度 99%以上)であり、表示の重量は絶対量を示しております。

また、ビオチン化マウスC-ペプチドIIは、HPLCにより精製したN^α-biotinylarginylarginyl mouse C-peptide II を使用しています。

＜特異性＞

本キットはマウスC-ペプチド I と 0.091%、ラットC-ペプチド I と 0.34%、ラットC-ペプチド II と 63.3%、ラットインスリンと 1.8% の交差反応性が認められます。ヒトとイスのC-ペプチドとの交差反応性は認められません。

＜測定原理＞

本アッセイ系は特異性の高いウサギ抗マウスC-ペプチド II 抗体を用いた競合法に、ビオチンと streptavidin の非常に高い親和性を利用した測定法です。

測定プレート(96 ウエル)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マウスC-ペプチド II または検体、ウサギ抗マウスC-ペプチド II 抗体およびビオチン化マウスC-ペプチド II 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、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、検体中のマウスC-ペプチド II 濃度を求めるすることができます。有効測定範囲は 0.412～100ng/mL です。

III. キットの構成

試薬・器具	形状	規格	内容物
1. 測定プレート		96 ウエルプレートヤギ抗ウサギ IgG 抗体 1 枚	固定化プレート
2. 標準品	凍結乾燥品	100ng	1 本 合成 mouse C-peptide II
3. 標識抗原	凍結乾燥品		1 本 ピオチン化 mouse C-peptide II
4. 特異抗体	液状	6 mL	1 本 ウサギ抗 mouse C-peptide II 抗体
5. SA-HRP 溶液	液状	12 mL	1 本 安定剤を含むトリス塩酸緩衝液に溶解した HRP 結合ストレプトアビシン
6. 基質溶解液	液状	26 mL	1 本 0.015% 過酸化水素を含む 0.1 M 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 硫酸溶液
9. 緩衝液	液状	25 mL	1 本 非特異的反応除去剤を含む リン酸緩衝液
10. 濃縮洗浄液	液状	50 mL	1 本 1% Tween 20 を含む 濃縮生理食塩液
11. プレート密閉用シール		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戻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(25 μ L～1 mL);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 492 nm 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ポリプロピレン製の試験管またはガラス試験管
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(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:標準品の容器に緩衝液 1 mL を加え内容物を溶解させ、100 ng/mL の標準液を作製する。この標準液 0.1 mL をとり、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 33.33 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、100、33.33、11.11、3.704、1.235、0.412 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使用する。
2. 標識抗原溶液の調製法:標識抗原の容器に緩衝液 12 mL を加え内容物を溶解させ使用する。
3. 発色剤溶液の調製法:使用時に基質溶解液 12 mL に OPD 錠 1 錠加え溶解させ使用する。
4. 洗浄液の調製法:50 mL (全量)を蒸留水 950 mL にて希釈し使用する。
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. キット内容を室温(20～30°C)に戻す。
標準液、標識抗原溶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. 各ウエルに標準液または検体 25 μ Lを入れ、ついで特異抗体 50 μ Lを加え、さらに標識抗原溶

液 100 µLを加える。

3. 測定プレートをシールし、4°Cで16~18時間静置する。
4. プレートをさらに室温にて振とうさせながら1時間反応を行う。
5. 各ウエル中の液を除き、洗浄液 350 µL を満たした後、アスピレーターによって吸引するか、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回の洗浄操作を行なう。
6. 各ウエルにSA-HRP 溶液 100 µL を加える。
7. 測定プレートをシールし、室温で1時間振とうする。
8. 6.の反応終了直前にOPD 錠を基質溶解液で溶解し、発色剤溶液を調製する。
9. 各ウエル中の液を除き5)と同様の洗浄操作を5回行なう。
10. 各ウエルに発色剤溶液 100 µL を加え、室温で30分間反応させる。
11. 各ウエルに酵素反応停止液 100 µL を加える。
12. マイクロプレート用吸光度計にて 492 nm の吸光度を測定する。

Mouse C-peptide II標準液の各濃度(6ポイント)の測定値から標準曲線を作成し、検体の測定値を標準曲線に当てはめ、mouse C-peptide II 濃度を算出する。

V. 操作上の注意

1. 血液検体は採血後ただちに測定して下さい。採血後ただちに測定出来ない場合は血清もしくは血漿分離後、最初に小分けして-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。血漿はEDTAを入れた採血管で採血してください。
2. 試薬は、用時調製(希釀)を原則としてください。
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、この沈殿は希釀調製時に溶解します。また、洗浄(たたく)中ウエルにはほこりなどのごみが入らないように注意を払う必要があります。
4. 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入れる場合は、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。標準液を希釀するときは、希釀段階ごとにかならず新しいチップを使ってください。
5. 100 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釀してから測定してください。また、尿検体を測定する場合、予め本キット添付の緩衝液にて10倍以上希釀して測定してください。
6. 室温で反応中は必ずマイクロプレート用振とう器を用い振とうして下さい(最初の4°Cでの反応および呈色反応は除く。)。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ゆっくりと行なってください。
7. 標準液、検体ともに測定は二重測定で行なってください。
8. キットは分割使用が可能です。溶解された試薬の残り(標準品および標識抗原)は2週間以内であれば

-30°Cにて凍結保存してください。

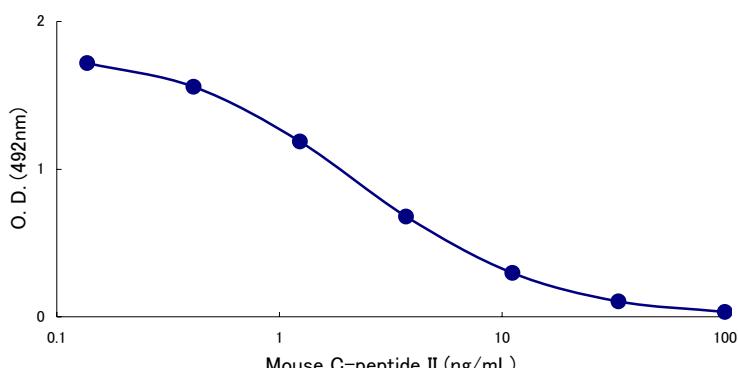
9. 酵素基質の発色レベルは、反応温度、時間、プレートの振とうの程度などでわずかながら影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定毎に作成してください。
10. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行なってください。
11. 試薬の保存もしくは使用中に、強い光が当たらないように注意して下さい。
12. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせて使用しないでください。

VI. 基本性能

＜測定範囲＞ 有効測定範囲 0.412ng/mL~100ng/mL

0.412ng/mLを下回るような低値の検体が予想されるような場合、検出限度としてさらに0.412ng/mLの標準液を3倍希釈し0.137ng/mLの標準液を設けることができます。この場合、0.137ng/mL~0.412ng/mLの範囲での測定値の精度は上記有効測定範囲ほど精確ではありませんが、概算値として使用してください。

標準曲線



＜再現性＞

同時再現性 CV(%) 血清 4.12~5.66

日差再現性 CV(%) 血清 2.72~10.62

＜添加回収試験＞

血清			
Added (ng/mL)	Recovery (%)	SD (n=5)	CV (%)
0.520	107.624	4.846	4.503
1.042	110.917	4.044	3.646
2.083	108.311	3.990	3.684

4.167	120.291	4.683	3.893
8.333	116.770	8.377	7.174
16.667	114.817	5.646	4.918

血漿			
Added (ng/mL)	Recovery (%)	SD (n=5)	CV (%)
0.520	100.970	8.471	8.390
1.042	101.383	8.006	7.897
2.083	109.568	3.734	3.408
4.167	110.418	4.569	4.137
8.333	118.733	5.719	4.816
16.667	122.243	3.077	2.517

尿			
Added (ngmL)	Recovery (%)	SD (n=4)	CV (%)
0.412	100.325	4.591	4.576
1.235	98.317	2.945	2.995
3.704	100.773	6.110	6.063
11.110	101.687	7.102	6.984
33.330	101.184	12.910	12.759

注: 尿サンプルは 24 時間で収集したマウスの尿を緩衝液で 10 倍に希釈してから添加回収試験に使用した。

＜希釈試験＞

血清、血漿および尿検体ともに良好な希釈直線性を示しました。

VII. 貯蔵法および有効期間

＜貯法＞

遮光し、2~8°Cにて保存してください。

＜有効期間＞

製造日より 24 ヶ月間(使用期限は外箱に表示)

＜包装＞

1 キット 96 テスト分(標準曲線作成用を含む)

VIII. 文献

1. Wahren, J. et al: C-peptide makes a comeback, Diabetes Metab. Res. Rev., 19 (5), 345-347, 2003
2. Pierson, CR. et al: Proinsulin C-peptide replacement in type 1 diabetic BB/Wor-rats prevents deficits in nerve fiber regeneration. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 62 (7), 765-79, 2003
3. Li, ZG. et al: C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells, Diabetes Metab. Res. Rev., 19 (5), 375-85, 2003
4. Johansson, J. et al: Molecular effects of proinsulin C-peptide, Biochem. Biophys. Res. Comm., 295, 1035-1040, 2002
5. Lindon, H. et al: C-peptide exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 279 (4), 1453-1459, 2000
6. 松田万幸、岡 芳知:C-ペプチド(CPR), 日本臨床 57 卷, 1999 年増刊号, 広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査(4), 313-316, 1999
7. Wentworth, BM. et al: Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin, J. Mol. Evol., 23 (4), 305-312, 1986
8. Yanaihara, C. et al: Immunoreactive rat C-peptide I and II in glucose perfusate of isolated pancreas. In: Insulin (ed. Brandenburg, D., and Wollmer. A.), Walter de Gruyter & Co., Berlin, 651-657, 1980
9. Yanaihara, C. et al: Immunological studies on synthetic rat and guinea pig C-peptide. In: Proinsulin, Insulin, C-peptide (ed.Baba,S., Kaneko,S., and Yanaihara, N.), Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, 87-93, 1979

＜お問い合わせ先＞

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市粟倉 2480-1

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

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

2007年1月30日改訂