

Rat GIP, Active form 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量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、ラットの活性型GIP (1-42)のみを特異的に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ます。Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させます。この発色は、活性型 Rat GIP (1-42)の量に比例します。

3. 測定範囲

0.47 ~ 30 pmol/L (2.34~150 pg/mL)

4. 使用目的

ラットの EDTA-血漿中の活性型 GIP を測定できます。

* 検体採取の際は 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。(例: BD™ P800 GLP-1, GIP, Glucagon, Ghrelin 保存用真空採血管, 日本ベクトン・デイクソン(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 (N) (6A1A) Mouse IgG Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3 標準物質 (Rat GIP (1-42))	0.5mL x 2
4 希釈用緩衝液 (1% BSA, 0.05% Tween-20 含有 PBS)	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ビーカー
精製水	グラフ用紙 (両対数)
ペーパータオル	洗浄ピン
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)

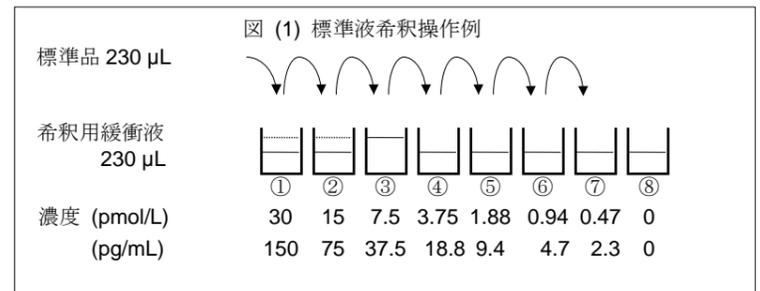
1 スリット (8 ウェル) 使用する場合=800 μL 必要(最低量)
(標識抗体濃縮液を 30 μL とり、標識抗体用溶解液 870 μL を加え良く混和し、100 μL ずつ使用します。)

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 60 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 30 pmol/L, 15 pmol/L, 7.5 pmol/L, 3.75 pmol/L, 1.88 pmol/L, 0.94 pmol/L, 0.47 pmol/L, 0 pmol/L の表示をします。30 pmol/L の希釈用テストチューブに 60 pmol/L の標準物質溶液を 230 μL 加え混和しその溶液 230 μL を 15 pmol/L の希釈用テストチューブに加え混和します。順次 2 倍連続希釈をおこない 30 pmol/L~0.47 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

検体は必要に応じて希釈用緩衝液で適宜希釈し測定してください。

(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 反応液を捨てた後、洗浄 4 回
洗浄ピンを用いて洗浄液をウェルに満たし、プレートを逆さまにして振り払い洗浄液を完全に除去します。この洗浄操作を規定回数おこない、ペーパータオル等の上でたたいて完全にウェルの水分を切ってください。操作は洗浄むらのないよう十分注意して行ってください。
- 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 反応液を捨てた後、洗浄 5 回
上記 4 洗浄と同様操作
- 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なります。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				
洗浄 4 回				
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				
洗浄 5 回				
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 検体は必要に応じて希釈用緩衝液で希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定することをおすすめします。
- 4 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。
- 5 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。
- 6 洗浄後は、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切ってください。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。
- 7 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。
- 8 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。

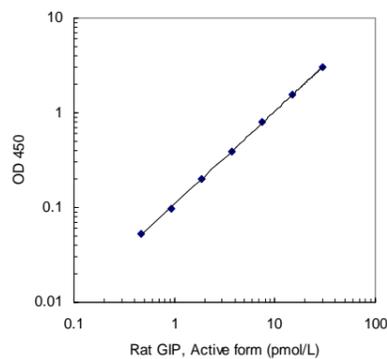
8. 測定結果の算出方法

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

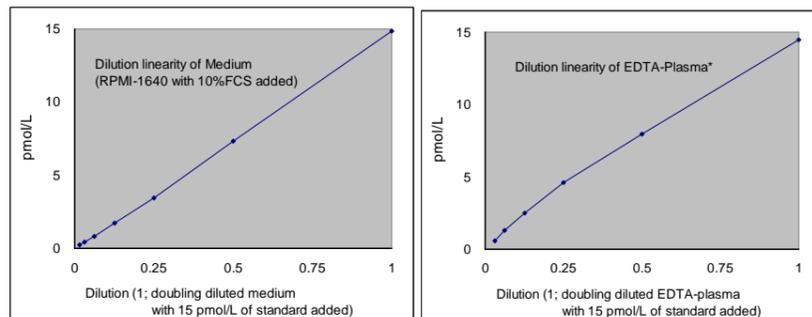
標準品濃度 (pmol/L)	吸光度 (450nm)
30	3.053
15	1.610
7.5	0.841
3.75	0.427
1.88	0.235
0.94	0.135
0.47	0.089
0 (検体ブランク)	0.036



* 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



*DPP-IV 阻害剤を添加して採血した EDTA 採血血漿サンプルを使用しています。

(2) 添加回収試験

検体	理論値 (pmol/L)	測定値 (pmol/L)	%
*血漿 (EDTA) (SD ラット) (x2)	18.05	15.09	83.6
	10.55	9.14	86.6
	6.80	6.49	95.4
培地 (10%FCS 添加 RPMI-1640) (x2)	15	14.66	97.7
	7.5	7.14	95.2
	3.75	3.37	89.9

*DPP-IV 阻害剤を添加して採血した EDTA 採血血漿サンプルを使用しています。

(3) 同時再現性

測定値 (pmol/L)	SD (pmol/L)	CV (%)	n
15.4	0.85	5.5	24
3.8	0.21	5.5	24
0.9	0.07	7.8	24

(4) 測定間再現性

測定値 (pmol/L)	SD (pmol/L)	CV (%)	n
14.5	0.90	6.2	6
3.3	0.18	5.5	6
0.8	0.07	8.8	6

(5) 特異性

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

(6) 感度

0.09 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場合があります。取り扱いに注意し使用後は手洗いなどを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 27202

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. Extrapancratic 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

Version 1.2

関連製品

製品番号	製品名	容量
27201	Human GIP, Active form Assay Kit - IBL	96 Well
27202	Rat GIP, Active form Assay Kit - IBL	96 Well
27203	Human GIP, Total Assay Kit - IBL	96 Well
27204	Mouse GIP, Total Assay Kit - IBL	96 Well
27205	Rat GIP, Total Assay Kit - IBL	96 Well
27764	Mouse GIP, Active form Assay Kit - IBL	96 Well
27784	GLP-1, Active form Assay Kit - IBL	96 Well
27788	GLP-1, Inactive form Assay Kit - IBL	96 Well