

研究用試薬

YK160 GLP-1 EIA

(Rat, Mouse & HumanGLP-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
VII. 貯蔵法および有効期間	9
VIII. 文献	9

YK160: GLP-1 EIA 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、グルカゴン様ペプチド (GLP) -1、そして 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 及び 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)及び 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 のほうが生体内で存在している形と考えられています。

YK160 GLP-1 EIA キット	内容
▼ Rat, Mouse, Human GLP-1 測定用です。	1) 測定プレート
▼ 0.206~50 ng/mL の範囲で測定できます。	2) 標準品
▼ 測定は 1 晩 (16~18 時間)+1.5 時間で終了します。	3) 標識抗原
▼ 41 検体を duplicate でアッセイできます。	4) 特異抗体溶液
▼ 血漿サンプルの測定ができます。	5) SA-HRP 溶液
▼ 検体量: 30 µL	6) SA-HRP 希釈用溶液
▼ プレートは 1 列 (8 ウェル) を取り外しできます のでキットの分割使用が可能です。	7) 基質溶解液
	8) 酵素基質剤(OPD)
	9) 酵素反応停止液
▼ 同時再現性	10) 緩衝液
ラット血漿 CV(%) 5.36~6.60	11) 濃縮洗浄液
ヒト血漿 CV(%) 4.69~10.67	12) プレート密閉用シール
▼ 日差再現性	
ラット血漿 CV(%) 5.51~18.87	
ヒト血漿 CV(%) 9.63~17.57	
▼ 保存と安定性	
2~8°Cで保存してください。	
製造日より 12 ヶ月は安定です。	

II. 特 徴

本キットはラット、マウス及びヒト血漿中に含まれる GLP-1(7-36)amide を定量的に測定します。本キットによるラット、マウス及びヒト GLP-1(7-36)amide 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の多くの利点を備えています。なお、添付の標準 GLP-1(7-36)amide は高純度の合成品であり、表示の重量は絶対量を示しています。

<特異性>

本キットはラット、マウス及びヒト GLP-1 に特異的であり、ラット、マウス及びヒト GLP-2、ヒトグリセンチン及びグルカゴンとの交差反応性を認めません。

また GLP-1 フラグメントに対する交差反応性は、GLP-1(9-36)amide に対して同等の反応性を有しますが、GLP-1(1-37)、GLP-1(1-36)amide、GLP-1(7-37)に対する反応性はごく僅かです。

<測定原理>

本アッセイ系は特異性の高いウサギ抗 GLP-1(7-36)amide 抗体を用い、競合反応を応用したものであり、ビオチンとアビジンの高い親和性を応用した発色を組み合わせた測定法であります。96 ウエルプレートの各ウエルにはヤギ抗ウサギ IgG 抗体が固定化されおり、この各ウエルに標識抗原、標準液（または検体）および特異抗体を順次加えて競合反応させます。これに HRP 結合ストレプトアビジンを加え、ウエル上に 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酵素（HRP）活性を測定することにより、検体中の GLP-1(7-36)amide 濃度を求めることができます。測定範囲は、0.206～50 ng/mL であります。

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	ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 固定化プレート
2. 標準品	凍結乾燥品	25 ng	1 本	合成 GLP-1(7-36)amide
3. 標識抗原	凍結乾燥品		1 本	ビオチン化 GLP-1(7-36) amide
4. 特異抗体溶液	液状	6mL	1 本	ウサギ抗 GLP-1(7-36) amide 抗体
5. SA-HRP 溶液	液状	200 μ L	1 本	HRP 結合ストレプトアビ ジンおよびリン酸緩衝液
6. SA-HRP 希釈用溶液	液状	12 mL	1 本	非特異的反応除去剤を含む リン酸緩衝液
7. 基質溶解液	液状	26 mL	1 本	0.015% 過酸化水素を含む 0.1 M リン酸-クエン酸 緩衝液 (pH 5.0)
8. 酵素基質剤	錠剤		2 錠	o-フェニレンジアミン錠 (OPD)
9. 酵素反応停止液	液状	12 mL	1 本	1M H ₂ SO ₄
10. 緩衝液	液状	10 mL	1 本	リン酸緩衝液
11. 濃縮洗浄液	液状	50 mL	1 本	1% TWEEN 20 を含む 濃縮生理食塩水
12. 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) マイクロプレートの吸光度計(プレートリーダー)、波長 490 nm で吸光度 2.5 まで測定できる装置
- 2) マイクロプレート用振とう器
- 3) マイクロプレート用洗浄器、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
- 4) マイクロピペットおよびチップ (25、50、100、200 および 1,000 μ L) 8 連または 12 連のマルチチャンネルピペットを使用する
- 5) 標準液の調製に使用するガラス製の試験管
- 6) メスシリンダー(1,000 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 0.5mL を加え内容物を溶解させ、50 ng/mL の標準液を調製する。この標準液 0.1 mL をとり、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 16.67 ng/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作をくり返し、5.556、1.852、0.617、0.206 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。
- 2) 標識抗原溶液の調製法：標識抗原の容器に蒸留水 6 mL を加え内容物を溶解させ使用する。
- 3) SA-HRP 希釈液の調製法：使用時に SA-HRP 希釈用溶液の容器に SA-HRP 溶液 120 μ L を加え転倒攪拌により混合し使用する。ただし、分割使用の場合は必要量に応じて、SA-HRP 溶液を SA-HRP 希釈用溶液で 100 倍し使用して下さい。
- 4) 基質溶液の調製法：使用時に基質溶解液 12 mL に酵素基質剤(OPD)1 錠を加え溶解し使用する。
- 5) 洗浄液の調製法：50 mL (全量)を蒸留水 950 mL にて希釈し使用する。
- 6) 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>

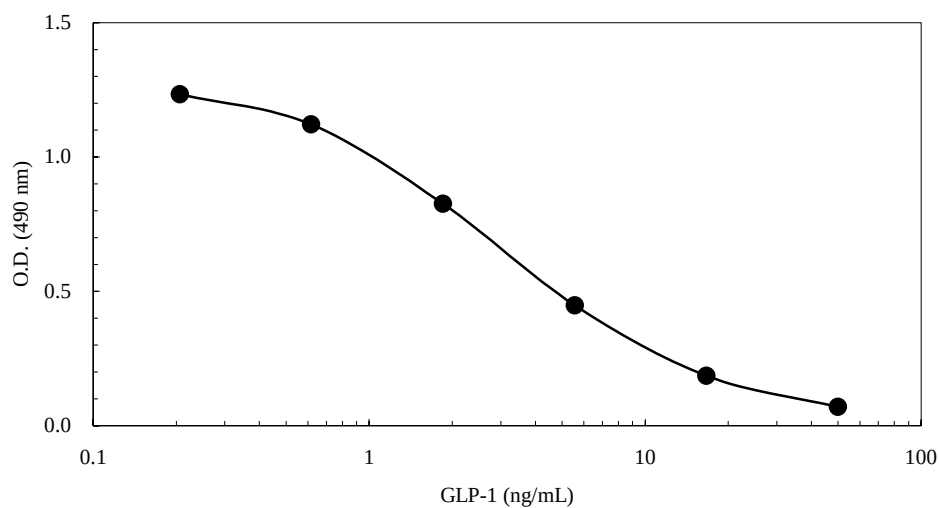
- 1) キット内容を室温(20～30℃)に戻す。
標準液、標識抗原溶液、SA-HRP 希釈液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
- 2) 測定プレートの各ウェルに 350 μ L の洗浄液を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいは液を捨てて、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして完全に液を除く。この操作を 3 回行う。
- 3) 各ウェルに標識抗原溶液 40 μ L を入れ、ついで標準液または検体 30 μ L を加え、さらに特異抗体溶液 40 μ L を加える。
- 4) 測定プレートをシールし、4℃で一晩(16～18 時間)静置する。
- 5) 各ウェル中の液を除き、2)と同様の洗浄操作を 4 回行う。
- 6) SA-HRP 希釈用溶液で SA-HRP 溶液を希釈し、SA-HRP 希釈液を調製する。
- 7) 各ウェルに SA-HRP 希釈液 100 μ L を入れる。
- 8) 測定プレートをシールし、室温(20～30℃)で 1 時間振とうする。
- 9) 8) の反応終了直前に酵素基質剤(OPD)を基質溶解液で溶解し、基質溶液を調製する。
- 10) 各ウェル中の液を除き 2)と同様の洗浄操作を 5 回行う。
- 11) 各ウェルに基質溶液 100 μ L を入れ、室温(20～30℃)で 30 分間反応させる。
- 12) 各ウェルに酵素反応停止液 100 μ L を入れる。
- 13) マイクロプレート吸光度計にて 490 nm の吸光度を測定する。
GLP-1 標準品希釈溶液の各濃度(6 ポイント)の測定値から標準曲線を作成し、検体の測定値を標準曲線に当てはめ、GLP-1 濃度を算出する。

V. 操作上の注意

- 1) 血漿は EDTA を入れた採血管で採血してください。すなわち、血液 1mL あたりエチレンジアミン 4 酢酸(EDTA) 1mg を添加し、十分混和したのち遠心分離(3000 rpm)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。
- 2) 試薬は用時調製(希釈)を原則としてください。キットの分割使用は可能です。溶解した試薬残液(標準液および標識抗原溶液)は 2~8℃保存では約 2 週間、-30℃以下保存では約 1 ヶ月間安定です。なお、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。
- 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。また、洗浄中にウェルにほこりなど異物が入らないように十分に注意を払う必要があります。
- 4) 標準液を希釈する時は、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。また、各標準液および検体をウェルに注入する場合、標準液また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。各ウェル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。
- 5) 50 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(発色反応除く)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。なお振とうはプレートシールに反応液がはねないようにゆっくりと行ってください。
- 7) 測定はすべて 2 重測定で行ってください。
- 8) 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、検量線は必ず測定ごとに作成してください。
- 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) 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。

VI. 基本性能

<標準曲線の一例>



<添加回収試験>

<ラット血漿>

Added GLP-1 (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0	0.66		
0.5	1.28	1.16	110.4
2.0	2.73	2.66	102.6
8.0	7.72	8.66	89.20

<ヒト血漿>

Added GLP-1 (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0	0.66		
0.5	1.18	1.16	101.7
2.0	2.60	2.66	97.7
8.0	7.45	8.66	86.0

<再現性試験>

同時再現性

ラット血漿 CV(%) 5.36~6.60

ヒト血漿 CV(%) 4.69~10.67

日差再現性

ラット血漿 CV(%) 5.51~18.87

ヒト血漿 CV(%) 9.63~17.57

<GLP-1 フラグメントとの交差反応性>

Related peptides	Crossreactivity(%)
GLP-1 (7-36) amide	100%
GLP-1 (9-36) amide	100%
GLP-1 (1-36) amide	0.3%
GLP-1 (1-37)	< 0.1%
GLP-1 (7-37)	< 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 12 ヶ月(使用期限は外箱ラベル内に表示)

<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) 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) Kreyman, 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

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

2009 年 9 月 18 日改訂