研究用試薬

YK161　Total GLP-1-HS ELISA

（Mouse, Rat & Human Total GLP-1 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	8～11
Ⅶ.	貯蔵法および有効期間	12
Ⅷ.	文献	12～13

YK161 Total GLP-1-HS ELISA 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ペプチド配置は、グリセンチン関連膵ペプチド（GRPP）に続き、グルカゴン、GLP-1、GLP-2 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により膵では GRPP とグルカゴンが、また腸管においては、主としてグリセンチン、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。GLP-1 につきましては、GLP-1(7-37) および GLP-1(7-36)amide が今までに知られているインスリン分泌増強物質の中でもっとも強力な活性を有していることがわかっています。このうち GLP-1(7-36)amide が主として生体内で存在している形と考えられています。

これら活性型 GLP-1 と呼ばれる生理活性を示す GLP-1 は、血中において酵素である DPP-4 による非常に速やかな限定的分解を受ける事で生理活性を失い、不活性型 GLP-1 となる事が知られています。

本キットは活性型 GLP-1 並びに不活性型 GLP-1 の両 GLP-1 の測定を行う事で、DPP-4 による影響を受けない血中の Total GLP-1 の定量を可能にしています。

YK161 Total GLP-1-HS ELISA キット

▼ GLP-1 測定用です。
▼ 1.235～300pM の範囲で測定できます。
▼ 測定は 1 晩+1+0.5 時間+30 分で終了します。
▼ 41 検体を duplicate でアッセイできます。
▼ 血漿および培養液の測定が可能です。
▼ 検体量は 25μL です(マウス血漿 10μL)。
▼ プレートは 1 列（8 ウエル）毎に取り外しできますのでキットの分割使用が可能です。

保存と安定性
2～8℃で保存してください。
製造日より 24 ヶ月間は安定です。

1）測定プレート
2）標準品
3）標識特異抗体溶液
4）SA-HRP 溶液
5）酵素基質液
6）酵素反応停止液
7）緩衝液
8）濃縮洗浄液
9）プレート密閉用シール

Ⅱ. 特　　徴

本キットはマウス、ラットおよびヒト血漿に含まれる Total GLP-1 を定量的に測定するものです。本キットによる Total GLP-1 の測定は簡便で、しかも特異性、定量性にすぐれ、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。

〈特異性〉

本キットはマウス、ラットおよびヒト Total GLP-1 に特異的であり、ラットおよびヒト GLP-2、ラット Glicentin、ヒト Glucagon、ラット、マウスおよびヒト GIP(1-42)、ラットおよびヒト GIP(3-42)との交差反応性を認めません。

GLP-1 フラグメントに対する交差反応性は、GLP-1(7-36)amide を 100%とした場合、GLP-1(1-36)amide および GLP-1(9-36)amide には同等の反応性を有しますが、GLP-1(1-37)、GLP-1(7-37)との交差反応性はそれぞれ 9.1%、9.4%です。

＜測定原理＞

本キットによる Total GLP-1 の測定はサンドイッチ法に基づいて行います。測定プレート（96 ウエル）の各ウエルにはウサギ抗 GLP-1 ポリクローナル抗体が固定化されています。この各ウエルに標準液または検体を入れ、抗原抗体複合体を形成させ、さらにビオチン標識ウサギ抗 GLP-1 ポリクローナル抗体と反応させ、サンドイッチ複合体を形成させます。このサンドイッチ複合体に HRP 結合ストレプトアビジンを反応させます。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 GLP-1 濃度を求めることができます。

Ⅲ.　キットの構成

試薬・器具	形状	規格	内容物
1）Antibody coated plate （測定プレート）		1 枚(96 ウエル)	ウサギ抗 GLP-1 抗体 固定化プレート
2）Standard （標準品）	凍結乾燥品	1 本(300fmol)	GLP-1(7-36)amide
3）Biotin labeled antibody solution （標識特異抗体溶液）	液状	1 本(12mL)	ビオチン化ウサギ GLP-1 抗体および非特異的反応 除去剤を含むトリス緩衝液
4）SA-HRP solution （SA-HRP 溶液）	液状	1 本(12mL)	HRP 標識ストレプトアビジン
5）Enzyme substrate solution （酵素基質液）	液状	1 本(12mL)	3,3’,5,5’-テトラメチルベンジジン(TMB)
6）Stopping solution （酵素反応停止液）	液状	1 本(12mL)	1M H_2SO_4
7）Buffer solution （緩衝液）	液状	2 本(20mL x 2)	非特異的反応除去剤を含む トリス緩衝液
8）Washing solution (concentrated) （濃縮洗浄液）	液状	1 本(50mL)	1% Tween 20 を含む 濃縮生理食塩液
9）Adhesive foil （プレート密閉用シール）		4 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. マイクロピペットおよびチップ(25～1,000μL)；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 450nm で吸光度 3.0 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ガラス製の試験管
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(1,000mL)
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 に緩衝液を 1mL 加え内容物を溶解させ、300pM の標準液を調製する。この標準液から 0.1mL をとり、これを緩衝液 0.2mL で希釈し、100pM の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、33.3、11.1、3.70、1.24pM の各標準液を調製する。0pM の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
2. マウス血漿の希釈（ｘ5 倍希釈液）
   ガラス製のチューブに緩衝液 80μL を入れ、マウス血漿 20μL を加え、よく撹拌する。ラットおよびヒト血漿の希釈は不要です。
3. 洗浄液の調製法：濃縮洗浄液 50mL(全量)を 950mL の蒸留水にて希釈し使用する。
4. 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℃）に戻す。
   標準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、洗浄液 350μL 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 回の洗浄操作を行う。

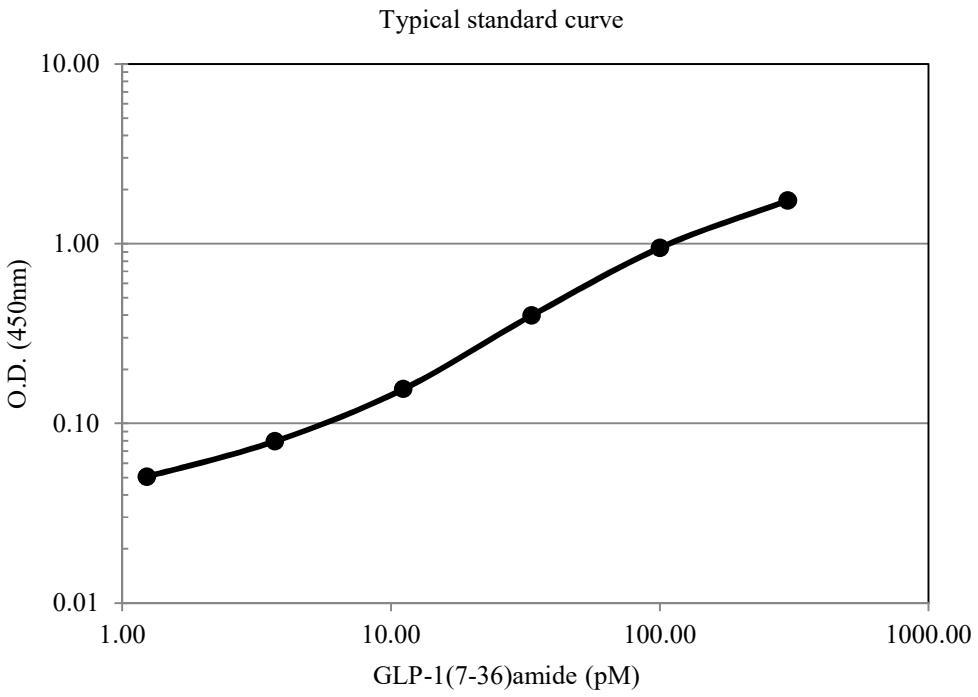
3. ＜ヒトおよびラット血漿（培養液）・マウス培養液＞
   各ウエルに緩衝液 100μL を入れ、ついで標準液または検体 25μL を加える。標準液の分注を始めてから検体の分注を終えるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください(30 分以内)。
   ＜マウス血漿＞
   各ウエルに緩衝液 200μL を入れ、ついで標準液またはマウス血漿 5 倍希釈液 30μL を加える。標準液の分注を始めてから検体の分注を終えるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください(30 分以内)。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 18 時間振とうする（約 100rpm)。
5. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 3 回行う。
6. 各ウエルに標識特異抗体溶液 100μL を加える。
7. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 1 時間振とうする（約 100rpm)。
8. 必要量の酵素基質液を使用する約 1 時間前に分取し、遮光状態で室温に戻す。
9. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 3 回行う。
10. 各ウエルに SA-HRP 溶液 100μL を加える。
11. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 30 分間振とうする（約 100rpm)。
12. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を 4 回行う。
13. 各ウエルに酵素基質液 100μL を加え、遮光状態で静置し、室温で 30 分間反応させる。
14. 各ウエルに酵素反応停止液 100μL を入れる。
15. マイクロプレート用吸光度計で 450nm の吸光度を測定する。
16. 市販のソフトウェアを用いて、5（or 4）－Parameter の回帰式を使用し、GLP-1 標準液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、検体の GLP-1 濃度を求める。両対数方眼紙を用いる場合は、横軸に標準液の濃度を、縦軸に標準液各濃度の吸光度をプロットして標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、GLP-1 の濃度を読み取る。希釈マウス血漿サンプルの場合、読み取った濃度を 5 倍し、元の Total GLP-1 の濃度を求める。

Ⅴ． 操作上の注意

1. 血液はEDTA-2Na添加採血管で採取してください。血液検体は採取後、血漿を分離し、直ちに測定してください。直ちに測定できない場合は血漿を適宜小分けして、－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。なお、同じ血液検体について他のキットを用いて活性型GLP-1のみを測定される場合は、DPP-4 inhibitor を血液検体へ添加してください（最終濃度100 μM)。DPP-4 inhibitorの本測定系への影響はございません。
2. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品は調製後、直ちに使用してください。キットを分割使用する場合、溶解後の標準品の保存にはガラス製の容器(バイアル瓶等)をお使いください。分割使用の際は300pMの標準液から新たに希釈調製を行ってください。溶解後の標準品（300pM）は 4℃の冷蔵保存および－30℃以下の凍結保存で約4週間安定です。
3. 標準液の分注を始めてから検体の分注を終えるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください(30分以内)。
4. 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。
5. 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、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。
6. 300pM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。
7. 反応には必ずマイクロプレート用振とう機を用い、測定プレートを振とうしてください（呈色反応の場合を除く)。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ってください（約100rpm)。
8. 測定はすべて2重測定で行ってください。
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. 各試薬の保存中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。
13. 酵素基質液は遮光状態で室温に戻した後、使用してください。

Ⅵ.　基本性能

＜標準曲線の一例＞



＜添加回収試験＞

＜ヒト血漿 A＞

Added GLP-1(7-36)amide (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0.00	3.41		
5.00	8.43	8.41	100.24
20.00	23.06	23.41	98.51
100.00	106.36	103.41	102.85

＜ヒト血漿 B＞

Added GLP-1(7-36)amide (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0.00	4.30		
5.00	9.15	9.30	98.39
20.00	23.01	24.30	94.69
100.00	98.45	104.30	94.39

＜ヒト血漿 C＞

Added GLP-1(7-36)amide (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0.00	7.99		
5.00	13.33	12.99	102.62
20.00	28.99	27.99	103.57
100.00	116.98	107.99	108.33

＜ヒト血漿 D＞

Added GLP-1(7-36)amide (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0.00	21.03		
5.00	26.32	26.03	101.11
20.00	39.00	41.03	95.05
100.00	114.36	121.03	94.49

＜ラット血漿 A＞

Added GLP-1(7-36)amide (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0.00	11.31		
5.00	14.87	16.31	91.17
20.00	26.47	31.31	84.54
100.00	82.86	111.31	74.44

＜ラット血漿 B＞

Added GLP-1(7-36)amide (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0.00	7.91		
5.00	11.81	12.91	91.48
20.00	22.82	27.91	81.76
100.00	81.87	107.91	75.87

＜マウス血漿 A＞

Added GLP-1(7-36)amide (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0.00	2.85		
5.00	7.43	7.85	94.65
20.00	20.08	22.85	87.88
100.00	82.36	102.85	80.08

＜マウス血漿 B＞

Added GLP-1(7-36)amide (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0.00	2.93		
5.00	7.21	7.93	90.92
20.00	20.53	22.93	89.53
100.00	83.53	102.93	81.15

＜マウス血漿 C＞

Added GLP-1(7-36)amide (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0.00	4.18		
5.00	8.78	9.18	95.64
20.00	21.72	24.18	89.83
100.00	80.73	104.18	77.49

＜マウス血漿 D＞

Added GLP-1(7-36)amide (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0.00	2.97		
5.00	7.39	7.97	92.72
20.00	19.71	22.97	85.81
100.00	78.44	102.97	76.18

＜マウス血漿 E＞

Added GLP-1(7-36)amide (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0.00	4.10		
5.00	8.78	9.10	96.48
20.00	21.83	24.10	90.58
100.00	87.80	104.10	84.34

＜希釈試験＞

	Dilution ratio	Observed (pM)	Estimated (pM)	Recovery (%)
ヒト血漿 1	x 1.0	27.62		
	x 2.0	15.73	31.46	113.90
	x 4.0	7.14	28.56	103.40
	x 8.0	3.08	24.64	89.21
ヒト血漿 2	x 1.0	37.22		
	x 2.0	20.65	41.30	110.96
	x 4.0	10.66	42.64	114.56
	x 8.0	5.24	41.92	112.63
ヒト血漿 3	x 1.0	32.07		
	x 2.0	15.78	31.56	98.41
	x 4.0	7.14	28.56	89.06
	x 8.0	3.18	25.44	79.33
ヒト血漿 4	x 1.0	15.31		
	x 2.0	8.52	17.04	111.30
	x 4.0	3.96	15.84	103.46
	x 8.0	1.41	11.28	73.68

	Dilution ratio	Observed (pM)	Estimated (pM)	Recovery (%)
ラット血漿 1	x 1.0	14.87		
	x 2.0	6.17	12.34	82.99
	x 4.0	2.89	11.56	77.74
	x 8.0	1.32	10.56	71.02
ラット血漿 2	x 1.0	10.30		
	x 2.0	4.93	9.86	95.73
	x 4.0	2.32	9.28	90.10
	x 8.0	1.03	8.24	80.00

＜再現性試験＞

同時再現性：ヒト血漿　CV(%) 1.98 － 5.43

同時再現性：マウス血漿 CV(%) 4.87 － 4.98

日差再現性：ヒト血漿　CV(%) 2.21 － 3.84

日差再現性：マウス血漿 CV(%) 4.86 － 9.76

＜交差反応性＞

GLP-1 fragments	Crossreactivity(%)
GLP-1 (7-36) amide	100
GLP-1 (9-36) amide	100
GLP-1 (1-36) amide	100
GLP-1 (1-37)	9.1
GLP-1 (7-37)	9.4

Related peptides	Crossreactivity(%)
Rat GLP-2	<0.1
Human GLP-2	<0.1
Rat Glicentin	<0.1
Human Glucagon	<0.1
Rat GIP (1-42)	<0.1
Mouse GIP (1-42)	<0.1
Human GIP (1-42)	<0.1
Rat GIP (3-42)	<0.1
Human GIP (3-42)	<0.1

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 24 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. Bell, GI. (1983) Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature.,* **304**, 368-371
2. Mojsov, S. (1986) Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies the level of post-transcriptional processing. *J Biol Chem.,* **261**, 11880-11889
3. Kreymann, B. (1987) Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*., **2**, 1300-1304
4. Orskov, C. (1994) Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes.,* **43**, 535-539
5. Jaakko Makinen, Jarna C. Hannukainen, Anna Karmi, Heidi M. Immonen, Minna Soinio, Lassi Nelimarkka, Nina Savisto, Mika Helmio, Jari Ovaska, Paulina Salminen, Patricia Iozzo, Pirjo Nuutila (2015) Obesity-associated intestinal insulin resistance is ameliorated after bariatric surgery. *Diabetologia.,* **58**, 1055-1062.
6. N Higuchi, T Hira, N Yamada, H Hara (2013) Oral administration of corn zein hydrolysate stimulates GLP-1 and GIP secretion and improves glucose tolerance in male normal rats and Goto-Kakizaki rats. *Endocrinology*., **154**, 3089-98.
7. Hira T, Ikee A, Kishimoto Y, Kanahori S, Hara　H. (2015) Resistant maltodextrin promotes fasting glucagon-like peptide-1 secretion and production togetherwith glucose tolerance in rats. Br J Nutr., **11**,1-9.
8. Shibata E, Aoki K, Tajima K, Taguri M, Terauchi Y.(2016) Comparison of efficacy and safety of taking miglitol dissolved in water during a meal and taking a miglitol tablet just before a meal in patients　with type 2 diabetes. *Expert Opin Pharmacother*., **17**,889-94.
9. Smith K, Karimian Azari E, LaMoia TE, Hussain T, Vargova V, Karolyi K, Veldhuis

PP, Arnoletti JP, de la Fuente SG, Pratley RE, Osborne TF, Kyriazis GA.(2018) T1R2 receptor-mediated glucose sensing in the upper intestine potentiates glucose absorption through activation of local regulatory pathways. *Mol Metab*., **17**, 98-111.

10. Nakagawa T, Nagai Y, Yamamoto Y, Miyachi A, Hamajima H, Mieno E, Takahashi M, Inoue E, Tanaka Y. (2019) Effects of anagliptin on plasma glucagon levels and gastric emptying in patients with type 2 diabetes: An exploratory randomized controlled trial versus metformin. *Diabetes Res Clin Pract.,***158**, 107892.
11. A Sato , Y Ohtsuka , Y Yamanaka (2019) Morning Mastication Enhances Postprandial Glucose Metabolism in Healthy Young Subjects. *Tohoku J Exp Med.,* **249** (3):193-201.

＜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
2020 年 9 月 18 日改訂