

研究用試薬

YK200 Mouse / Rat Urocortin 3 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	2～3
． 特 徴	4
． キットの構成	5
． 操作法	6～8
． 操作上の注意	9
． 基本性能	10～16
． 貯蔵法および有効期間	16
． 文献	16

YK200 Mouse/Rat Urocortin 3 EIA キット

． はじめに

ウロコルチンは CRF (コルチコトロピン放出因子) ファミリーに属する新しいニューロペプチドとして分類され、現在、ウロコルチン-1,-2,-3 の3種類の存在が知られています。マウスウロコルチン3 は38アミノ酸残基により構成されています¹⁾。CRFは視床下部から分泌され、脳下垂体のACTHの放出を刺激し、ステロイドホルモンを分泌させることにより、ストレス機能の調節などに関与していると考えられています。また、CRF受容体として、急性ストレス応答に関与する1型受容体とストレスから引き起こされる不安、食欲不振および血圧異常の調節などに関与する2型受容体があります。ウロコルチン2 および3 はこのCRF2型受容体に強く結合するリガンドとして注目されています。中でもウロコルチン3はCRF2型受容体に特異的に結合し、ストレス時の不安緩和や、ストレス条件下における摂食や食欲抑制などの胃腸運動の調節作用を示すことが明らかになってきました²⁾。このような作用はストレス関連疾患の新規治療薬の開発に応用できることが期待されます³⁾。また、高カリウム、ホルスコリン、グルコースなどにより、マウス膵臓 細胞からウロコルチン3 が分泌されることが報告されているほか⁴⁾、ウロコルチン3 によりラット分離膵島からグルカゴンとインスリンが分泌されることが明らかになってきており⁴⁾、ウロコルチン3 がCRF2型受容体を介して局部的にグルカゴンとインスリンの分泌を調節している可能性が示唆されています⁴⁾。

そこで、弊社では今回、マウス並びにラットの血漿、血清および脳組織中に含まれるウロコルチン3を測定するためのマウス/ラットウロコルチン3 EIAキットを新しく開発いたしました。本キットはウロコルチン1 (マウス、ラット)、ウロコルチン1 (ヒト)、ウロコルチン2 (マウス)、ウロコルチン2 (ラット)、ACTH (マウス、ラット)、ACTH (ヒト)、CRF (マウス、ラット、ヒト)との交差反応性が極めて低く、マウス並びにラットの血漿、血清および脳組織抽出物中におけるウロコルチン3を特異的かつ高感度に測定できます (脳組織抽出物については固相抽出による前処理が必要です)。

YK200 Mouse/Rat Urocortin 3 EIA キット

マウスおよびラットウロコルチン 3 測定用です。

0.41 ~ 100 ng/mL の範囲で測定できます。

41 検体を duplicate で測定できます。

測定は 16 ~ 18 時間 (4) と 3 時間で終了します。

血漿、血清および脳組織抽出物の測定ができます (脳組織抽出物については固相抽出による前処理が必要です)。

検体量は 25 μ L です。

プレートは 1 列 (8 ウエル) 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。

内容

1)測定プレート

2)標準品

3)標識抗原

4)SA-HRP 溶液

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 で保存してください。

製造日より 24 ヶ月間は安定です。

・ 特 徴

本キットはマウス並びにラットの血漿、血清および脳組織抽出物中に含まれるウロコルチン 3 濃度を定量的に測定するためのものです(脳組織抽出物については固相抽出による前処理が必要です)。本キットによるウロコルチン 3 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 >

本キットについてはウロコルチン 1 (マウス、ラット)、ウロコルチン 1 (ヒト)、ウロコルチン 2 (マウス)、ウロコルチン 2 (ラット)、ACTH (マウス、ラット)、ACTH (ヒト) および CRF (マウス、ラット、ヒト) に対する交差反応性をほとんど認めません。

< 測定原理 >

本キットによるウロコルチン 3 の測定は競合法に基づいて行います。測定プレート(96 ウエル)の各ウエルにはウサギ抗ウロコルチン 3 抗体が固定化されています。この各ウエルに標準液または検体、ビオチン化ウロコルチン 3 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 HRP 活性を測定することにより、検体中のウロコルチン 3 濃度を求めることができます。

． 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	ウサギ抗マウス/ラットウロコルチ ン 3 抗体固定化プレート
2. 標準品	凍結乾燥品	100 ng	1 本	マウス/ラットウロコルチン 3
3. 標識抗原	凍結乾燥品		1 本	ビオチン化マウス/ラット ウロコルチン 3
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	15 mL	1 本	非特異的の反応除去剤を含むクエン酸 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	

． 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 (20 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 (492 nm 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ガラス試験管
5. マイクロプレート洗浄装置、手法の場合は連続分注器、ニードルディスプレイ、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

< マウス、ラット脳組織の抽出および前処理 >

材料：マウス脳組織、ラット脳組織

抽出液：0.2% Nonidet P-40 含有 PBS (10mM、pH7.2)

カラム：Oasis HLB 3cc (60mg) エキストラクションカートリッジ(Part No.WAT094226, Waters)

エキストラクションマニホールド(Waters)

溶出液：Acetonitrile-0.075% TFA (80:20, vol/vol)

1. 摘出したマウス脳組織あるいはラット脳組織をプラスチック製の試験管に入れ、秤量する。15 倍量の抽出液を加え、ホモジナイズした後、冷却遠心機で遠心 (18360 x g、4、20 分) する。遠心後、ガラス製の試験管に抽出液上清を移し、氷冷下に静置する。
2. メタノール 6mL を 3mL ずつ 2 回に分けてカラムに添加し、陰圧で流す (2mL/min)。さらに蒸留水 6mL にて同様に洗浄した後、上記の抽出液上清 (ここで抽出液上清量を記録、例：2mL) をカラムに添加し、陰圧で緩やかに流す。ついで蒸留水 6mL で洗浄した後、最後に溶出液 2mL で溶出し、ガラス製の試験管に回収する。溶出液を直ちに遠心エバポレーターにかけ溶出液を留去し、アッセイ用サンプルを得る。サンプルは

- 直ちに測定するか、できない場合は測定時まで - 30℃以下で保存する。
- 測定時に、2.で得たサンプルにキット添付緩衝液を加え溶解する（加える緩衝液量はカラムに添加した抽出液上清量の75%量を用いる、例：1.5 mL）。不溶物のある場合、冷却遠心機で遠心（1750 x g、4℃、15分）した後、得た上清を直ちに測定する。

< 試薬の調製 >

- 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 33.3 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、11.1、3.70、1.23、0.41 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。

< 測定範囲 > 有効測定範囲 0.41 ng/mL ~ 100 ng/mL

0.41 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 0.41 ng/mL の標準液を 3 倍希釈し、0.137 ng/mL の標準液を設けることができます。この場合、0.137 ng/mL ~ 0.41 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。
- 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。
- 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。
- 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 >

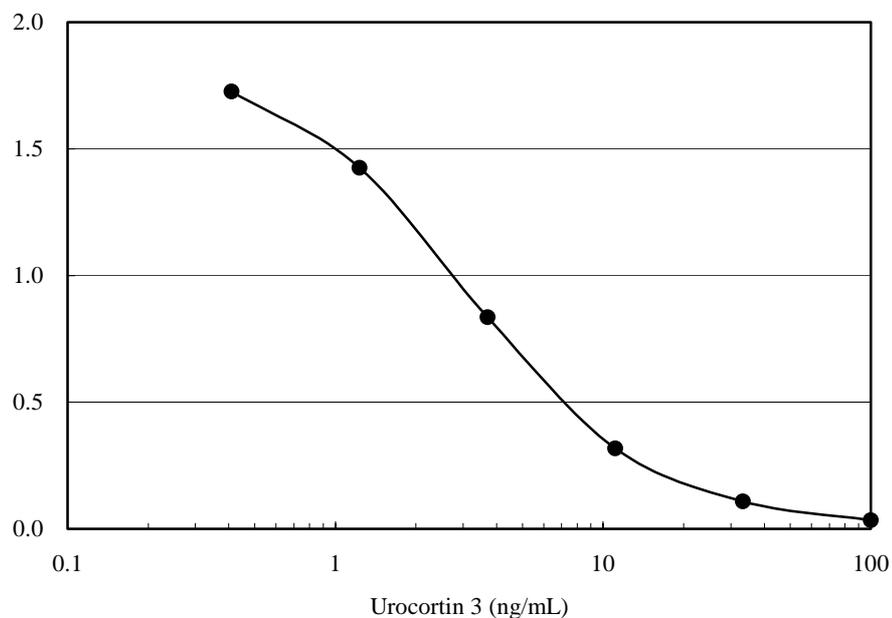
1. キット内容を室温(20～30℃)に戻す。
標準液、標識抗原溶液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. 各ウエルに、洗浄液 300 μL を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに2回繰り返し、合計3回の洗浄操作を行う。
3. 各ウエルに緩衝液 25 μL を入れ、ついで標準液または検体 25 μL を加え、さらに標識抗原溶液 50 μL を加える。
標準液の分注を始めてから検体の分注を終えるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください(30分以内)。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、4℃で一晩(16～18時間)静置する。
5. 測定プレートを室温に戻した後(静置約40分)各ウエル中の液を除き、2と同様の洗浄操作を合計4回行う。
6. 各ウエルに SA-HRP 溶液 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(約100 rpm)。
8. 7.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。
9. 各ウエル中の液を除き、2と同様の洗浄操作を合計4回行う。
10. 各ウエルに発色剤溶液 100 μL を加えプレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で静置し20分間反応させる。
11. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μL を加える。
12. マイクロプレート用吸光度計にて 490 nm (492 nm でも可) の吸光度を測定する。
13. 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、ウロコルチン 3 標準液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、検体のウロコルチン 3 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、ウロコルチン 3 の濃度を読み取る。

・ 操作上の注意

1. 血液検体は採取後、血漿または血清を分離し、直ちに測定してください。直ちに測定できない場合は血漿または血清を適宜小分けして、 -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。血漿は EDTA-2Na (1 mg/mL) 添加採血管で採取してください。蒸発乾固した脳組織サンプルについては直ちに測定するか、できない場合は、測定するまで -30 以下で凍結保存してください。
2. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品および標識抗原は調製後、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、調製後の標準品および標識抗原は適宜小分けして、 -30 以下で凍結保存してください (約 1 ヶ月は安定です)。
3. 標準液の分注を始めてから検体の分注を終えるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください (30 分以内)。
4. 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。
5. 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ってください。また検体をウエルに注入する場合は、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。標準液を希釈するとき、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。
6. 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。
7. 室温での反応には必ずマイクロプレート用振とう機を用い、測定プレートを振とうしてください (呈色反応の場合を除く)。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ってください (約 100 rpm)。
8. 測定はすべて 2 重測定で行ってください。
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. 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。
11. 各試薬の保存中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。
12. 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て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 >

< マウス血漿 A >

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.38		
1.0	1.10	1.38	79.71
5.0	4.27	5.38	79.37
30.0	21.97	30.38	72.32
50.0	53.77	50.38	106.73

< マウス血漿 B >

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.26		
1.0	1.06	1.26	84.13
5.0	4.77	5.26	90.68
30.0	26.05	30.26	86.09
50.0	46.42	50.26	92.36

< マウス血漿 C >

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.31		
1.0	1.12	1.31	85.50
5.0	4.22	5.31	79.47
30.0	26.41	30.31	87.13
50.0	49.52	50.31	98.43

< マウス血漿 D >

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.34		
1.0	1.08	1.34	80.60
5.0	4.24	5.34	79.40
30.0	22.40	30.34	73.83
50.0	52.38	50.34	104.05

< マウス血清 A >

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.77		
1.0	1.32	1.77	74.58
5.0	5.63	5.77	97.57
30.0	25.91	30.77	84.21
50.0	45.58	50.77	89.78

< マウス血清 B >

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.40		
1.0	1.74	1.40	124.29
5.0	5.66	5.40	104.81
30.0	25.68	30.40	84.47
50.0	38.73	50.40	76.85

< マウス血清 C >

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.43		
1.0	1.31	1.43	91.61
5.0	5.55	5.43	102.21
30.0	27.46	30.43	90.24
50.0	35.78	50.43	70.95

<マウス血清 D>

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.46		
1.0	1.42	1.46	97.26
5.0	5.27	5.46	96.52
30.0	27.84	30.46	91.40
50.0	37.87	50.46	75.05

<ラット血漿 A>

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.32		
1.0	1.48	1.32	112.12
5.0	4.90	5.32	92.11
30.0	27.43	30.32	90.47
50.0	52.62	50.32	104.57

<ラット血漿 B>

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.58		
1.0	1.41	1.58	89.24
5.0	5.31	5.58	95.16
30.0	29.84	30.58	97.58
50.0	56.69	50.58	112.08

<ラット血漿 C>

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.54		
1.0	1.56	1.54	101.30
5.0	4.88	5.54	88.09
30.0	30.88	30.54	101.11
50.0	64.49	50.54	127.60

<ラット血漿 D>

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.79		
1.0	1.81	1.79	101.12
5.0	5.41	5.79	93.44
30.0	28.68	30.79	93.15
50.0	66.94	50.79	131.80

<ラット血清 A>

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.17		
1.0	1.18	1.17	100.85
5.0	4.03	5.17	77.95
30.0	27.80	30.17	92.14
50.0	61.76	50.17	123.10

<ラット血清 B>

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.21		
1.0	1.04	1.21	85.95
5.0	4.80	5.21	92.13
30.0	28.89	30.21	95.63
50.0	62.71	50.21	124.90

<ラット血清 C>

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.27		
1.0	1.15	1.27	90.55
5.0	4.50	5.27	85.39
30.0	27.48	30.27	90.78
50.0	73.87	50.27	146.95

<ラット血清 D>

Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.14		
1.0	1.03	1.14	90.35
5.0	3.81	5.14	74.12
30.0	23.14	30.14	76.78
50.0	59.77	50.14	119.21

< マウス脳組織 >

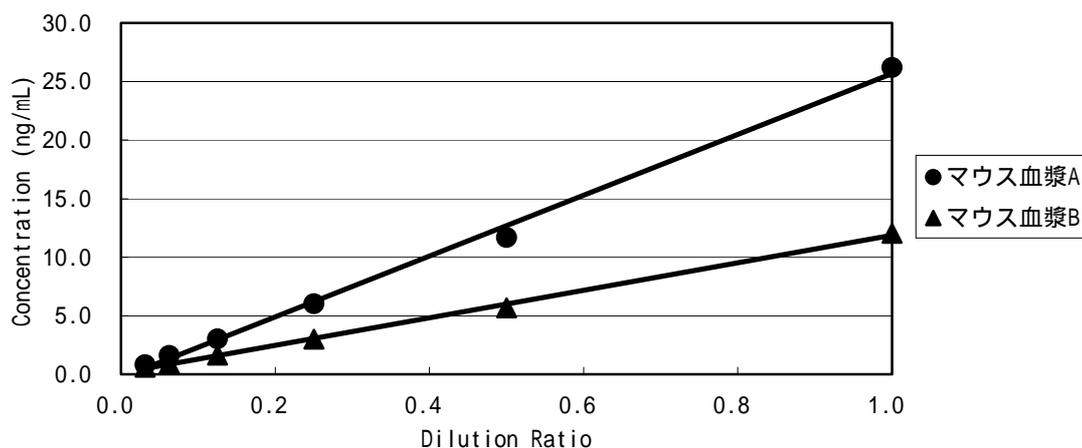
Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.27		
0.5	0.80	0.77	103.90
5.0	4.95	5.27	93.93
30.0	31.17	30.27	102.97

< ラット脳組織 >

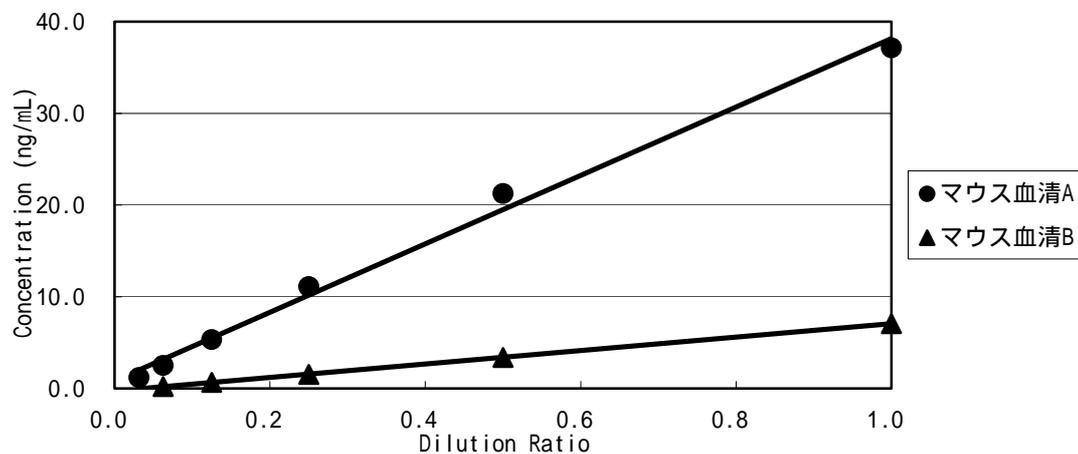
Added Urocortin 3 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.22		
0.5	0.69	0.72	95.83
5.0	4.24	5.22	81.23
30.0	26.93	30.22	89.11

< 希釈試験 >

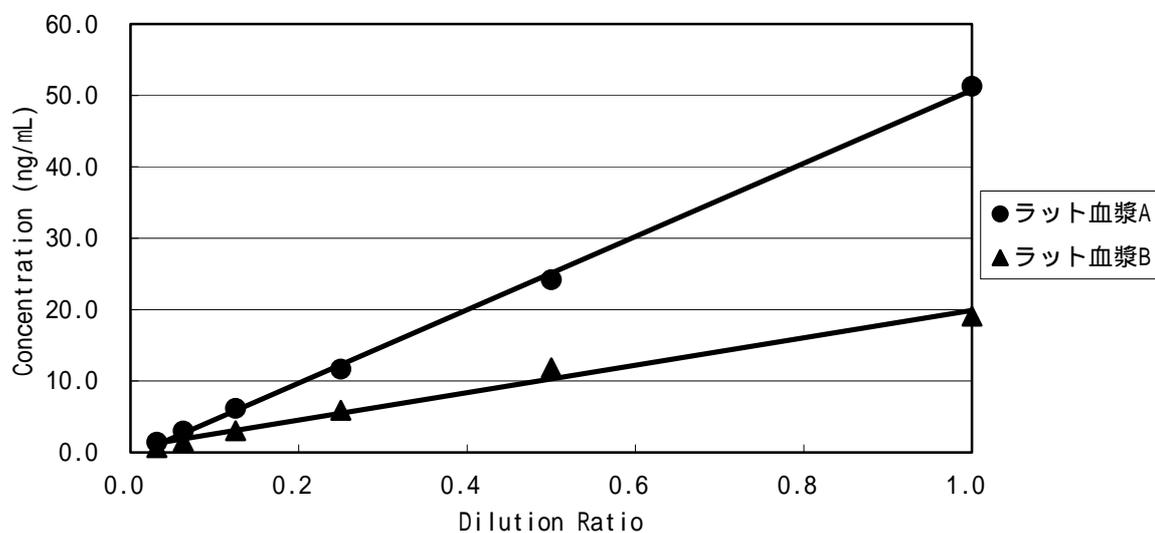
< マウス血漿 >



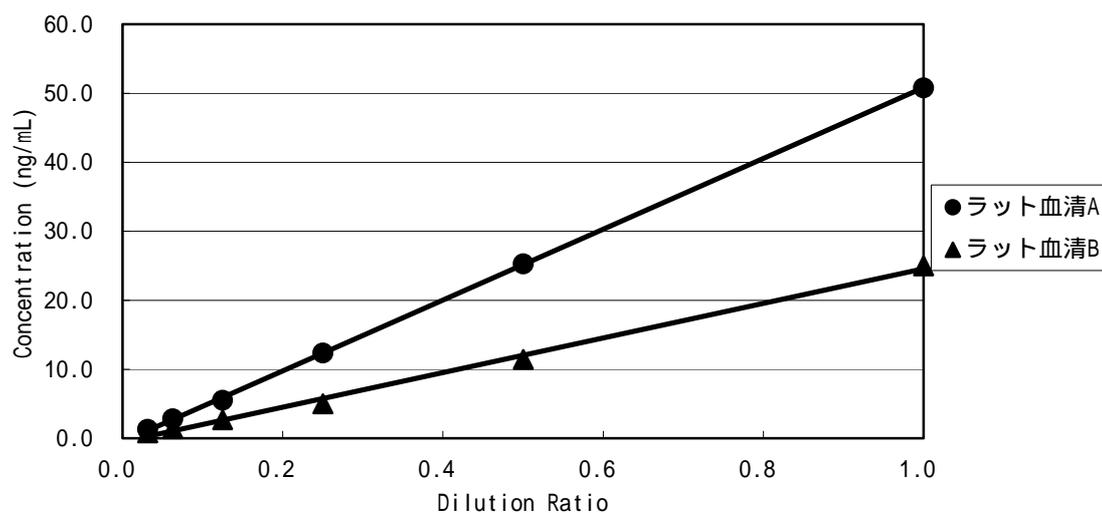
< マウス血清 >



< ラット血漿 >



< ラット血清 >



< 交差反応性 >

関連ペプチド	交差反応性 (%)
Urocortin 3 (mouse, rat)	100
Urocortin 1 (mouse, rat)	0
Urocortin 1 (human)	0.04
Urocortin 2 (mouse)	0
Urocortin 2 (rat)	0
ACTH (mouse, rat)	0.03
ACTH (human)	0.03
CRF (mouse, rat, human)	0.01

