

研究用試薬

YK210 Mouse / Rat Urocortin 1 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	6～7
． 操作上の注意	8
． 基本性能	9～12
． 貯蔵法および有効期間	13
． 文献	13

YK210 Mouse/Rat Urocortin 1 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¹⁾並びにラット²⁾ウロコルチン1 は40アミノ酸残基により構成されています。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1はこの1型受容体と2型受容体の両方に結合するリガンドとして注目されています。

ウロコルチン1は血中のACTH、コルチゾールおよびANP(atrial natriuretic peptide)を増加させる他、グレリンを減少させて食欲の抑制などに関与しています³⁾。また、心不全の患者ではウロコルチン1の血中濃度が上昇する傾向が見られることから、心不全の早期診断に有用であると考えられています⁴⁾。さらに、矢内原らはウロコルチン1のラットの脳での分布を調べるため、ウロコルチン1抗体を使用して免疫染色を行った結果、多数のニューロンでウロコルチン1の免疫活性が発現されていることを見出しました。このことから、ウロコルチン1は内分泌系にも関与し、血圧の調節や認知機能を果たしている可能性が示唆されています⁵⁾。

そこで、弊社では今回、マウス並びにラットの血漿および血清中に含まれるウロコルチン1を測定するためのマウス/ラットウロコルチン1 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2(マウス)、ウロコルチン2(ラット)、ウロコルチン3(マウス、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および血清中におけるウロコルチン1を特異的かつ高感度に測定できます。

YK210 Mouse/Rat Urocortin 1 EIA キット

マウスおよびラットウロコルチン 1 測定用です。	内容
1.563 ~ 100 ng/mL の範囲で測定できます。	1) 測定プレート
40 検体を duplicate で測定できます。	2) 標準品
測定は 16 ~ 18 時間 (4) と 3 時間で終了します。	3) 標識抗原
血漿および血清サンプルの測定ができます。	4) SA-HRP 溶液
検体量は 10 μ L です。	5) 酵素基質液
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。	6) 酵素反応停止液
	7) 緩衝液
	8) 濃縮洗浄液
	9) 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および血清中に含まれるウロコルチン 1 濃度を定量的に測定するためのものです。本キットによるウロコルチン 1 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 >

本キットはウロコルチン 1 (ヒト) に対して 51.3%の交差反応性が認められますが、ウロコルチン 2 (マウス)、ウロコルチン 2 (ラット)、ウロコルチン 3 (マウス、ラット)、ACTH (マウス、ラット)、ACTH (ヒト)、CRF (マウス、ラット、ヒト) に対しては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 1 の測定は競合法に基づいて行います。測定プレート(96 ウェル)の各ウェルにはウサギ抗ウロコルチン 1 抗体が固定化されています。この各ウェルに標準液または検体、ビオチン化ウロコルチン 1 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、検体中のウロコルチン 1 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	ウサギ抗ウロコルチン 1 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 1
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 1
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. 酵素基質液	液状	12 mL	1 本	3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB)
6. 酵素反応停止液	液状	12 mL	1 本	1M 硫酸溶液
7. 緩衝液	液状	15 mL	1 本	非特異的の反応除去剤を含む トリス塩酸緩衝液
8. 濃縮洗浄液	液状	50 mL	1 本	1% Tween 20 を含む濃縮生理食塩液
9. 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 (10 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 450 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、ニードルディスペンサー、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 の標準液を調製する。この標準液 0.1 mL をとり、これを緩衝液 0.1 mL で希釈し 50 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、25、12.5、6.25、3.125、1.563 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：標識抗原の容器に蒸留水 6 mL を加え内容物を溶解させ使用する。
3. 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。
4. 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 >

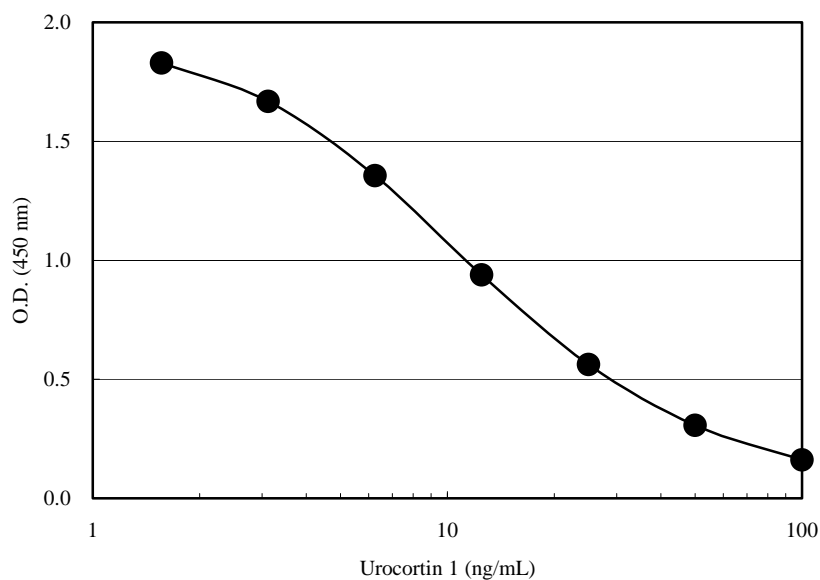
1. キット内容を室温(20~30℃)に戻す。
標準液、標識抗原溶液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. 各ウェルに、洗浄液 300 μL を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに 2 回繰り返し、合計 3 回の洗浄操作を行う。
3. 各ウェルに緩衝液 40 μL を入れ、ついで標準液または検体 10 μL を加え、さらに標識抗原溶液 50 μL を加える。
標準液の分注を始めてから検体の分注を終えるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください(30分以内)。
4. 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)、各ウェル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計4回行う。
6. 各ウェルに 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. 必要量の酵素基質液を使用する約 1 時間前に分取し、遮光しながら室温に戻す。
9. 各ウェル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計4回行う。
10. 各ウェルに酵素基質液 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、遮光の状態室温で静置し30分間反応させる。
11. 各ウェ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 450 nm 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 1 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 1 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 1 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。
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使用しないでください。
13. 一部の試薬には、ヒトの血清を使用していますので取り扱いに注意してください(HBsAG, HIV 1/2, HCV, HIV-1 AG または HIV-1 NAT, ALT および Syphilis は陰性です)。

VI. 基本性能

< 標準曲線の一例 >



< 添加回収試験 >

< ラット血清 A >

Added Urocortin 1 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	4.34		
2.0	6.62	6.34	104.42
7.0	12.64	11.34	111.46
20.0	28.45	24.34	116.89

< ラット血清 B >

Added Urocortin 1 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	2.61		
2.0	4.24	4.61	91.97
7.0	7.88	9.61	82.00
20.0	22.51	22.61	99.56

< ラット血清 C >

Added Urocortin 1 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	2.92		
2.0	4.61	4.92	93.70
7.0	7.99	9.92	80.54
20.0	22.29	22.92	97.25

<ラット血漿 A>

Added Urocortin 1 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	3.03		
2.0	5.52	5.03	109.74
7.0	9.55	10.03	95.21
20.0	20.46	23.03	88.84

<ラット血漿 B>

Added Urocortin 1 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	3.03		
2.0	5.11	5.03	101.59
7.0	9.29	10.03	92.62
20.0	19.43	23.03	84.37

<ラット血漿 C>

Added Urocortin 1 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	2.55		
2.0	4.55	4.55	100.00
7.0	7.87	9.55	82.41
20.0	20.01	22.55	88.74

<マウス血清 A>

Added Urocortin 1 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	4.79		
2.0	6.54	6.79	96.32
7.0	11.00	11.79	93.30
20.0	24.79	24.79	100.44

<マウス血清 B>

Added Urocortin 1 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	4.25		
2.0	6.10	6.25	97.60
7.0	10.68	11.25	94.93
20.0	25.01	24.25	103.13

<マウス血清 C>

Added Urocortin 1 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	4.07		
2.0	5.99	6.07	98.68
7.0	10.29	11.07	92.95
20.0	27.01	24.07	112.21

< マウス血漿 A >

Added Urocortin 1 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	5.09		
2.0	7.22	7.09	101.83
7.0	13.06	12.09	108.02
20.0	29.60	25.09	117.98

< マウス血漿 B >

Added Urocortin 1 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	4.41		
2.0	6.39	6.41	99.69
7.0	11.27	11.41	98.77
20.0	28.22	24.41	115.61

< マウス血漿 C >

Added Urocortin 1 (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	4.24		
2.0	6.88	6.24	110.26
7.0	11.90	11.24	105.87
20.0	28.20	24.24	116.34

< 希釈試験 >**< ラット血清 >**

希釈倍数	ラット A (ng/mL)	ラット B (ng/mL)
× 1	4.77	3.15
× 1.5	3.50	2.87
× 2	2.34	1.84
× 3	1.83	0.83

< ラット血漿 >

希釈倍数	ラット A (ng/mL)	ラット B (ng/mL)
× 1	2.63	3.41
× 1.5	2.08	2.47
× 2	1.37	1.60
× 3	0.99	1.07

< マウス血清 >

希釈倍数	マウス A (ng/mL)	マウス B (ng/mL)
× 1	5.15	4.31
× 1.5	3.86	3.86
× 2	3.65	2.83
× 3	2.25	1.50

< マウス血漿 >

希釈倍数	マウス A (ng/mL)	マウス B (ng/mL)
× 1	5.65	5.10
× 1.5	4.20	3.47
× 2	3.22	2.98
× 3	2.66	2.17

< 交差反応性 >

関連ペプチド	交差反応性 (%)
Urocortin 1 (mouse, rat)	100.0
Urocortin 1 (human)	51.3
Urocortin 2 (mouse)	0
Urocortin 2 (rat)	0
Urocortin 3 (mouse, rat)	0
ACTH (mouse, rat)	0
ACTH (human)	0
CRF (mouse, rat, human)	0

< 再現性試験 >

同時再現性：ラット血清	CV(%) 2.87 ~ 9.48	ラット血漿	CV(%) 1.70 ~ 13.01
マウス血清	CV(%) 3.51 ~ 5.73	マウス血漿	CV(%) 3.14 ~ 5.32
日差再現性：ラット血清	CV(%) 4.44 ~ 7.76	ラット血漿	CV(%) 5.71 ~ 15.72
マウス血清	CV(%) 5.45 ~ 9.83	マウス血漿	CV(%) 8.70 ~ 10.12

・ 貯蔵法および有効期間

< 貯法 >

遮光し、2～8℃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）

・ 文 献

1. Zhao L, Donaldson CJ et al: (1998) The structures of the mouse and human urocortin genes (Ucn and UCN). *Genomics* 50: 23-33
2. Vaughan J, Donaldson C et al: (1995) Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378: 287-292
3. Donaldson CJ, Sutton SW et al: (1996) Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology* 137: 2167-2170
4. Ng Li, Loke IW et al: (2004) Plasma urocortin in human systolic heart failure. *Clin Sci. (Lond)*, 106: 383-388
5. Koziez F, Yanaihara H et al: (1998) Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *Comp. Neurol.* 391, 1-10

< お問い合わせ先 >

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市粟倉 2480-1

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

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

2012年4月13日改定