

研究用試薬

YK060 Insulin ELISA

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 Email: 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	11
VIII.	文献	12

YK060: Insulin ELISA キット

I. はじめに

インスリン ELISA キットは、ヒト、ウサギおよびイヌ血清インスリン濃度を測定できる簡便で安定な測定系です。インスリン前駆体、プロインスリンは B 細胞内でプロセッシングを受け、インスリンと C-ペプチドを生成した後、ほぼ等モル比で血中に放出されます。本キットは、固定化抗体に高力価のモルモット抗ヒトインスリン抗体を、第 2 抗体にビオチン化モルモット抗ヒトインスリン抗体をそれぞれ用い、組換えヒトインスリンを標準抗原とし、発色に西洋わさび過酸化酵素 (HRP) 標識ストレプトアビジンを用いることにより、ヒト、ウサギおよびイヌ血清中のインスリン濃度 (IR-インスリン) の測定を可能にしました。本キットは、膵 B 細胞機能の変化を検討する上で、極めて有効に使用できます。

YK060 Insulin ELISA キット

▼ 0.137~100 ng/mL の範囲で測定できます。	内容
▼ 40 検体を duplicate で測定できます。	1) 測定プレート
▼ 測定は 16~20 時間 (4°C) と 4 時間で終了します。	2) 標準品
▼ 血清サンプルの測定ができます。	3) 標識特異抗体液
▼ 検体量は 25 µL です。	4) SA-HRP 溶液
▼ プレートは 1 列 (8 ウェル) 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。	5) 基質溶解液
	6) OPD 錠
	7) 酵素反応停止液
	8) 緩衝液
	9) 濃縮洗浄液
	10) 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 22 ヶ月間は安定です。

Ⅱ．特 徴

本キットは、血清に含まれるインスリン濃度（IR-インスリン）を定量的に測定するためのものです。本キットによる IR-インスリン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います。なお、表示の重量は絶対量を示しております。

<特異性>

本キットはヒトインスリン、ウサギインスリンおよびイヌインスリンに対して 100%の交差反応性が認められます。また、ヒトプロインスリンに対して 20%の交差反応性が認められます。

<測定原理>

本キットによるインスリンの測定はサンドイッチ法に基づいて行ないます。96 ウェルプレートの各ウェルには、モルモット抗ヒトインスリン抗体が固定化されています。このプレートに標準液または検体を入れ、抗原抗体複合体を形成させ、さらにビオチン化モルモット抗ヒトインスリン抗体と反応させサンドイッチ複合体を形成させます。その複合体に HRP 標識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インスリン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. 測定プレート		96 ウエルプレート 1 枚		モルモット抗ヒトインスリン抗体固定化プレート
2. 標準品	凍結乾燥品	100 ng	1 本	ヒトインスリン
3. 標識特異抗体液	液状	12 mL	1 本	ビオチン化モルモット抗ヒトインスリン抗体
4. SA-HRP 溶液	液状	12 mL	1 本	安定剤を含むトリス塩酸緩衝液に溶解した HRP 結合ストレプトアビジン
5. 基質溶解液	液状	24 mL	1 本	0.015% 過酸化水素を含む 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.0)
6. OPD 錠	錠剤		2 錠	o-フェニレンジアミン
7. 酵素反応停止液	液状	12 mL	1 本	1M 硫酸溶液
8. 緩衝液	液状	25 mL	1 本	非特異的反応除去剤を含む リン酸緩衝液
9. 濃縮洗浄液	液状	50 mL	1 本	1% Tween 20 を含む濃縮生理食塩液
10. 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戻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 μ L ~ 1 mL) ; 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 490 nm (492nm でも可) で吸光度 2.5 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ポリプロピレン製の試験管またはガラス試験管
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(1000 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 1 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 0.2 mL をとり、これを緩衝液 0.4 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繰り返し、11.11、3.70、1.23、0.41、0.137 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。
※IU 換算では、100 ng/mL = 0.0024 IU/mL です。
2. 発色剤溶液の調製法：使用時に基質溶解液 11 mL に OPD 錠 1 錠を加え溶解させ使用する。
3. 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。
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>

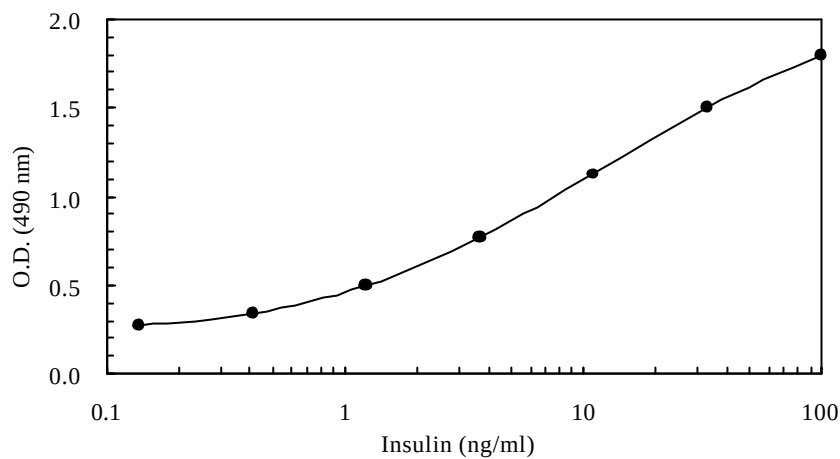
1. キット内容を室温(20～30℃)に戻す。
標準液、および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. 各ウェルに、洗浄液 350 μL を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに3回繰り返し、合計4回の洗浄操作を行なう。
3. 各ウェルに緩衝液 150 μL を入れ、ついで標準液または検体 25 μL を加える。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、4℃で一晩(16～20時間)静置する。
5. 測定プレートを室温に戻した後(約30分)、各ウェル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計4回行なう。
6. 各ウェルに標識特異抗体液 100 μL 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2時間振とうする。
8. 各ウェル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計4回行なう。
9. 各ウェルにSA-HRP溶液 100 μL を加える。
10. 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。
11. 10.の反応終了直前にOPD錠を基質溶解液で溶解し、発色剤溶液を調製する。
12. 各ウェル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計4回行なう。
13. 各ウェルに発色剤溶液 100 μL を加え、室温で30分間反応させる。
14. 各ウェルに酵素反応停止液 100 μL を加える。
15. マイクロプレート用吸光度計にて490 nm (492nmでも可)の吸光度を測定する。
16. 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、インスリン標準液の各濃度(8ポイント)の測定値から標準曲線を作成し、検体のインスリン濃度を求める。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、インスリンの濃度を読み取る。

V. 操作上の注意

1. 血液検体は採取後、血清を分離し、直ちに測定してください。直ちに測定できない場合は血清を適宜小分けして、 -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。特に、標準品は調製後、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、調製後の標準品は適宜小分けして、 -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. 各ウェ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なってください。また検体をウェ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、希釈段階ごとにかならず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なってください。
7. 測定はすべて2重測定で行なってください。
8. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行なってください。
9. 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。
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

<標準曲線の一例>



<添加回収試験>

<ヒト血清A>

Added Insulin (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.00	1.42		
0.37	1.83	1.79	102.23
3.33	4.77	4.75	100.42
10.00	11.55	11.42	101.14

<ヒト血清B>

Added Insulin (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.00	3.39		
0.37	3.77	3.76	100.27
3.33	5.85	6.72	87.05
10.00	10.65	13.39	79.54

<ヒト血清C>

Added Insulin (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.00	0.30		
0.37	0.68	0.67	101.49
3.33	3.52	3.63	96.97
10.00	10.07	10.30	97.77

<ヒト血清 D>

Added Insulin (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.00	0.24		
0.37	0.53	0.61	86.89
3.33	3.13	3.57	87.68
10.00	7.86	10.24	76.76

<ヒト血清 E>

Added Insulin (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.00	0.56		
0.37	0.88	0.93	94.62
3.33	3.55	3.89	91.26
10.00	8.81	10.56	83.43

<ヒト血清 F>

Added Insulin (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.00	1.71		
0.37	2.11	2.08	101.44
3.33	4.83	5.04	95.83
10.00	11.04	11.71	94.28

<ウサギ血清 A>

Added Insulin (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.00	0.20		
0.37	0.65	0.57	114.04
3.33	4.39	3.53	124.36
10.00	9.54	10.20	93.53

<ウサギ血清 B>

Added Insulin (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.00	1.13		
0.37	1.70	1.50	113.33
3.33	4.16	4.46	93.27
10.00	11.95	11.13	107.37

<ウサギ血清 C>

Added Insulin (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.00	0.58		
0.37	1.05	0.95	110.53
3.33	3.49	3.91	89.26
10.00	9.79	10.58	92.53

<イヌ血清 A>

Added Insulin (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.00	1.11		
0.37	1.70	1.48	114.86
3.33	7.09	4.44	159.68
10.00	17.11	11.11	154.01

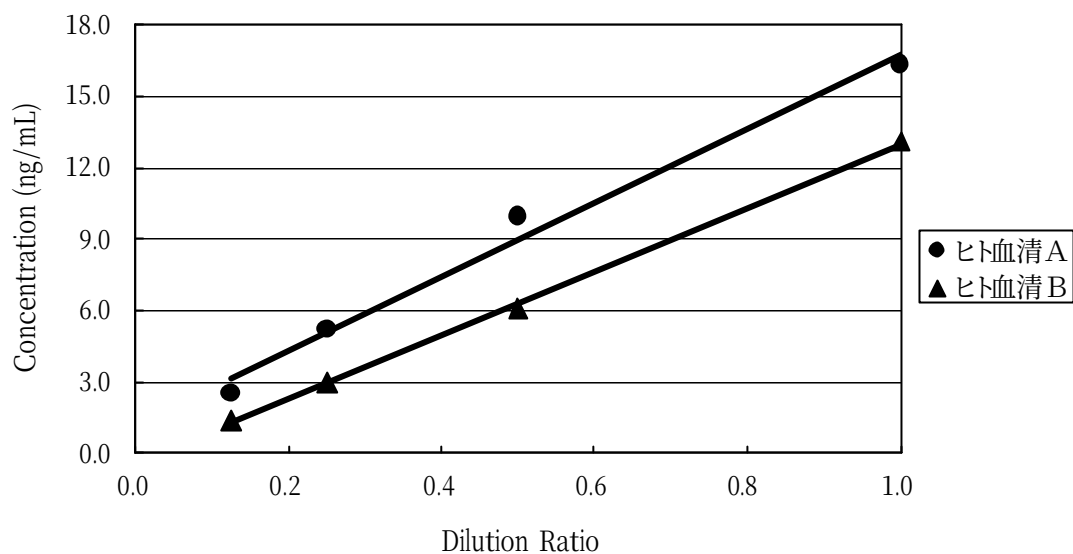
<イヌ血清 B>

Added Insulin (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.00	2.30		
0.37	2.81	2.67	105.24
3.33	7.31	5.63	129.84
10.00	16.20	12.30	131.71

<イヌ血清 C>

Added Insulin (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.00	1.76		
0.37	2.44	2.13	114.55
3.33	7.61	5.09	149.51
10.00	20.73	11.76	176.28

<希釈試験>



<再現性試験>

同時再現性

ヒト血清 CV(%) 6.59~7.10

ウサギ血清 CV(%) 2.51~9.08

イヌ血清 CV(%) 1.39~8.58

日差再現性

ヒト血清 CV(%) 6.86~11.86

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 22 ヶ月間（使用期限は外箱に表示）

<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. G. I. Bell, R. L. Pictet et al., Sequence of the human insulin gene. Nature 284: 26, 1980
2. Y. Zhang et al., Ionic mechanisms underlying abnormal QT prolongation and the associated arrhythmias in diabetic rabbits: A role of rapid delayed rectifier K⁺ current. Cell Physiol Biochem 19: 225-238, 2007

<お問合せ先>

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

2009 年 6 月 25 日改訂