

Active Ghrelin ELISA Kit

本キットを使用する前に、この添付文書をよく読んで下さい。

【概要】

グレリンは、視床下部からの成長ホルモン分泌を亢進させるアシル化されたペプチドです。寒川（国立循環器病センター研究所）らによってラット胃から単離され、28アミノ酸残基からなるペプチドとして同定されました。N末端から3番目のセリン残基がオクタン酸で修飾されており、この修飾が活性発現に不可欠です。

本キットは2 site Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を測定原理とし、活性型グレリンを特異的に測定します。ヒト及びラット/マウスのオクタノイル化グレリン(1-28)を測定することができます。本キットは寒川らの特異抗体とプロトコルを用いて設計されています。（特許：PCT WO 01/07475 A1）

【使用目的】

活性型グレリン濃度測定

注意：本キットは研究用試薬です。診断の用途には用いないで下さい。

【キットの構成】

1. Standard (Lyophilized)	1 本
※正確な含量は表示値表をご覧ください。	
2. Assay buffer	22 mL
3. Antibody coated plate	96 ウェル
4. HRP conjugated antibody	250 μ L
5. HRP dilution buffer	22 mL
6. Substrate solution	22 mL
7. Stop reagent (0.5 mol/L H_2SO_4)	6 mL
8. Washing buffer concentrate	40 mL

【必要な器具・器械及び試薬】

- プレートウォッシャーまたはアスピレーター等の洗浄液を吸引できる器具
- プレートリーダー（450 nm での吸光度測定が可能なもの）
- ボルテックスミキサー

【検体の準備】

グレリンは不安定な物質であり、保存状況によってはペプチドの分解や活性維持に必須であるオクタン酸の脱離が容易に起こります。活性型グレリンの分解や脱離を防ぐためには、蛋白質分解酵素とエステラーゼの両者を阻害することが必要です。以下にヒト血液検体採取法の例を示します。

採血は アブチン / EDTA 入り採血管で行います。採血後速やかに転倒混和し血漿分離します（1500 $\times$ g, 15 min at 4°C）。得られた血漿に直ちに 1/10 量の 1 mol/L 塩酸を加え撹拌します。すぐに使用しない場合は-40°C以下で保存して下さい。

※：全血 1 mL あたりアブチン 500 KIU (Kallikrein Inhibitor Unit) と EDTA・2Na 1.25 mg を添加するものです。

【試薬の調製】*

- Washing buffer concentrate を 20 倍容の精製水で希釈し、洗浄液とします。希釈した洗浄液は使用時以外冷蔵保存とし、2 週間以内に使い切して下さい。
- Standard を 1 mL の精製水で復水し標準品 No. 1 を調製します。これをさらに下記のように希釈します。

標準品	Standard	Assay buffer
No. 2	No. 1 $\rightarrow$ 500 μ L +	500 μ L
No. 3	No. 2 $\rightarrow$ 500 μ L +	500 μ L
No. 4	No. 3 $\rightarrow$ 500 μ L +	500 μ L
No. 5	No. 4 $\rightarrow$ 500 μ L +	500 μ L
No. 6	No. 5 $\rightarrow$ 500 μ L +	500 μ L
No. 7	No. 6 $\rightarrow$ 500 μ L +	500 μ L

Standard には約 160 fmol のヒト活性型グレリンが含まれています（詳しくは同梱の表示値表をご覧ください）。上記の希釈で概略 2.5 ~ 160 fmol/mL の標準曲線が作成できます。

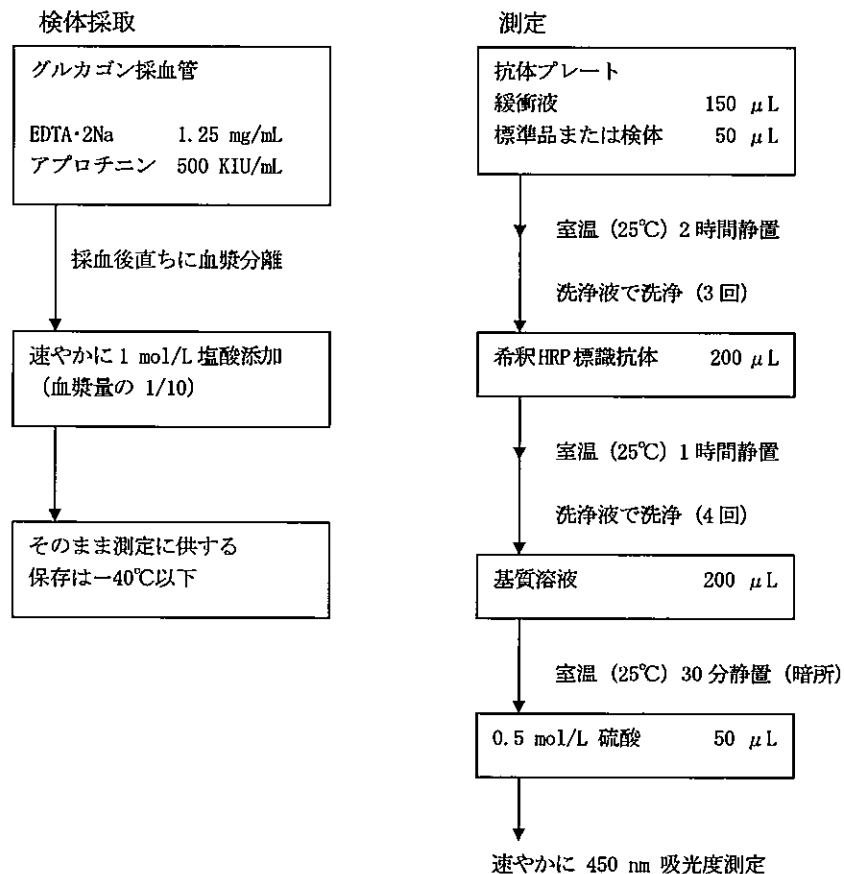
- HRP conjugated antibody を 100 倍容の HRP dilution buffer で希釈し、希釈 HRP conjugated antibody とします。（必要量のみ使用する 1 時間以上前に調製し、当日中に使用して下さい。）

【操作方法】*

使用する試薬は測定前に全て室温に戻して下さい。測定操作中は Antibody coated plate が乾燥しないよう注意して下さい。

- 150 μ L の Assay buffer を Antibody coated plate の各ウェルに分注します。更に検体及び希釈済み Standard 50 μ L を分注、撹拌します。ブランクとして Assay buffer 50 μ L を同様に分注します。サンプルは 2 重測定することを推奨します。Antibody coated plate にシールをして室温で 2 時間静置します。
- Antibody coated plate を洗浄液で 3 回洗浄します。洗浄液量：400 μ L/回。各回とも、ウェルに洗浄液を加えた後 1 分程度静置してから吸引して下さい。洗浄後、Antibody coated plate を逆さにしてペーパータオル上で叩くなどして、残液を完全に除去します。次に希釈 HRP conjugated antibody を 200 μ L ずつ添加します。Antibody coated plate にシールをして室温で 1 時間静置します。
- Antibody coated plate を洗浄液で 4 回洗浄します。洗浄液量：400 μ L/回。各回とも、ウェルに洗浄液を加えた後 1 分程度静置してから吸引して下さい。洗浄後、Antibody coated plate を逆さにしてペーパータオル上で叩くなどして、残液を完全に除去します。次に Substrate solution を 200 μ L ずつ添加します。Antibody coated plate にシールをして室温で 30 分暗所保存します。各ウェルに Stop reagent (0.5 mol/L 硫酸) を 50 μ L 加え撹拌します。
※洗浄については至適条件が使用機器によって異なります。洗浄回数および洗浄液を加えた後の静置時間を検討されることを推奨します。
- 反応停止後速やかに 450 nm の吸光度を測定します。
- 標準品の吸光度から検量線を作成し、検体中活性型グレリン濃度を計算します。検体に塩酸を添加した場合は、測定結果に 1.1 を乗じて容量補正を行って下さい。

Active Ghrelin ELISA プロトコール



【一般注意事項】*

1. 本品は研究用試薬です。診断用途には使用できません。
2. 生体試料を取り扱う際は感染性物質に対する防護に配慮して下さい。また、測定に使用した検体および検体が付着した器具・用具等は次のいずれかの方法で処理を行って下さい。
 - 1) 121℃ で1時間オートクレーブにかける。
 - 2) 1% の次亜塩素酸溶液に一夜浸漬する。
 - 3) 2% のグルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸漬する。
3. Substrate solution は酸化物質の汚染に鋭敏です。取り扱う際は金属、ガラス器具を用いず、バクテリア等の汚染に注意して下さい。また必要以上に光にさらされないような取り扱い、保管に心がけて下さい。

4. Stop Reagent は 0.5 mol/L 硫酸を含有しています。取り扱いに注意して下さい。また、試薬の誤飲や粘膜への付着を防ぐよう、保護眼鏡やゴム手袋などの保護具を使用して下さい。万一皮膚などに直接触れた場合は直ちに水で洗い流して下さい。
5. 試薬は 2～8℃で保存し、必ず室温に戻してから使用して下さい。また、使用しないストリップは直ちにアルミ袋に戻して下さい。
6. 外箱記載のロット番号が異なるキットの構成試薬を組み合わせ使用しないで下さい。
7. 使用期限（外箱に記載）の切れたキットは使用しないで下さい。
8. Assay buffer 及び Washing buffer concentrate buffer については保管温度によっては不溶物が出現することがありますが、室温または 30℃程度の加温により溶解することで使用できます。
9. 高値検体の希釈は Assay buffer を使用して下さい。

【貯法及び使用期限】

貯 法：2～8℃、遮光保存。

使用期限：包装箱に表示。

【包装単位】

96 回用

【主要文献】

1. Kojima, M. et al. : Nature, 402 : 656, 1999
2. Inui, A. : Nat. Rev. Neurosci., 2 : 551, 2001
3. Date, Y. et al. : Endocrinology, 141 : 4255, 2000
4. Gualillo, O. et al. : Endocrinology, 142 : 788, 2001
5. Matsumoto, M. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 287 : 142, 2001
6. Hosoda, H. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 279 : 909, 2000

【文献請求・お問い合わせ先】

セティ株式会社
〒100-0013 東京都千代田区霞が関 3-6-7
Tel. 03-5510-2652
Fax. 03-5510-0133

SCETI

発売元* 株式会社LSIメディエンス
東京都千代田区内神田一丁目13番4号

販売元† セティ株式会社
東京都千代田区霞ヶ関 3-6-7