

研究用試薬

YK090 Glucagon EIA

(Rat, Mouse & Human Glucagon 測定用)

取扱説明書

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉 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	5~7
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	9

YK090 Glucagon EIA キット

I. はじめに

Glucagonのイムノアッセイについては、多数の研究が行われており、glucagonのC端19-29位を認識する抗体は膵glucagonを特異的に認識し、一方1-19位を認識する抗体は膵glucagonと腸管glucagonの両方(total glucagon)を認識することが確認されています。glucagonC端特異抗体として、かつてはUngerらによる30Kが有名でしたが、Nishino、Shima、YanaiharaらはglucagonC端19-29位に一致する合成ペプチドを抗原として、膵glucagon特異抗体の作製に成功しました。

本EIAキットは、このglucagon(19-29)を抗原として作製した膵glucagon特異ポリクローナル抗体を用い、合成glucagonを標準抗原、ビオチン化glucagonを標識抗原とすることにより、ラット、マウスおよびヒトの血漿・膵glucagon濃度を測定することが出来るEIA系を確立しました。

YK090 Glucagon EIA キット

● Rat, Mouse & Human Glucagon 測定用です。	内容
● 41~10,000pg/mLの範囲を測定できます。	1)抗体固相化プレート
● 測定は20~24時間(4℃)と1.5時間で終了します。	2)Glucagon標準品
検体量50μLの場合は44~48時間(4℃)と1.5時間	3)ビオチン化Glucagon
● 41検体をduplicateで測定できます。	4)SA-HRP 溶液
● 血漿サンプルの測定が可能です。	5)基質溶解液
● プレートは一行(8ウエル)ずつ取り外しができますので	6)OPD錠
キットの分割使用が可能です。	7)酵素反応停止液
● 検体量は100μLです(50μLでも測定可能)。	8)緩衝液(A)
	9)緩衝液(B)
	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12ヶ月は安定です。

II. 特徴

本キットはラット、マウス及びヒト血漿に含まれる膵glucagonを特異的に定量するためのキットです。

本キットによる膵glucagon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を備えております。なお、添付の標準膵glucagon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。

<特異性>

本キットは膵glucagonに特異的であり、腸管glucagon、glucagon like peptide/GLP-1やGLP-2との交差反応性を認めません。

<2日法>

測定は20～24時間(4℃)と1.5時間で終了します。

検体量50 μ Lの場合は44～48時間(4℃)と1.5時間で終了します(3日法)。

<測定原理>

本EIAは、特異性の高い膵glucagonポリクローナル抗体を用いた競合反応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ウエルプレート各ウエルには抗膵glucagon特異抗体が固定化されています。この各ウエルに標準膵glucagonまたは検体、ついでビオチン化膵glucagon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が形成されます。最後にこの複合体中の酵素(HRP)活性を測定することにより、検体中の膵glucagon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. Antibody coated plate (抗体固相化プレート)	ドライプレート	96ウェルプレート 1枚	ウサギ抗 Glucagon特異抗体
2. Glucagon standard (Glucagon標準品)	凍結乾燥品	1本	合成 Glucagon(10ng/vial)
3. Labeled antigen (ビオチン化Glucagon)	凍結乾燥品(6mL用)	1本	ビオチン化 Glucagon
4. SA-HRP solution (SA-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トリス緩衝液
5. Substrate buffer (基質溶解液)	26mL	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
6. OPD tablet (OPD錠)	錠剤	2錠	o-フェニレンジアミン
7. Stopping solution (酵素反応停止液)	12mL	1本	1M 硫酸溶液
8. Buffer solution (A) (緩衝液(A))	10mL	1本	血清を含むリン酸緩衝液
9. Buffer solution (B) (緩衝液(B))	10mL	1本	非特異反応除去剤を含むリン酸緩衝液
10. Washing solution (Concentrated) (濃縮洗浄液)	50mL	1本	1%Tween20を含む濃縮生理食塩水
11. Adhesive foil (プレート密閉用シール)		4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
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:
Glucagon標準品に1mLの緩衝液(A)を加えて溶解し、10000 pg/mLの標準液とする。これを緩衝液(A)にて3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(A)1.0mLで希釈し3333 pg/mLの標準液とする。以下同様の希釈操作を繰り返し、10000、3333、1111、370、123、41pg/mLの各標準液を調製する。0 pg/mLの標準液は緩衝液(A)をそのまま用いる。
2. ビオチン化 Glucagon溶液の調製法:
使用時にビオチン化 Glucagonに 6mL の緩衝液(B)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 12mL 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(20~30°C)にもどす。
Glucagon標準液、ビオチン化 Glucagon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. 各ウエルに標準液または検体100 μ Lを分注し、ついでビオチン化 Glucagon溶液50 μ Lを加える。
3. マイクロタイタープレートをプレート密閉用シールでシールし、4°Cで20~24時間反応を行う。
4. 各ウエル中の液を除き、350 μ Lの洗浄液を満たした後、アスピレータにより吸引するか、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完全に液を除く。この洗浄操作をさらに2回繰り返し、合計3回の洗浄操作を行う。
5. 各ウエルにSA-HRP溶液100 μ Lを加える。
6. マイクロタイタープレートをプレート密閉用シールでシールし、室温(20~30°C)で1時間反応を行う。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。
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. 各ウエル中の液を除き、4.と同様の洗浄操作を合計3回行う。
9. 各ウエルに上記調製法により調製した発色剤溶液100 μ Lを入れ、室温で20分間反応を行う。
10. 各ウエルに酵素反応停止液100 μ Lを入れる。
11. マイクロプレート用吸光度計にて490nmの吸光度を測定する。市販のソフトウェアを用いて、4(or 5)-Parameter、もしくはLog-Logitの回帰式を使用し、Glucagon標準液の測定値から標準曲線を作成し、検体中のGlucagon測定値を標準曲線にあてはめ、Glucagon濃度を算出する。
片対数方眼紙を用いる場合は、横軸(Log側)に標準液の濃度を、縦軸(linear側)に標準液各濃度の吸光度をプロットし、標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、Glucagonの濃度を読み取る。

[検体量50 μ Lでの測定方法]

<使用器具および装置><試薬の調製>は前述とまったく同様です。<測定操作>のみ下記手順に従ってください。

1. キットの内容を室温(20~30°C)にもどす。
Glucagon標準液、ビオチン化 Glucagon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. 各ウエルに標準液または検体50 μ Lを分注し、ついでビオチン化 Glucagon溶液50 μ Lを加え

る。

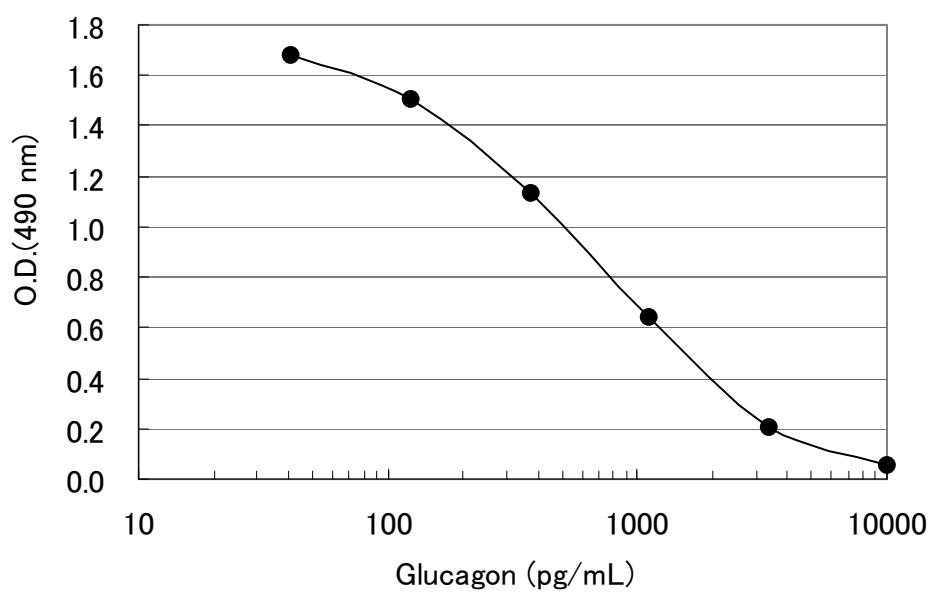
3. マイクロタイタープレートをプレート密閉用シールでシールし、4°Cで44～48時間反応を行う。
4. 以降の操作は前述<測定操作>の4. 以降とまったく同様に実施してください。

V. 操作上の注意

1. グルカゴンは血中の蛋白分解酵素によって分解され易いので、被検血漿採血時には、EDTA 加血液採血後、ただちに血液1mL あたり蛋白分解酵素阻害剤(アプロチニン)500KIU を添加して攪拌混合したのち、血漿分離し、直ちに測定してください。やむを得ない場合にはポリプロピレンチューブ等に小分けし、密栓して凍結保存してください。凍結検体は-30°C以下で保存し、測定開始直前に解凍してください。なお、検体の凍結融解の繰り返しは出来る限り避けてください。
2. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、Glucagon標準品およびビオチン化Glucagon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Glucagon標準液およびビオチン化Glucagon溶液は適宜小分けして、-30°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. 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注入する場合は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、希釈段階ごとにならず新しいチップを使ってください。
5. 10ng/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(A)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器を用いて振とうしてください(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. 酵素-基質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(ヒト血漿)

Sample No.	Glucagon added (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)
1	0	316	316	—
2	200	536	516	110
3	500	856	816	108
4	1000	1316	1316	101

- 同時再現性 CV(%) 3.3~5.1
- 日差再現性 CV(%) 7.3~18.9

測定濃度範囲: 41pg/mL~10,000pg/mL

Ⅶ. 貯蔵法および有効期間

- <貯蔵> 2～8℃にて保存してください。
- <有効期間> 製造日より12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. Unger, R.H., Eisentraut, A.M., McCall, M.S., Keller, S., Lanz, H.C. and Madison, L.L. (1959): Glucagon antibodies and their use for immunoassay for glucagon. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **102**:621 - 623
2. Unger, R.H., Eisentraut, A.M., McCall, M.S. and Madison, L.L. (1961): Glucagon antibodies and an immunoassay for glucagon. *J. Clin. Invest.*, **40**:1280-1289
3. Nishino, T., Kodaira, T., Shin, S., Imagawa, K., Shima, K., Kumahara, Y., Yanaihara, C. and Yanaihara, N.(1981): Glucagon radioimmunoassay with use of antiserum to glucagon C-terminal fragment. *Clin. Chem.*, **27**:1690-1697
4. Jaspan, J.B., and Rubenstein, A.H. (1977): Circulating glucagon: Plasma profiles and metabolism in health and disease. *Diabetes.*, **26**:887-902
5. 奥野儀一、大根田昭、島健二 編 (1993) 「グルカゴン関連ペプチド」 pp. 52 - 65. 医歯薬出版、東京.

<お問い合わせ先>

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉2480-1

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

www.yanaihara.co.jp

ask@yanaihara.co.jp

2020年2月14日改訂