

研究用試薬

YK012 Mouse C-Peptide II EIA

取 扱 説 明 書

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉 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	2～3
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	8～9
VII. 貯蔵法および有効期間	9
VIII. 文献	10

YK012 Mouse C-Peptide II EIA キット

I. はじめに

C-ペプチドは、インスリン生合成前駆体であるプロインスリンの膵B細胞内でのプロセッシングによって生じる副産物です。インスリンと等モル比で血中に放出されるので、血中C-ペプチド濃度を測定することによって、膵B細胞のインスリンの分泌機能を推測することができます。C-ペプチドの半減期はインスリンのそれよりかなり長いという特徴を持っていることから、代謝が速いインスリンの代わりにC-ペプチドを測定することはインスリン分泌量をより正確に知るための指標となり临床上広く利用されています。特にC-ペプチドの測定は臨床的にはインスリン治療中糖尿病患者のB細胞機能の評価（インスリン測定の代用）のみならず、低血糖状態の鑑別診断、高インスリン血症の鑑別診断、インスリン分泌総量の推定、膵摘出後残存膵の有無の判定などにも応用されています。その他、インスリン受容体異常症や異常インスリン血症等インスリン代謝が大きく影響される病態では、C-ペプチドの測定はインスリンの測定よりはるかに重要となります。

また、長らく生理的活性がなく、ただインスリンの生合成副産物と考えられていたC-ペプチドについて近年の研究では、細胞の表面と特異的に結合し、Ca²⁺の細胞内への流入を促進し、MAP kinase、Na⁺、K⁺-ATPase や eNOS を活性化するなどの結果が報告されています。動物実験ではさらに糖尿病合併症の予防、心臓の虚血・再灌流傷害の保護効果、1型糖尿病ラットにおける神経再生能力低下の防止、およびインスリン仲介細胞の成長促進や高濃度グルコースによる細胞アポトーシスの保護などが観測されています。これらの成果から、今後C-ペプチドの生理活性研究はかつてないほど注目されてくるものと予測されます。

当研究所ではすでにラットC-ペプチド(YK010)及びマウスC-ペプチドI(YK011)の測定キットを開発しました。マウスもラットと同様、2種類のC-ペプチドが存在します。今回開発したマウスC-ペプチドIIの簡易測定キットは、前回開発したマウスC-ペプチドIを特異的に測定できるキット(YK011)に続き、マウスC-ペプチドIとは反応しないIIのみを認識する抗体を用い、ビオチン化マウスC-ペプチドIIを標識抗原とすることにより、マウスの血清、血漿および尿中のC-ペプチドII濃度を特異的に測定することを可能にしました。本EIAキットはマウス体内のC-ペプチドIIの変動を検討する上で、極めて有効に使用できます。

なお、当研究所では、マウスC-Peptide（総マウスC-ペプチド、I+II）(YK013)の測定キットも現在販売しています。

YK012 Mouse C-Peptide II EIA キット	内容
▼ 0.412~100 ng/mL の範囲で測定できます。	1) 測定プレート
▼ 測定は 16~18 時間と 2.5 時間で終了します。	2) 標準品
▼ 41 未知検体を duplicate でアッセイできます。	3) 標識抗原
▼ 血清・血漿・尿サンプルの測定ができます。	4) 特異抗体
▼ 検体量は 25 μ L です。	5) SA-HRP 溶液
▼ プレートは一列 (8 ウェル) ずつ取り外しができますので、キットの分割使用が可能です。	6) 基質溶解液
▼ 同時再現性	7) OPD 錠
血清 CV (%) 4.12~5.66	8) 酵素反応停止液
▼ 日差再現性	9) 緩衝液
血清 CV (%) 2.72~10.62	10) 濃縮洗浄液
保存と安定性	11) プレート密閉用シール
2~8°C で保存してください。製造日より 24 ヶ月は安定です。	

II. 特徴

本キットはマウスの血清・血漿および尿に含まれるマウスC-ペプチドIIを直接的且つ特異的に定量するためのキットです。操作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があります。なお、添付の標準マウスC-ペプチドIIは高純度合成品（純度99%以上）であり、表示の重量は絶対量を示しております。

また、ビオチン化マウスC-ペプチドIIは、HPLCにより精製したN^α-biotinylarginylarginyl mouse C-peptide IIを使用しています。

<特異性>

本キットはマウスC-ペプチドIと0.091%、ラットC-ペプチドIと0.34%、ラットC-ペプチドIIと63.3%、ラットインスリンと1.8%の交差反応性が認められます。ヒトとイヌのC-ペプチドとの交差反応性は認められません。

<測定原理>

本アッセイ系は特異性の高いウサギ抗マウスC-ペプチドII抗体を用いた競合法に、ビオチンとストレプトアビジンの非常に高い親和性を利用した測定法です。

測定プレート(96ウェル)の各ウェルには、ヤギ抗ウサギIgG抗体が固定化されています。この各ウェルに標準マウスC-ペプチドIIまたは検体、ウサギ抗マウスC-ペプチドII抗体およびビオチン化マウスC-ペプチドII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、ウェル上に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、検体中のマウスC-ペプチドII濃度を求めることができます。有効測定範囲は0.412~100 ng/mLです。

Ⅲ. キットの構成

	試薬・器具	形状	規格	内容物
1.	Antibody coated plate (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.	C-peptide II Standard (標準品)	凍結乾燥品	100ng 1本	合成 mouse C-peptide II
3.	Labeled antigen (標識抗原)	凍結乾燥品	1本	ビオチン化 mouse C-peptide II
4.	C-Peptide II antibody (特異抗体)	液状	6 mL 1本	ウサギ抗 mouse C-peptide II 抗体
5.	SA-HRP solution (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
6.	Substrate buffer (基質溶解液)	液状	26 mL 1本	0.015% 過酸化水素を含む 0.1 M クエン酸緩衝液
7.	OPD tablet (OPD 錠)	錠剤	2 錠	o-フェニレンジアミン
8.	Stopping solution (酵素反応停止液)	液状	12 mL 1本	1M 硫酸溶液
9.	Buffer solution (緩衝液)	液状	25 mL 1本	非特異的の反応除去剤を含む リン酸緩衝液
10.	Washing solution (concentrated) (濃縮洗浄液)	液状	50 mL 1本	1% Tween 20 を含む 濃縮生理食塩液
11.	Adhesive foil (プレート密閉用シール)	液状	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 (25 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 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ポリプロピレン製の試験管またはガラス試験管
5. マイクロプレート洗浄装置、用手法の場合は連続分注器、ニードルディスプレインサー、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

<試薬の調製>

1. 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 の標準液を作製する。この標準液 0.1 mL をとり、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 33.33 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、11.11、3.704、1.235、0.412 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：標識抗原の容器に緩衝液 12 mL を加え内容物を溶解させ使用する。
3. 発色剤溶液の調製法：使用時に基質溶解液 12 mL に OPD 錠 1 錠加え溶解させ使用する。
4. 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。
5. 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. 各ウエルに標準液または検体 25 μ L を入れ、ついで特異抗体 50 μ L を加え、さらに標識抗原溶液 100 μ L を加える。
3. 測定プレートをシールし、4℃で 16~18 時間静置する。
4. プレートをさらに室温にて振とうさせながら 1 時間反応を行う。
5. 各ウエル中の液を除き、洗浄液 350 μ L を満たした後、アスピレーターによって吸引するか、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。
6. 各ウエルに SA-HRP 溶液 100 μ L を加える。
7. 測定プレートをシールし、室温で 1 時間振とうする。
8. 7.の反応終了直前に OPD 錠 1 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 5 と同様の洗浄操作を 5 回行う。
10. 各ウエルに発色剤溶液 100 μ L を加え、室温で 30 分間反応させる。
11. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μ L を加える。
12. マイクロプレート用吸光度計にて 490 nm の吸光度を測定する。

Mouse C-peptide II 標準液の各濃度 (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、mouse C-peptide II 濃度を算出する。

V. 操作上の注意

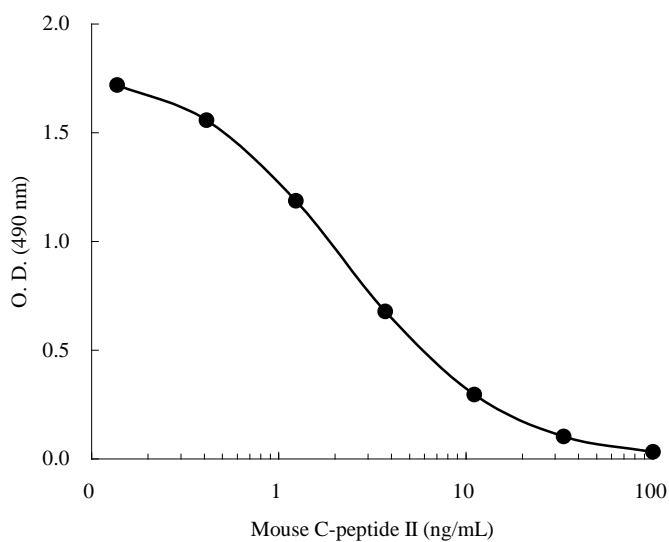
1. 血液検体は採血後ただちに測定してください。採血後ただちに測定出来ない場合は血清もしくは血漿分離後、最初に小分けして-30℃以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。血漿は EDTA を入れた採血管で採血してください。
2. 試薬は、用時調製（希釈）を原則としてください。また、キットの分割使用も可能です。溶解された試薬の残り（標準液および標識抗原溶液）は適宜小分けして-30℃にて凍結保存してください。
3. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。また、洗浄（たたく）中ウエルにほこりなどのごみが入らないように注意を払う必要があります。
4. 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なってください。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は、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。
5. 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から測定してください。また、尿検体を測定する場合、予め本キット添付の緩衝液にて10倍以上希釈して測定してください。
6. 室温で反応中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（最初の4℃での反応および呈色反応は除く）。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。
7. 標準液、検体ともに測定は二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、プレートの振とうの程度などでわずかながら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。
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. 試薬の保存もしくは使用中に、強い光が当たらないように注意してください。
11. 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使用しないでください。

VI. 基本性能

<測定範囲> 有効測定範囲 0.412 ng/mL～100 ng/mL

0.412 ng/mL を下回るような低値の検体が予想されるような場合、検出限度としてさらに 0.412 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～0.412 ng/mL の範囲での測定値の精度は上記有効測定範囲ほど高くありませんが、概算値として使用してください。

標準曲線



<再現性>

同時再現性 CV(%) 血清 4.12～5.66

日差再現性 CV(%) 血清 2.72～10.62

< 添加回収試験 >

血清

Added (ng/mL)	Recovery (%)	SD (n=5)	CV (%)
0.520	107.624	4.846	4.503
1.042	110.917	4.044	3.646
2.083	108.311	3.990	3.684
4.167	120.291	4.683	3.893
8.333	116.770	8.377	7.174
16.667	114.817	5.646	4.918

血漿

Added (ng/mL)	Recovery (%)	SD (n=5)	CV (%)
0.520	100.970	8.471	8.390
1.042	101.383	8.006	7.897
2.083	109.568	3.734	3.408
4.167	110.418	4.569	4.137
8.333	118.733	5.719	4.816
16.667	122.243	3.077	2.517

尿

Added (ng/mL)	Recovery (%)	SD (n=4)	CV (%)
0.412	100.325	4.591	4.576
1.235	98.317	2.945	2.995
3.704	100.773	6.110	6.063
11.110	101.687	7.102	6.984
33.330	101.184	12.910	12.759

注:尿サンプルは24時間採取したマウスの尿を緩衝液で10倍希釈してから添加回収試験に使用した。

< 希釈試験 >

血清、血漿および尿検体全て良好な希釈直線性を示しました。

VII. 貯蔵法および有効期間

< 貯法 >

遮光し、2~8°Cにて保存してください。

< 有効期間 >

製造日より24ヶ月間（使用期限は外箱に表示）

< 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. Wahren, J. et al: C-peptide makes a comeback, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 19 (5), 345-347, 2003
2. Pierson, CR. et al: Proinsulin C-peptide replacement in type 1 diabetic BB/Wor-rats prevents deficits in nerve fiber regeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 62 (7), 765-79, 2003
3. Li, ZG. et al: C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 19 (5), 375-85, 2003
4. Johansson, J. et al: Molecular effects of proinsulin C-peptide, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 295, 1035-1040, 2002
5. Lindon, H. et al: C-peptide exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 279 (4), 1453-1459, 2000
6. 松田万幸、岡 芳知：C-ペプチド(CPR), *日本臨床* 57 卷, 1999 年増刊号, 広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査 (4) , 313-316, 1999
7. Wentworth, BM. et al: Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin, *J. Mol. Evol.*, 23 (4), 305-312, 1986
8. Yanaihara, C. et al: Immunoreactive rat C-peptide I and II in glucose perfusate of isolated pancreas. In: *Insulin* (ed. Brandenburg, D., and Wollmer. A.), Walter de Gruyter & Co., Berlin, 651-657, 1980
9. Yanaihara, C. et al: Immunological studies on synthetic rat and guinea pig C-peptide. In: *Proinsulin, Insulin, C-peptide* (ed. Baba,S., Kaneko,S., and Yanaihara, N.), Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, 87-93, 1979

<お問い合わせ先>

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770 TEL: 0544-22-2771

www.yanaihara.co.jp ask@yanaihara.co.jp

2019年9月24日改訂