

Mouse GIP, Total Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

インクレチンは、食後に、ランゲルハンス島β細胞からのインシュリンの分泌を増加させる一群の消化管ホルモンです。インクレチンはまた、ランゲルハンス島のα細胞からのグルカゴン分泌を抑制します。

GLP-1とともに代表的なインクレチンであるGIPは、1970年に腸管粘膜から gastric inhibitory peptide として分離同定され、その後glucose-dependent insulinotropic peptide と呼ばれるようになりました。GIPの受容体が膵β細胞や脂肪細胞、骨芽細胞などに発現し、いずれの細胞においても摂取した栄養素を生体内に蓄積する上で重要な役割を担っていることが分かり、GIPシグナルを抑制することが肥満やメタボリックシンドロームなどの改善につながるのではないかと報告もあります(文献1-3)。

GIPは血中でDPP-IVによって短時間のうちに不活性化され、GIP (3-42)になります。本ELISAキットは、マウスの活性型GIP (1-42)、不活性型GIP (3-42)をともに検出し、試料中の総GIPを測定することができます。

2. 原理および測定方法

本製品は、サンドイッチ法による ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) キットです。1 次抗体はプレートに固相されていますので、検体および標準物質を加え 1 次反応をおこないます。洗浄後、HRP 標識された 2 次抗体を加え 2 次反応をおこないます。反応後過剰の 2 次抗体を洗浄除去した後、Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させます。この発色は、Mouse GIP の総量に比例します。

3. 測定範囲

12.5~800 pmol/L

4. 使用目的

■マウスの EDTA-血漿、細胞培養上清中の活性型および不活性型 GIP を測定できます。

* 同じ検体を活性型の測定にも使用する場合は、検体採取の際 DPP-IV 阻害剤を添加するか、GIP 専用の採取容器を使用してください。(商品例: BD™ P800 GLP-1, GIP, Glucagon, Ghrelin 保存用真空採血管, 日本ベクトン・ディッキンソン(株))

5. 構成試薬

| | |
|---|------------|
| 1 抗体プレート (抗 GIP (C) Rabbit IgG A.P. 固相) | 96Well x 1 |
| 2 標識抗体濃縮液 (30 倍濃度 HRP 標識抗 GIP (3-17) (81A1) Mouse IgG MoAb Fab' A.P.) | 0.4mL x 1 |
| 3 標準物質 (Mouse GIP (1-42) peptide) | 0.5mL x 2 |
| 4 希釈用緩衝液 | 30mL x 1 |
| 5 標識抗体用溶解液 (1% BSA, 0.05% Tween-20 含有 PBS) | 12mL x 1 |
| 6 TMB 基質液 | 15mL x 1 |
| 7 停止液 (1N H ₂ SO ₄) | 12mL x 1 |
| 8 濃縮洗浄液 (40 倍濃度リン酸緩衝液) | 50mL x 1 |

6. 用法および用量 (操作方法)

(1) 必要な器具・器材

| | |
|------------------------|------------------|
| プレートリーダー (測定波長: 450nm) | マイクロピペットおよびチップ |
| 希釈用テストチューブ | メスシリンダーおよびピッカー |
| 精製水 | グラフ用紙 (両対数) |
| プレートウォッシャー又は洗浄瓶* | ペーパータオル |
| 冷蔵庫 (4°C として) | 採取用容器 (清潔な試験管など) |
| 恒温器 (37°C±1°C) | |

(2) 準備

濃縮洗浄液の希釈方法

濃縮洗浄液は、40 倍濃度です。使用前に常温に戻し十分に転倒混和します。濃縮洗浄液 50mL に対して精製水を 1,950mL 加え混和します。これを洗浄液とします。冷蔵保存し 2 週間以内に使用してください。

標識抗体濃縮液の希釈方法

標識抗体濃縮液は 30 倍濃度です。

別に用意した採取用容器にて、必要量に応じて標識抗体濃縮液を標識抗体用溶解液で 30 倍希釈してください。これを標識抗体とします。

希釈例)

1 スリット (8 ウェル) 使用する場合は=800 μL 必要(最低量)
(標識抗体濃縮液を 30 μL とり、標識抗体用溶解液 870 μL を加え良く混和し、100 μL ずつ使用します。)

この操作は、標識抗体添加の直前におこなってください。

標識抗体濃縮液の残りは、蓋をしっかりと閉め冷蔵にて保存してください。有効期限内に再度使用できます。

標準物質の希釈方法

標準物質バイアル瓶に精製水を 0.5 mL 加えて完全に溶解します。

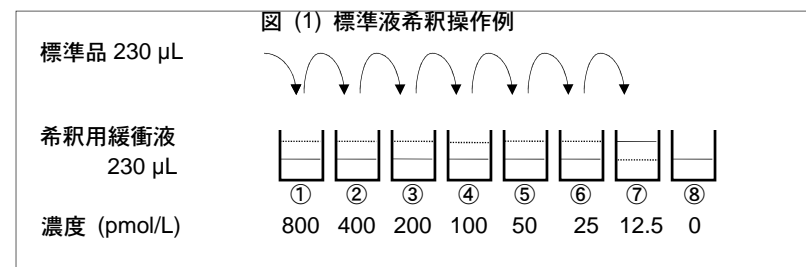
この時標準物質濃度は 1,600 pmol/L となります。

希釈用テストチューブを 8 本用意し希釈用緩衝液を 230 μL ずつ量り取ります。各々のテストチューブに

800 pmol/L, 400 pmol/L, 200 pmol/L, 100 pmol/L, 50 pmol/L, 25 pmol/L, 12.5 pmol/L, 0 pmol/L の表示をします。

800 pmol/L の希釈用テストチューブに 1,600 pmol/L の標準物質溶液を 230 μL 加え混和しその溶液 230 μL を 400 pmol/L の希釈用テストチューブに加えて混和

します。順次 2 倍連続希釈をおこない 800 pmol/L~12.5 pmol/L までの 7 点を希釈標準品とし、0 pmol/L を検体ブランクとします。(図(1) 参照)



検体の希釈方法

検体はあらかじめ希釈用緩衝液(構成試薬 4)で希釈してから測定してください。血漿検体の希釈の目安は 4 倍です。検量線の範囲を超えた場合はさらに希釈してください。

(3) 測定操作方法

試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し変化のない事を確かめてください。

検体の測定と同時に希釈標準品を測定し検量線を設定してください。

- 1 ブランクの添加 (以降図 (2) 参照)
試薬ブランクを設定し希釈用緩衝液を 100 μL 入れます。
- 2 検体、希釈標準品の添加
検体 100 μL および希釈標準品各 100 μL ならびに検体ブランク 100 μL を入れます。
- 3 プレートカバーをして 37°C 60 分間反応
- 4 洗浄 (操作上の注意 8.9 参照) *
- 5 標識抗体の添加
検体、標準、検体ブランクに標識抗体を各々 100 μL 添加します。
- 6 プレートカバーをして 4°C 60 分間反応
- 7 洗浄 (操作上の注意 8.9 参照) *
- 8 TMB 基質液の添加
あらかじめ必要量を採取用容器にとり、そこからすべてのウェルに TMB 基質液を 100 μL 添加します。TMB 基質液添加後、反応液は徐々に青色に変わります。この時の反応は遮光してください。また、採取用容器に残った TMB 基質液は、コンタミの原因になりますので元に戻さないでください。
- 9 遮光をして常温 30 分間反応
- 10 停止液の添加
すべてのウェルに停止液を 100 μL 添加します。プレートの側面を軽くたたいて混和します。反応液は青色から黄色に変化します。
- 11 吸光度測定
プレート底面のよごれや水滴を拭き取り液面に気泡がないことを確認した後、30 分以内に試薬ブランクを対照として検体および標準ならびに検体ブランクの波長 450nm における吸光度を測定してください。

図 (2) 測定操作一覧

| 試料 | 検体 | 標準 | 検体ブランク | 試薬ブランク |
|---|--------|--------|--------|--------|
| | 検体 | 希釈標準品 | 希釈用緩衝液 | 希釈用緩衝液 |
| | 100 μL | 100 μL | 100 μL | 100 μL |
| プレートカバーをして 37°C 60 分間反応 | | | | |
| 4 回 (洗浄液 350 μL 以上) (操作上の注意 8.9 参照) * | | | | |
| 標識抗体 | 100 μL | 100 μL | 100 μL | - |
| プレートカバーをして 4°C 60 分間反応 | | | | |
| 5 回 (洗浄液 350 μL 以上) (操作上の注意 8.9 参照) * | | | | |
| TMB 基質液 | 100 μL | 100 μL | 100 μL | 100 μL |
| 遮光常温 30 分間反応 | | | | |
| 停止液 | 100 μL | 100 μL | 100 μL | 100 μL |
| プレートをたたいて反応液を混和し、30 分以内に試薬ブランクを対照として 450 nm における検体、標準、検体ブランクの吸光度を測定 | | | | |

7. 操作上の注意事項

- 1 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。
- 2 検体は希釈用緩衝液で希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定をおすすめします。
- 4 測定に当たってはその都度検量線を作成してください。
- 5 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 6 試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し変化のない事を確かめてください。
- 7 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 8 洗浄は機械洗浄 (wait time 0 秒) を推奨いたします。洗浄瓶を用いて洗浄する場合は、洗浄液をウェルに満たした後、直ちにプレートを逆さまにして振り払い洗浄液を除去します。この洗浄操作を規定回数おこなってください。操作は洗浄むらのないよう十分注意しておこなってください。
- 9 洗浄操作を規定回数おこなった後に、プレートをペーパータオルの上でたたいて、完全に水分を除去してください。この時ペーパータオルがウェルの中に入らないよう注意してください。
- 10 TMB 基質液は、光に対して敏感です。遮光保存してください。金属との接触も避けてください。使用に際しては必要量を採取用容器にとり分けてください。
- 11 TMB 基質液添加後、反応液は徐々に青色に変わります。この時の反応は、遮光してく

ださい。また、採取用容器に残った TMB 基質液は、コンタミの原因になりますので元に戻さないでください。

12 吸光度測定は、停止液添加後 30 分間以内におこなってください。

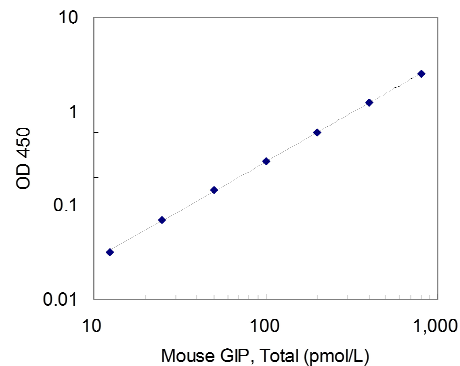
8. 測定結果の算出方法

対数グラフの縦軸に吸光度を、横軸に検体濃度を取り各標準物質濃度の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値をとり検量線を設定します。

試料検体の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値を検量線に当てはめ、検体濃度を読みとります。

9. 測定値と検量線作成例

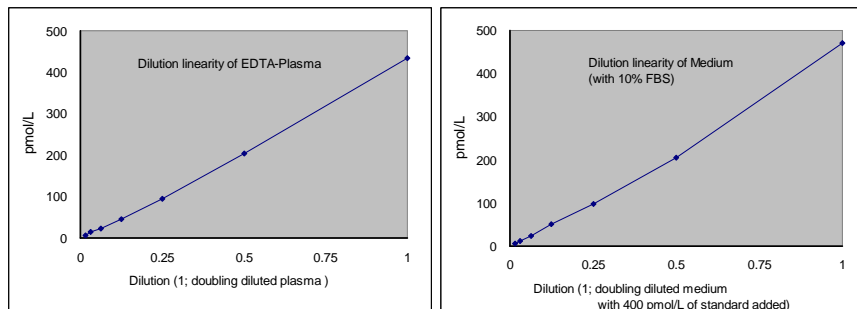
| 標準品濃度 (pmol/L) | 吸光度 (450nm) |
|----------------|-------------|
| 800 | 2.539 |
| 400 | 1.263 |
| 200 | 0.633 |
| 100 | 0.330 |
| 50 | 0.182 |
| 25 | 0.107 |
| 12.5 | 0.069 |
| 0 (検体ブランク) | 0.037 |



上記検量線は作成例です。測定に当たってはその都度検量線を作成してください。

10. キットの性能

(1) 希釈直線性



(2) 添加回収試験

| 検体 | 添加量 (pmol/L) | 理論値 (pmol/L) | 測定値 (pmol/L) | % |
|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| 血漿 (EDTA) (BALB/c マウス) (x 4) | 200 | 328.3 | 376.8 | 114.8 |
| | 100 | 228.3 | 250.7 | 109.8 |
| | 50 | 178.3 | 191.9 | 107.6 |
| 培地 (10%FBS 添加) (x 4) | 200 | 200 | 201.1 | 100.6 |
| | 50 | 50 | 51.1 | 102.2 |
| | 12.5 | 12.5 | 13.4 | 107.2 |

(3) 同時再現性

| 測定値 (pmol/L) | SD (pmol/L) | CV (%) | n |
|--------------|-------------|--------|----|
| 324.9 | 21.4 | 6.6 | 24 |
| 72.9 | 5.1 | 7.0 | 24 |
| 22.7 | 2.7 | 11.9 | 24 |

(4) 測定間再現性

| 測定値 (pmol/L) | SD (pmol/L) | CV (%) | n |
|--------------|-------------|--------|---|
| 338.2 | 19.8 | 5.9 | 6 |
| 77.0 | 4.7 | 6.1 | 6 |
| 25.1 | 2.3 | 9.2 | 6 |

(5) 特異性

| 測定物質 | 交差率 |
|--------------------------|---------|
| Mouse GIP (1-42) | 100 % |
| Mouse GIP (3-42) | 100 % |
| Mouse GLP-1 (7-36) amide | < 0.1 % |
| Mouse Glucagon | < 0.1 % |

(6) 感度

4.1 pmol/L

本キットの感度は、NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)の評価方法に従い求めました。(National Committee for Clinical Laboratory Standards Evaluation Protocols, SC1, (1989) Villanova, PA : NCCLS 参照)

11. 使用上または取り扱い上の注意

- 1 保存は、2~8°C としてください。使用前に全ての試薬は常温に戻してください。
- 2 標準物質は、凍結乾燥品です。開封は、十分注意しゆっくりとおこなってください。
- 3 停止液は強酸性 (1N 硫酸) です。衣服・皮膚等への接触および廃棄には十分注意してください。
- 4 使用後の抗体プレートや試薬は、多量の水で洗い流してから廃棄してください。
- 5 希釈用緩衝液、標識抗体濃縮液および濃縮洗浄液は、まれに析出を認める場合があります。

ますが、性能に問題はありません。

- 6 構成試薬には動物血液成分を含む物があります。取り扱いに注意し使用後は手洗いをしておこなってください。
- 7 ロットが異なる製品の構成試薬や他のキットの構成試薬を混ぜたり、交換したりして使用しないでください。
- 8 期限切れの試薬は、使用しないでください。
- 9 本キットは、研究用試薬です。診断等に用いることはできません。

12. 保存方法および有効期限

2~8°C 保存

使用期限は外箱に記載

13. 包装単位および製品番号

96 Well

製品番号 27204

14. 参考文献

1. Miyawaki K, Yamada Y, Yano H, Niwa H, Ban N, Ihara Y, Kubota A, Fujimoto S, Kajikawa M, Kuroe A, Tsuda K, Hashimoto H, Yamashita T, Jomori T, Tashiro F, Miyazaki J, Seino Y. Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 21;96(26):14843-7.
2. Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, Fujimoto S, Oku A, Tsuda K, Toyokuni S, Hiai H, Mizunoya W, Fushiki T, Holst JJ, Makino M, Tashita A, Kobara Y, Tsubamoto Y, Jinnouchi T, Jomori T, Seino Y. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. Nat Med. 2002 Jul;8(7):738-42.
3. Tsukiyama K, Yamada Y, Yamada C, Harada N, Kawasaki Y, Ogura M, Bessho K, Li M, Amizuka N, Sato M, Udagawa N, Takahashi N, Tanaka K, Oiso Y, Seino Y. Gastric inhibitory polypeptide as an endogenous factor promoting new bone formation after food ingestion. Mol Endocrinol. 2006 Jul;20(7):1644-51.
4. Hansotia T, Maida A, Flock G, Yamada Y, Tsukiyama K, Seino Y, Drucker DJ. Extraprepancreatic incretin receptors modulate glucose homeostasis, body weight, and energy expenditure. J Clin Invest. 2007 Jan;117(1):143-52.

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

〒375-0005 群馬県藤岡市中 1091-1

電話 : 0274-22-2889 FAX : 0274-23-6055

Version 4.

2017年5月更新*