

## GLP-1, 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のベータ細胞からのインシュリン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アルファ細胞からのグルカゴンの分泌を抑制します。その結果、インクレチンは胃内容排出を減らすことによって血中の栄養分の吸収速度を減速し、直接的に食物摂取を減らします。

インクレチンの基準を満たす2つの主要候補分子は、GLP-1 (glucagon-like peptide-1) とGIP (Gastric inhibitory peptide or Glucose-dependent insulinotropic polypeptide)です。

1983年にヒトProglucagon遺伝子が単離され、その後ヒトのプログルカゴンの配列が推定されました。更にその後、GLP-1の特定の配列がインシュリン分泌促進作用を持つことが判明し、それがGLP-1(7-36)amideでした。現在GLP-1(7-36)amideとGLP-1(7-37)が活性型とされており、これらは血中でDPP-IVによって短時間のうちに不活性化され、GLP-1(9-36)amideおよびGLP-1(9-37)になります。現在では、タブレットとして経口的に服用できるいくつかのDPP-IV抑制剤が、糖尿病の治療法としてすでに開発されています。

このELISAキットは、活性型GLP-1 (GLP-1(7-36)amideとGLP-1(7-37))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EIA (Enzyme Immuno 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、GLP-1, Active formの量に比例します。

## 3. 測定範囲

1.25 ~ 80 pmol/L  
(4.1~263.8 pg/mL (GLP-1(7-36)amide 分子量 3297.6 の場合))

## 4. 使用目的

EDTA-血漿中の活性型GLP-1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、GLP-1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・ディッキンソン(株))

## 5. 構成試薬

1 抗体プレート (抗GLP-1 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GLP-1(34B1) Mouse IgG MoAb Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3 標準物質 (GLP-1(7-36)amide)	0.5mL x 2
4 希釈用緩衝液	30mL x 1
5 標識抗体用溶解液	12mL x 1
6 TMB基質液	15mL x 1
7 停止液	12mL x 1
8 濃縮洗浄液	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) 使用する場合は800μL必要(最低量)  
(標識抗体濃縮液を30μLとり、標識抗体用溶解液870μLを加え良く混和し、100μL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。

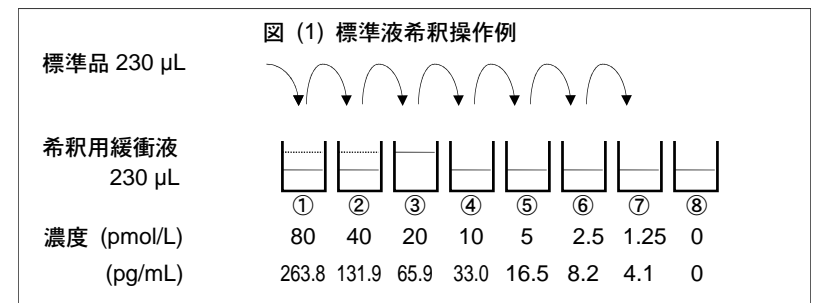
## 標準物質の希釈方法

標準物質バイアル瓶に精製水を0.5mL加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は160pmol/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230μLずつ量り取ります。各々のテストチューブに

80pmol/L, 40pmol/L, 20pmol/L, 10pmol/L, 5pmol/L, 2.5pmol/L, 1.25pmol/L, 0pmol/Lの表示をします。

80pmol/Lの希釈用テストチューブに160pmol/Lの標準物質溶液を230μL加え混和しその溶液230μLを40pmol/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80pmol/L~1.25pmol/Lまでの7点を希釈標準品とし、0pmol/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100μL入れます。
- 2 検体、希釈標準品の添加  
検体100μLおよび希釈標準品各100μLならびに検体ブランク100μL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  
ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。
- 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100μL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  
ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。
- 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100μL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100μL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)				
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)				
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450nm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にて希釈してください。
- 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。不十分な洗浄および過度の洗浄操作は、測定誤差の原因となりますので注意しておこなってください。
- 6 洗浄液は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完全に除去してください。この時ペーパータオルがウェルの中に入らないようにしてください。
- 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。

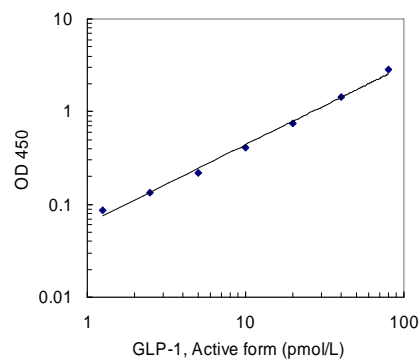
## 8. 測定結果の算出方法

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

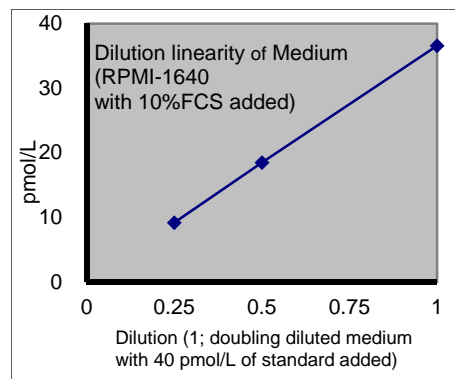
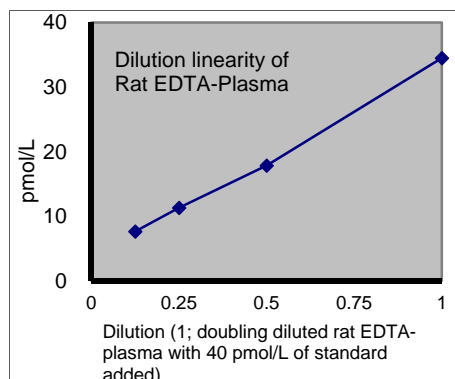
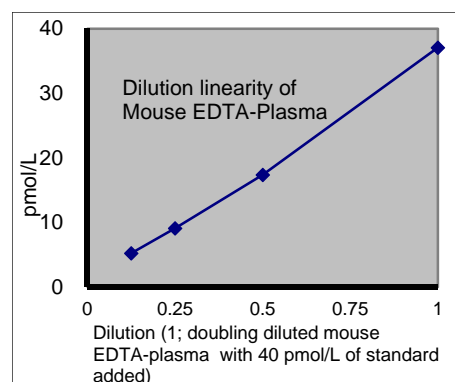
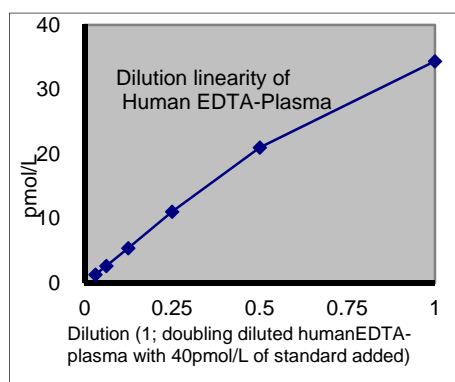
標準品濃度 (pmol/L)	吸光度 (450nm)
80	2.883
40	1.499
20	0.809
10	0.469
5	0.275
2.5	0.193
1.25	0.144
0 (検体ブランク)	0.058



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\*



\*通常の EDTA 採血血漿に DPP-IV 阻害剤を添加した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) (健常人) (x2)	41.40	33.93	82.0
	21.40	18.91	88.4
	11.40	9.96	87.4
*血漿 (EDTA) (BALB/c マウス) (x2)	42.51	39.93	93.9
	22.51	20.93	93.0
	12.51	11.54	92.2
*血漿 (EDTA) (SD ラット) (x2)	21.24	17.75	83.6
	11.24	9.20	81.9
	6.24	5.19	83.2
培地 (10%FCS 添加 RPMI-1640) (x2)	40.41	38.02	94.1
	20.41	20.33	99.6
	10.41	9.96	95.7

\*通常の EDTA 採血血漿に DPP-IV 阻害剤を添加したサンプルを使用しています。

### (3) 同時再現性

測定値 (pmol/L)	SD 値	CV 値 (%)	n
41.56	2.26	5.4	24
11.38	0.51	4.5	24
2.43	0.13	5.5	24

### (4) 測定間再現性

測定値 (pmol/L)	SD 値	CV 値 (%)	n
41.62	3.03	7.3	7
11.24	0.80	7.1	7
2.18	0.24	10.9	7

### (5) 特異性

測定物質	交差率
GLP-1 (7-36) amide	100 %
GLP-1 (7-37)	100 %
GLP-1 (1-37)	0.32 %
GLP-1 (9-36) amide	<0.1 %
GLP-2	<0.1 %
Glucagon	<0.1 %
Human GIP	<0.1 %
Mouse GIP	<0.1 %

### (6) 感度

0.10 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ぬ。
- 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することは避けてください。
- 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 27784

## 14. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

Version 3.

2018年8月更新\*

## 関連製品

製品番号	製品名	容量
27203	Human GIP, Total Assay Kit - IBL	96 Well
27201	Human GIP, Active form Assay Kit - IBL	96 Well
27701*	Mouse GIP, Total (high sensitivity) Assay Kit - IBL	96 Well
27702*	Mouse GIP, Active form (high sensitivity) Assay Kit - IBL	96 Well
27703*	Rat GIP, Total (high sensitivity) Assay Kit - IBL	96 Well
27704*	Rat GIP, Active form (high sensitivity) Assay Kit - IBL	96 Well
<b>27784</b>	<b>GLP-1, Active form Assay Kit - IBL</b>	<b>96 Well</b>
27788	GLP-1(9-36/37) form Assay Kit - IBL	96 Well
27700	GLP-1,Active form (High sensitivity) Assay-IBL*	96 Well