

## Desacyl- 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、デスアシル型グレリンを特異的に測定します。ヒト及びラット/マウスのデスアシル型グレリン(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】

デスアシルグレリン濃度測定

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ください。

## 【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 $\mu$ L |
| 5. HRP dilution buffer                                      | 22 mL       |
| 6. Substrate solution                                       | 22 mL       |
| 7. Stop reagent (0.5 mol/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) | 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が容易に起こります。デスアシル型グレリンの分解を防ぐためには、蛋白質分解酵素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77°ヘリン / 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 ×g, 15 min at 4°C)。

※：全血1mLあたり77°ヘリン 500 KIU(Kallikrein Inhibitor Unit)とEDTA・2Na 1.25 mgを添加するものです。

活性型グレリン測定用に1/10量の1 mol/L塩酸を加えた血漿検体は、そのまま使用できます。すぐに使用しない場合は-40°C以下で保存して下さい。

## 【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 → 500 $\mu$ L + | 500 $\mu$ L  |
| No. 3 | No. 2 → 500 $\mu$ L + | 500 $\mu$ L  |
| No. 4 | No. 3 → 500 $\mu$ L + | 500 $\mu$ L  |
| No. 5 | No. 4 → 500 $\mu$ L + | 500 $\mu$ L  |
| No. 6 | No. 5 → 500 $\mu$ L + | 500 $\mu$ L  |
| No. 7 | No. 6 → 500 $\mu$ L + | 500 $\mu$ L  |

Standardには約800 fmolのヒトデスアシル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12.5 ~ 800 fmol/mLの標準曲線が作成できます。

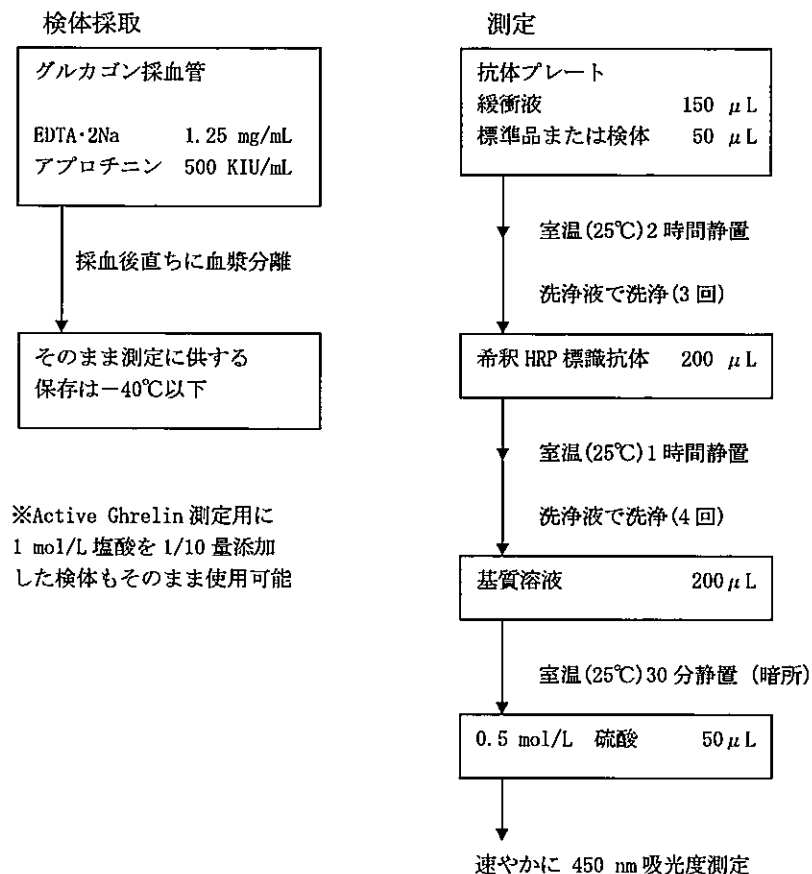
- HRP conjugated antibodyを100倍容のHRP dilution bufferで希釈し、希釈HRP conjugated antibodyとします。（必要量のみ使用する1時間以上前に調製し、当日中に使用して下さい。）

## 【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  $\mu$ 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  $\mu$ Lを分注、攪拌します。ブランクとしてAssay buffer 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L加え攪拌します。  
※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、検体中デスアシル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。

## Desacyl-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・用具類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% の次亜塩素酸液に一夜浸漬する。
  - 3) 2% のグルタルアルデヒドに 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

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

**SCETI**