

研究用試薬

YK011 Mouse C - Peptide I 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

． はじめに	2
． 特徴	3
． キットの構成	4
． 操作法	4～5
． 操作上の注意	6
． 基本性能	7～9
． 貯蔵法および有効期間	10
． 文献	10

YK011 Mouse C-Peptide I EIA キット

．はじめに

C-ペプチドは、インスリン生合成前駆体であるプロインスリンの膵B細胞内でのプロセッシングによって生じる副産物です。インスリンと等モル比で血中に放出されるので、血中C-ペプチド濃度を測定することによって、膵B細胞のインスリンの分泌機能を推測することができます。C-ペプチドの半減期はインスリンのそれよりかなり長いという特徴を持っていることから、代謝が速いインスリンの代わりにC-ペプチドを測定することはインスリン分泌量をより正確に知るための指標となり臨床で広く利用されています。C-ペプチドの測定は臨床的にはインスリン治療中糖尿病患者のB細胞機能の評価（インスリン測定の前代用）のみならず、低血糖状態の鑑別診断、高インスリン血症の鑑別診断、インスリン分泌総量の推定、膵摘出後残存膵の有無の判定などにも応用されています。その他、インスリン受容体異常症や異常インスリン血症等インスリン代謝が大きく影響される病態では、C-ペプチドの測定はインスリンの測定よりはるかに重要となります。

また、長らく生理的活性がなく、ただインスリンの生合成副産物と考えられていたC-ペプチドについて近年の研究では、細胞の表面と特異的に結合し、Ca²⁺の細胞内への流入を促進し、MAP kinase、Na⁺、K⁺-ATPase や eNOS を活性化するなどの結果が報告されています。動物実験ではさらに糖尿病合併症の予防、心臓の虚血・再灌流傷害の保護効果、1型糖尿病ラットにおける神経再生能力低下の防止、およびインスリン仲介細胞の成長促進や高濃度グルコースによる細胞アポトーシスの保護などが観測されています。これらの成果から、今後C-ペプチドの生理活性研究はかつてないほど注目されてくるものと予測されます。

当研究所ではすでにラットC-ペプチドの測定キットを開発しています。マウスもラットと同様、2種類のC-ペプチドが存在します。今回開発したマウスC-ペプチドの簡易測定キットは、マウスC-ペプチドIIとは反応しないIのみを認識する抗体を用い、ビオチン化マウスC-ペプチドIを標識抗原とすることにより、マウスの血清、血漿および尿中のC-ペプチドI濃度を特異的に測定することを可能にしました。本EIAキットはマウス体内のC-ペプチドIの変動を検討する上で、極めて有効に使用できます。

当研究所ではマウスC-ペプチド（YK012）、マウスC-ペプチド（総C-ペプチド、+）(YK013)の測定キットも現在販売しています。

YK011 Mouse C-Peptide I EIA キット	内容
<p>0.617 ~ 50 ng/mL の範囲で測定できます。 測定は 16 ~ 18 時間 (4) と 2.5 時間で終了します。 42 未知検体を duplicate で測定できます。 血漿・血清・尿サンプルの測定ができます。 検体量は 25 μL です。 プレートは一列 (8 ウェル) ずつ取り外しができますので、キットの分割使用が可能です。 同時再現性 CV(%) 血清 3.1 ~ 4.9 血漿 5.6 ~ 7.5 尿 3.4 ~ 4.6 日差再現性 CV(%) 血清 4.7 ~ 8.8 血漿 4.8 ~ 8.1 尿 5.3 ~ 11.3 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。</p>	<p>1) 測定プレート 2) 標準品 3) 標識抗原 4) 特異抗体 5) 緩衝液 6) SA-HRP 溶液 7) 基質溶解液 8) OPD 錠 9) 酵素反応停止液 10) 濃縮洗浄液 11) プレート密閉用シール</p>

・ 特徴

本キットはマウスの血漿・血清および尿に含まれるマウス C-ペプチド I を直接的且つ特異的に定量するためのキットです。操作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があります。なお、添付の標準マウス C-ペプチド I は高純度合成品 (純度 98% 以上) であり、表示の重量は絶対量を示しております。

また、ビオチン化マウス C-ペプチド I は、HPLC により精製した N -biotinylglycylglycyl mouse C-peptide I を使用しています。

< 特異性 >

本キットはマウス C-ペプチド II と 6.3%、マウスインスリンと 6.5%、ラット C-ペプチド I と 156.4%、ラット C-ペプチド II と 114.6%、ラットインスリンと 7.4% の交差反応性が認められます。ヒトとイヌの C-ペプチドとの交差反応性は認められません。本キットでもラット C-ペプチドを測定することはできますが、標準品が異なりますので、ラットのサンプルを測定する場合、弊社のラット C-ペプチド測定キット YK010 をご利用ください。

< 測定原理 >

本キットは特異性の高い C-ペプチド I ポリクロナール抗体を用いた競合法に、ビオチンとストレプトアビジンの非常に高い親和性を利用した測定法です。

測定プレートの各ウェルには、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体が固定化されています。この各ウェルに標準マウス C-ペプチド I または検体、ビオチン化マウス C-ペプチド I およびウサギ抗マウス C-ペプチド I ポリクロナール抗体を順次加えて競合反応させます。これに HRP(horse-radish peroxidase) 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 HRP 活性を測定することにより、検体中のマウス免疫活性 C-ペプチド I 濃度を求めることができます。

．キットの構成

試薬	形状	規格	内容物
測定プレート	プレート	96 穴プレート 1 枚	ヤギ抗ウサギ IgG 抗体固定化プレート
標準品	凍乾品	50 ng、1 本	合成マウス C-ペプチド I 凍結乾燥品
標識抗原	凍乾品	11mL 用、1 本	ビオチン化マウス C-ペプチド I、凍結乾燥品
特異抗体	液状	6mL、1 本	ウサギ抗マウス C-ペプチド I 抗体溶液
緩衝液	液状	20mL、1 本	非特異反応除去剤を含むリン酸緩衝液
SA-HRP 溶液	液状	12mL、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ربتアビジン
基質溶解液	液状	26mL、1 本	0.015%過酸化水素を含む 0.1M クエン酸緩衝液
OPD 錠	錠剤	10mg/錠、2 錠	o-フェニレンジアミン
酵素反応停止液	液状	12mL、1 本	1M 硫酸溶液
濃縮洗浄液	液状	50mL、1 本	1% Tween 20 を含む濃縮生理食塩液
プレート密閉用シール		3 枚	

．操作法

< 必要な器具および装置 >

1. マイクロピペットおよびチップ (25 μ L ~ 1mL); 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 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

標準品に緩衝液 1 mL を加え溶解し、50ng/mL (Std-1)の標準液を調製する。調製した STd-1 から 0.1 mL を取り、予め緩衝液 0.2mL を添加したポリプロピレンチューブまたはガラス製試験管に加え 3 倍段階希釈して、16.667 (Std-2)、5.556 (STd-3)、1.852(Std-4)、0.617 (Std-5) ng/mL の各標準液を調製する (注: <測定範囲> 欄を参照してください)。B₀ (0 ng/mL) は緩衝液をそのまま使用する。

2. 標識抗原溶液の調製法

使用時に標識抗原に緩衝液 11 mL を加え溶解して使用する。

3. 洗浄液の調製法

濃縮洗浄液全量 50 mL を蒸留水または脱イオン水 950 mL にて希釈し使用する。

4. 溶液の調製法

使用時に基質溶解液 12 mL を取り、OPD を 1 錠加え溶解して使用する。

5. 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. 測定する前、キットの内容のすべてを室温 (20~30) にて 1 時間以上放置し室温に戻す。標準液、標識抗原溶液、発色剤溶液および洗浄液を上記調製法に従って調製する。
2. 測定プレートの所定ウエルに標準液または検体 25 μ L を入れる。次いで標識抗原溶液 100 μ L および特異抗体 50 μ L を順次加える。
3. プレートをしっかりとシールし、4 にて 16~18 時間静置する。
4. プレートをさらに室温にて振とうさせながら 1 時間反応を行なう。
5. 各ウエル中の液を除き、洗浄液 350 μ L を加えた後、アスピレーターにより吸引するか、また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 回の洗浄操作を行なう。
6. 各ウエルに SA-HRP 溶液 100 μ L を加える。
7. プレートをシールし、振とうさせながら室温にて 1 時間反応を行なう。反応が終了する約 5 分前から OPD 1 錠を基質溶解液で溶解し、発色剤溶液を予め調製しておく。
8. 各ウエル中の液を除き、5.と同様の洗浄操作を 5 回行なう。
9. 各ウエルに発色剤溶液 100 μ L を加え、室温にて 30 分間反応する。
10. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μ L を加える。
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。

<測定値の算出>

1. X 軸に標準液の濃度、Y 軸に各標準液の吸光度値もしくは B_0 に対する B (結合値) ($B/B_0\%$) を取ってプロットする。各プロット間に回帰曲線を当てはめ、標準曲線を作成する。
2. 被検検体の吸光度値もしくは B_0 に対する B (%) を標準曲線に当てはめその濃度を読み取る。

・ 操作上の注意

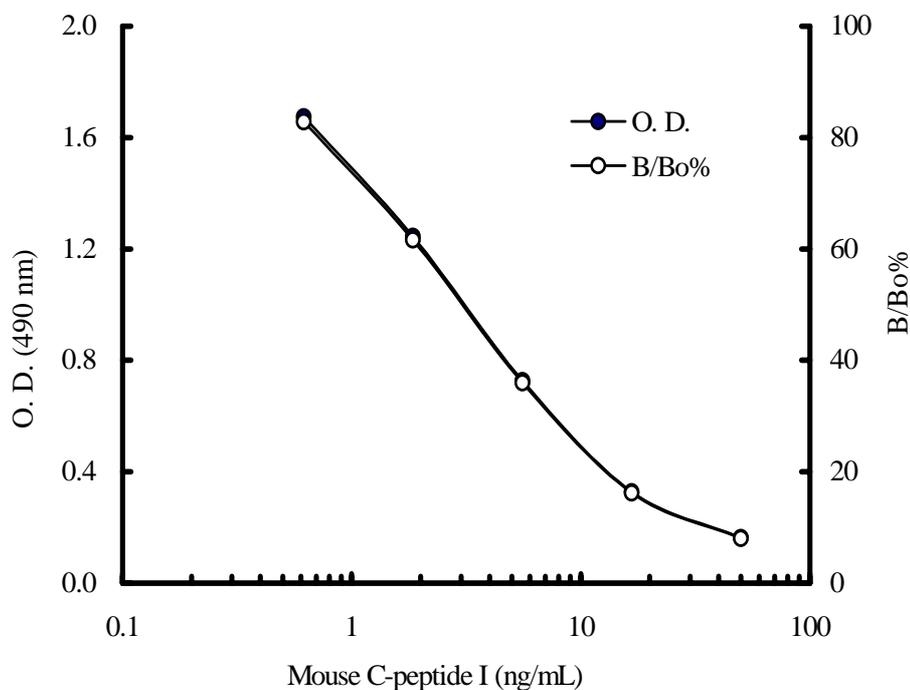
1. 被検血漿・血清は採血後、ただちに測定してください。血漿は EDTA を入れた採血管で採血してください。採血後ただちに測定できない場合は血漿または血清分離後、検体の凍結融解を繰り返さないよう、最初に小分けして-30 以下で凍結保存してください。
2. 試薬は、用時調製（希釈）を原則とし、また調製ごとに新しい容器を使用してください。キットは分割使用が可能です。溶解された試薬（標準品および標識抗原）の残りは 1 週間以内に使用する場合は 2~8 にて保存してください。それ以上長期保存する場合は-30 以下に凍結してください。
3. 各ウエルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行なってください。また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。
4. 2 キット(2 プレート)以上を操作する場合も、各プレートごとに標準曲線を作成してください。なお、異なるロットのキットを組み合わせでの使用は避けてください。
5. 標準液、検体ともに測定は二重測定で行なってください。
6. 50 ng/mL を超えた高値検体または 50 ng/mL を超える高濃度が予想される検体の場合は、検体を本キット添付の緩衝液で希釈して測定（再測定）してください。尿検体の場合、予め 10~100 倍程度希釈してから測定してください。
7. 各反応ステップは必ずシェーカーかマイクロタイタープレート用振とう機を用い反応を行なってください（最初の 4 での反応および呈色反応は静置でよい）。
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. 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。また、洗浄中ウエルにごみが入らないように注意を払う必要があります。
10. 酵素基質の発色レベルは、反応温度、時間、プレートの振とうの程度などでわずかながら影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定毎に作成してください。
11. 各試薬の保存もしくは使用中に、強い光が当たらないように注意してください。

基本性能

<測定範囲> 有効測定範囲 0.617 ng/mL ~ 50 ng/mL

0.617 ng/mL を下回るような低値の検体が予想される場合、検出限度としてさらに 0.617 ng/mL の標準液を 3 倍希釈し 0.206 ng/mL の標準液を設けることができます。この場合、0.206 ng/mL ~ 0.617 ng/mL の範囲の測定値の精度は上記有効測定範囲ほど高くはありませんので、概算値として使用してください。

<標準曲線例>

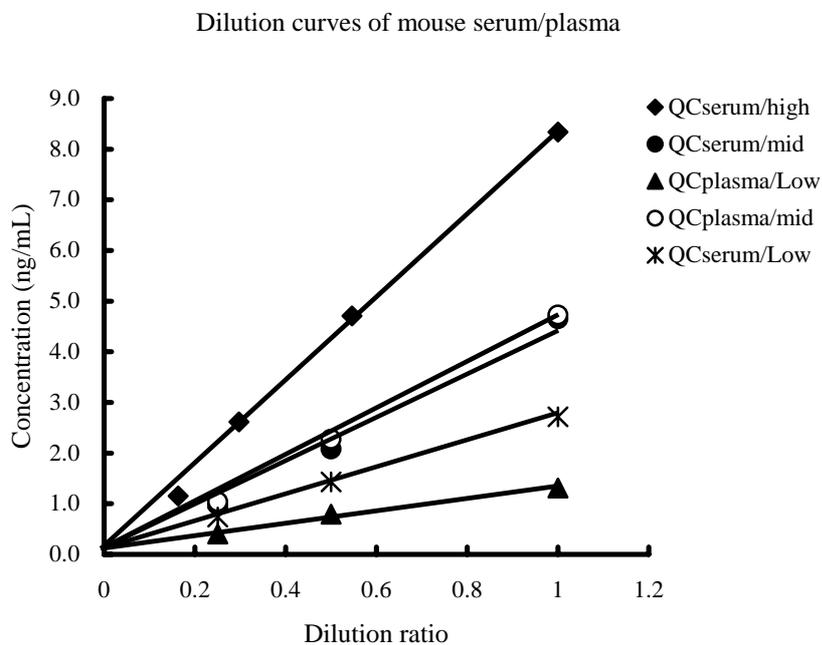


<再現性>

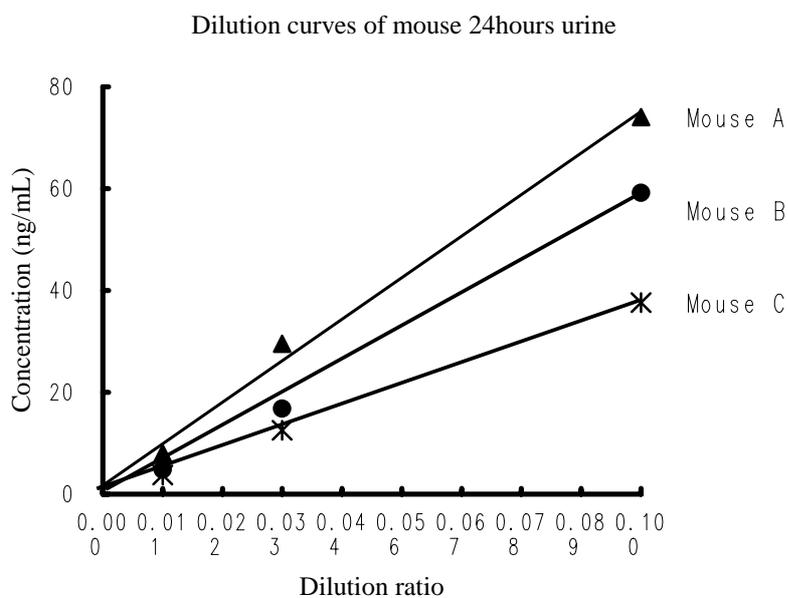
同時再現性 CV(%)	血漿	5.6 ~ 7.5
	血清	3.1 ~ 4.9
	尿	3.4 ~ 4.6
日差再現性 CV(%)	血漿	4.8 ~ 8.1
	血清	4.7 ~ 8.8
	尿	5.3 ~ 11.3

< 希釈試験 (Dilution) >

血清/血漿の場合 (Low: 標準品非添加、Mid & High: 標準品添加)



マウスの24時間採取した尿を10倍、30倍、90倍に希釈した場合



注：尿サンプルは24時間採取したマウスの尿を緩衝液で30倍に希釈してから添加回収試験に使用した

< 添加回収試験 >

Sample No.	Mouse C-peptide Added (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
Mouse serum No.1	0.00	1.97		
	1.85	3.82	3.82	100.0
	5.56	8.60	7.53	114.2
	16.67	23.03	18.64	123.6
Mouse serum No.2	0.00	1.89		
	1.85	3.73	3.74	99.7
	5.56	7.94	7.44	106.7
	16.67	22.22	18.55	119.8
Mouse serum No.3	0.00	2.32		
	1.85	4.06	4.17	97.3
	5.56	8.40	7.87	106.7
	16.67	22.38	18.98	117.9
Mouse EDTA plasma No. 4	0.00	1.82		
	1.85	3.64	3.67	99.2
	5.56	7.55	7.37	102.4
	16.67	22.95	18.49	124.1
Mouse EDTA plasma No. 5	0.00	1.75		
	1.85	3.42	3.60	95.0
	5.56	7.87	7.31	107.7
	16.67	22.30	18.42	121.1
Mouse EDTA plasma No. 6	0.00	1.34		
	1.85	3.15	3.19	98.6
	5.56	7.17	6.89	104.0
	16.67	19.73	18.01	109.6
Mouse EDTA plasma No. 7	0.00	1.71		
	1.85	3.60	3.57	100.9
	5.56	7.53	7.27	103.5
	16.67	18.45	18.38	100.4
Mouse Urine No.8	0.00	1.97		
	1.85	3.82	3.82	100.0
	5.56	8.60	7.53	114.2
	16.67	23.03	18.64	123.6
Mouse Urine No.9	0.00	1.89		
	1.85	3.73	3.74	99.7
	5.56	7.94	7.44	106.7
	16.67	22.22	18.55	119.8
Mouse Urine No.10	0.00	2.32		
	1.85	4.06	4.17	97.3
	5.56	8.40	7.87	106.7
	16.67	22.38	18.98	117.9

・ 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）

・ 文献

1. Wahren, J. et al: C-peptide makes a comeback, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 19 (5), 345-347, 2003
2. Pierson, CR. et al: Proinsulin C-peptide replacement in type 1 diabetic BB/Wor-rats prevents deficits in nerve fiber regeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 62 (7), 765-79, 2003
3. Li, ZG. et al: C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 19 (5), 375-85, 2003
4. Johansson, J. et al: Molecular effects of proinsulin C-peptide, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 295, 1035-1040, 2002
5. Lindon, H. et al: C-peptide exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 279 (4), 1453-1459, 2000
6. 松田万幸、岡 芳知：C-ペプチド(CPR), *日本臨床* 57 巻, 1999 年増刊号, 広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査 (4), 313-316, 1999
7. Wentworth, BM. et al: Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin, *J. Mol. Evol.*, 23 (4), 305-312, 1986
8. Yanaihara, C. et al: Immunoreactive rat C-peptide I and II in glucose perfusate of isolated pancreas. In: *Insulin* (ed. Brandenburg, D., and Wollmer, A.), Walter de Gruyter & Co., Berlin, 651-657, 1980
9. Yanaihara, C. et al: Immunological studies on synthetic rat and guinea pig C-peptide. In: *Proinsulin, Insulin, C-peptide* (ed. Baba, S., Kaneko, S., and Yanaihara, N.), Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, 87-93, 1979

< お問い合わせ先 >

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770 TEL: 0544-22-2771

Website: www.yanaihara.co.jp E-mail: ask@yanaihara.co.jp

2009年9月30日改訂