

研究用試薬

YK142 Mouse GLP-2 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	5～6
V.	操作上の注意	7
VI.	基本性能	8～9
VII.	貯蔵法および有効期間	9
VIII.	文献	10

YK142: Mouse GLP-2 EIA キット

I. はじめに

cDNA の構造より明らかにされたグルカゴン前駆体のプログルカゴン分子は、N 端よりグリセニンチン関連ペプチド (GRPP) に続き、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド (GLP) -1、GLP-2 と並ぶペプチド配列から構成されています。このグルカゴン前駆体のプロセッシングは膵と腸管で異なり、膵では GRPP とグルカゴンが、また腸管においては、主として GRPP とグルカゴンが連結したグリセニンチン、グルカゴンの C 端に 8 アミノ酸残基を持つオキシントモジュリン、GLP-1 および GLP-2 がそれぞれ生成されます。それぞれのペプチドの生理活性については既に多くの報告がありますが、GLP-2 については主として腸管における細胞増殖活性が近年報告され、注目されています。

当研究所ではすでにラット GLP-2 およびヒト GLP-2 の EIA 測定キットを開発しています。今回開発したマウス GLP-2 の簡易測定キットは GLP-2 に特異性の高い抗体を用い、マウス血清および血漿中の GLP-2 を精度良く測定できるアッセイ系であります。

YK142 Mouse GLP-2 EIA キット

- | | |
|--------------------------------------|----------------|
| ▼ 0.412~100 ng/mL の範囲で測定できます。 | 内容 |
| ▼ 測定は 1 晩 (16-18 時間) + 1.5 時間で終了します。 | 1) 抗体固定化プレート |
| ▼ 41 検体を duplicate でアッセイできます。 | 2) 標準品 |
| ▼ 血清、血漿サンプルの測定ができます。 | 3) 標識抗原 |
| ▼ プレートは 1 列 (8 ウェル) を取り外しできます | 4) 特異抗体 |
| のでキットの分割使用が可能です。 | 5) SA-HRP 溶液 |
| 同時再現性 | 6) 基質溶解液 |
| マウス血清 CV (%) 4.9 ~ 8.8 | 7) OPD 錠 |
| マウス血漿 CV (%) 3.5 ~ 6.0 | 8) 酵素反応停止液 |
| 日差再現性 | 9) 緩衝液 |
| マウス血清 CV (%) 11.0 ~ 14.7 | 10) 濃縮洗浄液 |
| マウス血漿 CV (%) 4.9 ~ 16.0 | 11) プレート密閉用シール |
| 保存と安定性 | |
| 2~8°C で保存してください。 | |
| 製造日より 19 ヶ月は安定です。 | |

II. 特 徴

本キットは、マウスの血清及び血漿中に含まれる GLP-2 (1-33) および GLP-2 (3-33) の両方を定量的に測定します。本キットによるマウス GLP-2 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の多くの利点を備えています。なお、添付の標準マウス GLP-2 は高純度の合成品であり、表示の重量は絶対量を示しています。

<特異性>

本キットは、マウス GLP-2 に特異的であり、マウスグルカゴンおよびマウス GLP-1 とは 300 pmol/mL の高濃度においても交差反応性を認めません。

<測定原理>

本アッセイ系は特異性の高いウサギ抗ラット GLP-2 抗体との高い交差反応性を利用した競合反応に基づくもので、ビオチンとアビジンの高親和性を応用し、発色を組み合わせで確立した測定法であります。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おり、この各ウェルに標準マウス GLP-2 (または検体)、ビオチン化ラット GLP-2 及び上記抗 GLP-2 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、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酵素 (HRP) 活性を測定することにより、検体中のマウス GLP-2 濃度を求めることができます。測定範囲は 0.412 ~ 100 ng/mL となっています。

III. キットの構成

試薬・器具	形状	規格	内容物	
1. Antibody coated plate (抗体固定化プレート)		96 ウエルプレート 1 枚	抗ウサギ IgG を 固定化したプレート	
2. Mouse GLP-2 standard (標準品)	凍結乾燥品	50 ng	1 本	合成マウス GLP-2
3. Labeled antigen (標識抗原)	凍結乾燥品		1 本	ビオチン化ラット GLP-2
4. GLP-2 Antibody (特異抗体)	液状	6 mL	1 本	ウサギ抗ラット GLP-2 抗体
5. SA-HRP solution (SA-HRP 溶液)	液状	12 mL	1 本	HRP 結合ストレプトアビ ジンおよび非特異反応除去 剤を含むトリス HCl 緩衝液
6. Substrate buffer (基質溶解液)	液状	26 mL	1 本	0.015%過酸化水素を含む 0.1 M リン酸-クエン酸 緩衝液 (pH 5.0)
7. OPD tablet (OPD 錠)	錠剤		2 錠	o-フェニレンジアミン錠
8. Stopping solution (酵素反応停止液)	液状	12 mL	1 本	1 M 硫酸溶液
9. Buffer solution (緩衝液)	液状	25 mL	1 本	非特異反応除去剤を含むト リス HCl 緩衝液
10. Washing solution (concentrated) (濃縮洗浄液)	液状	50 mL	1 本	1% Tween 20 を含む 濃縮生理食塩水
11. Adhesive foil (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) マイクロプレートの吸光度計(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) マイクロプレート用振とう器。
- 3) マイクロプレート用洗浄器、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 (25、50、100、200 および 1,000 μ L)。
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ガラス製の試験管。
- 6) メスシリンダー(1,000 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 0.5 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くり返し、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 9 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したがって使用する。

<測定操作>

- 1) キットの内容物を室温にもどす。
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したがって調製する。
- 2) 各ウエルに標識抗原溶液 75 μ L を入れ、ついで標準液または検体 25 μ L を加え、さらに特異抗体 50 μ L を加える。
- 3) 測定プレートをしールし、4°C で 1 晩 (16-18 時間) 静置する。
- 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完全に液を除く。この洗浄操作を 3 回行う。
- 5) 各ウエルに SA-HRP 溶液 100 μ L を入れる。
- 6) 測定プレートをしールし、室温 (20~30°C) で 1 時間振とうする。
- 7) 6) の反応終了直前に OPD 錠剤を基質溶解液で溶解し、発色剤溶液を調製する。
- 8) 各ウエル中の液を除き、4) と同様の洗浄操作を 5 回行う。
- 9) 各ウエルに発色剤溶液 100 μ L を入れ、室温 (20~30°C) で 30 分間反応する。
- 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 490 nm 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、マウス GLP-2 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、検体の濃度を求める。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、マウス GLP-2 の濃度を読み取る。

V. 操作上の注意

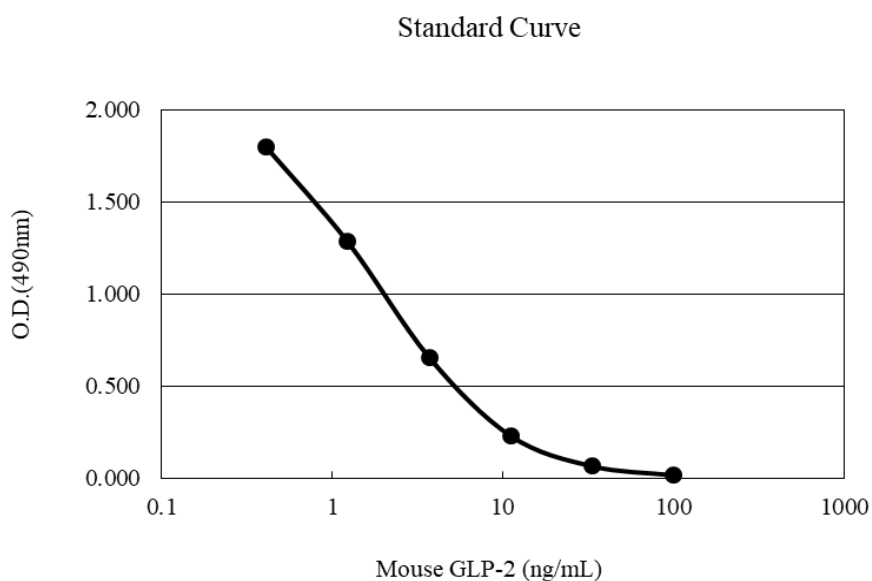
- 1) 血液検体はただちに測定に測定してください。採血後ただちに測定出来ない場合は血清もしくは血漿分離後、最初に小分けして -30°C 以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。
- 2) 試薬は用時調製を原則としてください。
- 3) 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。
- 4) 各ウエルの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行ってください。また各検体をウエルに注入する場合は各検体ごとに新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。標準液を希釈するときは、希釈段階ごとにならぬ新し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釈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ください(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) 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、標識抗原)は -30°C にて凍結保存してください。
- 9) 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。
- 10) 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定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合わせて使用しないでください。

VI. 基本性能

<測定範囲> 測定濃度範囲 0.412 ng/mL ~ 100 ng/mL

0.412ng/mL を下回るような低値の検体が予想される場合、検出限界として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 の範囲の測定値は精度的な面から概算値としてご使用ください。

<標準曲線の一例>



<添加回収試験>

マウス血清

Added mouse GLP-2 (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0	0.98		
2	2.80	2.98	94.0
5	5.59	5.98	93.5
20	20.24	20.98	96.5

マウス血漿

Added mouse GLP-2 (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0	1.13		
2	2.89	3.13	92.3
5	5.73	6.13	93.5
20	22.36	21.13	105.8

<再現性試験>

同時再現性

マウス血清 CV(%) 4.9 ~ 8.8

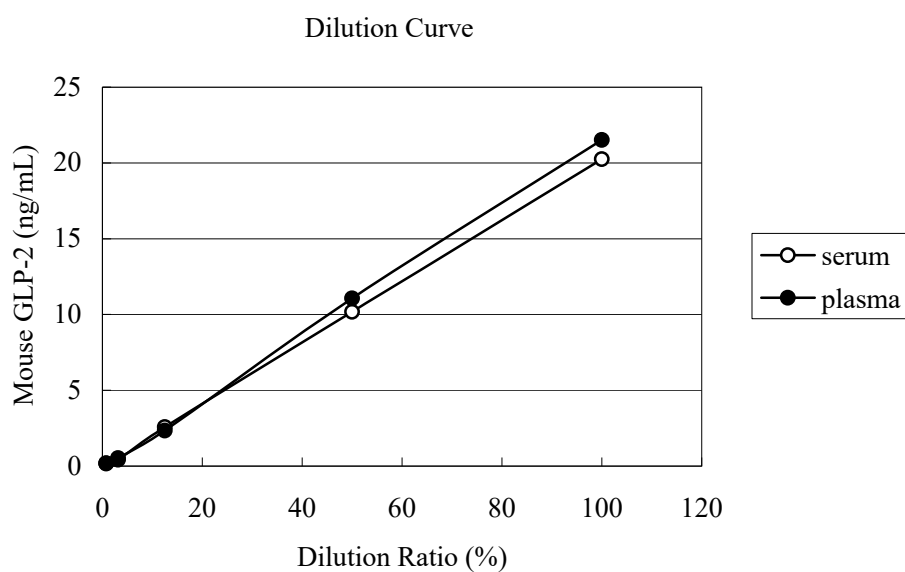
マウス血漿 CV(%) 4.2 ~ 6.0

日差再現性

マウス血清 CV(%) 11.0 ~ 14.7

マウス血漿 CV(%) 4.9 ~ 16.0

<希釈試験>



VII. 貯蔵法および有効期間

<貯法>

遮光し、2~8℃にて保存してください。

<有効期間>

製造日より 19 ヶ月

<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) Philippe J. : Structure and pancreatic expression of the insulin and glucagon genes. *Endocr Rev* **12**: 252-271, 1991
- 2) Mojsov S. et al: Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies the level of post-transcriptional processing. *J Biol Chem* **261**: 11880-11889, 1986
- 3) Drucker D. J. et al: Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7911-7916, 1996
- 4) Brubaker PL, et al: Circulating and tissue forms of intestinal growth factor, glucagon-like peptide 2. *Endocrinology* **15**: 673-677, 1997
- 5) Drucker D. J. : Perspective in diabetes Glucagon-like peptides. *Diabetes* **47**: 159-169, 1998
- 6) Xiao Q, et al: Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology* **117**: 99-105, 1999
- 7) Kato I, et al: Synthesis of Rat Glucagon-like peptide (GLP)-2 and its biological and immunochemical studies. *Peptide Science* **1999**: N.Fujii (Ed). The Japanese Peptide Society (2000)

<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

<http://www.yanaihara.co.jp/> ask@yanaihara.co.jp

2020年3月5日改訂