

CTGF (Full+N-terminal region) ELISA Kit Wako**[1. Introduction]**

CTGF is a secretory protein of approximately 38 kDa produced by umbilical vein and vascular endothelial cells. CTGF is composed of 4 domains, designated Modules 1 through 4. Module 1 is the IGF-binding domain, Module 2 the vWC domain, Module 3 the TSP-1 domain, and Module 4 the CT domain, and different factors bind to each domain. CTGF is reportedly involved in the proliferation and differentiation of chondrocytes and in cell adhesion, as well as being a major factor in tissue fibrosis, and has been proposed as a candidate biomarker for various fibrotic disorders.

Meanwhile, it has been reported that CTGF in blood contains an N-terminal region in which the C-terminal region has been cleaved, giving rise to the problem that the amount of N-terminal CTGF in blood cannot be measured because it is mixed with platelet-derived full-length CTGF at the time of blood sample collection¹⁾. N-terminal CTGF has been proposed as a potential biomarker for pulmonary fibrosis²⁾.

This product is an ELISA kit for detection of CTGF (Full) + CTGF (N-terminal region) using monoclonal antibodies that recognize CTGF Module 1 and Module 2. The amount of N-terminal CTGF in blood can be measured when this product is used in combination with a kit for detecting CTGF (Full) (Code No. 290-84701 CTGF (Full) ELISA Kit Wako)¹⁾.

1) Miyazaki, O. *et al.* : *Ann. Clin. Biochem.*, **47**, 205 (2010).

2) Kono, M. *et al.* : *Clin. Chim. Acta*, **412**, 2211 (2011).

[2. Kit performance]

Calibration curve range	7.81 to 500 pM
Analyte	CTGF (Full+N-terminal region)
Sample	Human serum, human plasma (EDTA)
Sample amount required	Human serum, 5 μ L Human plasma (EDTA), 10 μ L
Assay time	2 hours 50 minutes
Detection method	Colorimetry

[3. Materials supplied]

Components	State	Amount
Antibody-coated Plate	Use after washing	96 wells (8 \times 12)/plate
CTGF Standard	Lyophilized product, use after reconstitution	1 vial
Buffer	Ready-to-use	20 mL/1 vial
Biotin-conjugated Antibody Solution	Use after preparation	100 μ L/1 vial

Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Use after preparation	100 μ L/1 vial
TMB Solution	Ready-to-use	12 mL/1 vial
Stop Solution	Ready-to-use	12 mL/1 vial
Wash Solution (10 \times)	Use after preparation	100 mL/1 vial
Standard Sample Buffer	Ready-to-use	100 mL/1 vial
Plate Seal	Ready-to-use	4 sheets
Instruction Manual	—	1 copy

[4. Assay principle]

Anti-CTGF Module 1 antibody is coated in each well of the assay plate. The standard solution or sample is added to these wells and allowed to react with the antibody. Next, biotin-conjugated anti-CTGF Module 2 antibody is added to the wells, followed by peroxidase-conjugated streptavidin. Finally, the concentration of CTGF (Full+N-terminal region) in the sample can be determined by measuring the peroxidase activity in the wells.

[5. Apparatus, equipment, and materials required]

- Purified water (distilled water)
- Test tubes for dilution of standard solution and samples
- Glass utensils for dilution of Wash Solution (graduated cylinder, beaker)
- Pipettes with disposable tips (one capable of pipetting 10 μ L of liquid accurately and one capable of pipetting 200 to 500 μ L)
- Repeater pipette, capable of repeatedly dispensing 100 μ L
- Water-absorbent material such as a paper towel (to remove any solution remaining on the plate after washing)
- Vortex-type mixer
- Microplate shaker (range approx. 500 to 800 rpm)
- Automatic washer for 96-well plate (if available) or washing bottle
- Microplate reader capable of measuring at 450 ± 10 nm, with the correction wavelength set at 600 to 650 nm
- Software for data analysis

[6. Reagent preparation]

Equilibrate the reagents in this kit to room temperature (20°C to 25°C) before use (over about 2 hours).

6-1. Preparation of Standard Solution

Reconstitute the CTGF Standard with a separately specified* volume of purified water to prepare the standard stock solution (5,000 pM). Next, add the room-temperature Standard Sample Buffer included in this kit to the standard stock solution to prepare the standard solutions at the concentrations below.

*As the volume of purified water to be added will differ depending on the lot, see the volume specified in the accompanying sheet. An example follows below.

Concentration (pM)	Volume of Standard Solution	Standard Sample Buffer
500	Standard Stock Solution : 30 μ L	270 μ L
250	500 pM solution : 150 μ L	150 μ L
125	250 pM solution : 150 μ L	150 μ L
62.5	125 pM solution : 150 μ L	150 μ L
31.3	62.5 pM solution : 150 μ L	150 μ L
15.6	31.3 pM solution : 150 μ L	150 μ L
7.81	15.6 pM solution : 150 μ L	150 μ L
0 (Blank)	–	150 μ L

6-2. Biotin-conjugated Antibody Solution

Dilute 100-fold with buffer.

6-3. Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

Dilute 100-fold with buffer.

6-4. Wash Solution (10 \times)

Dilute 10-fold with purified water (distilled water).

Example for entire 96-well microplate : Add 100 mL of Wash Solution (10 \times) to 900 mL of purified water (distilled water).

○ Other reagents are ready to use.

[7. Stability and storage of each reagent]

7-1. Antibody-coated Plate

Unused antibody-coated strips should be returned into the zip-lock bag provided in the kit and stored at 2 $^{\circ}$ C to 10 $^{\circ}$ C. These are stable until the expiration date.

7-2. CTGF Standard

Store reconstituted standard solution, which is standard stock solution 5,000 pM, at 2 $^{\circ}$ C to 10 $^{\circ}$ C and use up within 1 week. Use the standard solution diluted to each concentration immediately after preparation and do not store any remaining solution.

7-3. Buffer

If only part of the Buffer is to be used, transfer slightly more than the volume needed to another container, immediately close the cap tightly without equilibrating the remaining Buffer to room temperature, and store at 2 $^{\circ}$ C to 10 $^{\circ}$ C. It is stable until the expiration date.

7-4. Biotin-conjugated Antibody Solution

If the kit is divided for multiple assays, prepare these solutions by dilution after removal from the refrigerator, immediately close the cap tightly without equilibrating the remaining stock solution to room temperature, and store at 2 $^{\circ}$ C to 10 $^{\circ}$ C. It is stable until the expiration date. Discard any remaining diluted solution after use.

7-5. Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

If the kit is divided for multiple assays, prepare these solutions by dilution after removal from the refrigerator, immediately close the cap tightly without equilibrating the remaining stock solution to room temperature, and store at 2 $^{\circ}$ C to 10 $^{\circ}$ C. It is stable

until the expiration date. Discard any remaining diluted solution after use.

7-6. TMB Solution

If only part of the TMB Solution is to be used, transfer slightly more than the volume needed to another container, immediately close the cap tightly without bringing the remaining TMB Solution to room temperature, and store at 2 $^{\circ}$ C to 10 $^{\circ}$ C. It is stable until the expiration date.

7-7. Stop Solution

Store any unused Stop Solution at 2 $^{\circ}$ C to 10 $^{\circ}$ C with the cap tightly fastened. It is stable until the expiration date.

7-8. Wash Solution (10 \times)

Store Wash Solution (10 \times) with the cap tightly closed at 2 $^{\circ}$ C to 10 $^{\circ}$ C. It is stable until the expiration date. Discard any remaining diluted Wash Solution.

7-9. Standard Sample Buffer

If only part of the Standard Sample Buffer is to be used, transfer slightly more than the volume needed to another container, immediately close the cap tightly without equilibrating the remaining Standard Sample Buffer to room temperature, and store at 2 $^{\circ}$ C to 10 $^{\circ}$ C. It is stable until the expiration date.

[8. Sample preparation]

Serum : Dilute 31-fold with the Standard Sample Buffer contained in the kit and assay.

Plasma (EDTA) : Dilute 11-fold with the Standard Sample Buffer contained in the kit and assay.

[9. Assay procedure]

- (1) Remove the protective solution and fill each well with Wash Solution prepared beforehand, and wash 3 times. Next, invert the plate and gently blot it with a paper towel or similar product to remove any liquid remaining in the wells.
- (2) Add 50 μ L of standard solution at each concentration to the wells for assay of the standard.
- (3) Add 50 μ L of sample solution diluted with the Standard Sample Buffer to the wells for assay of the sample.
- (4) Agitate the plate on a microplate shaker or similar device.
- (5) Cover with a plate seal, and allow to stand for 1 hour at room temperature (20 $^{\circ}$ C to 25 $^{\circ}$ C).
- (6) After the reaction is complete, discard the reaction solution and fill each well with wash solution and wash 3 times. Next, invert the plate and gently blot it with a paper towel or similar product to remove any liquid remaining in the wells.
- (7) Add 50 μ L of Biotin-conjugated Antibody Solution to each well. Agitate the plate on a microplate shaker or similar device.
- (8) Cover with a plate seal, and allow to stand for 1 hour at room temperature (20 $^{\circ}$ C to 25 $^{\circ}$ C).
- (9) After the reaction is complete, repeat the washing procedure

in Step 6.

- (10) Add 50 μL of Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to each well.
Agitate the plate on a microplate shaker or similar device.
- (11) Cover with a plate seal, and allow to stand for 30 minutes at room temperature (20°C to 25°C).
- (12) After the reaction is complete, repeat the washing procedure in Step 6.
- (13) Add 100 μL of TMB Solution to each well.
Agitate the plate on a microplate shaker or similar device.
- (14) Cover with a plate seal, and allow to stand for 20 minutes at room temperature (20°C to 25°C).
- (15) Add 50 μL of Stop Solution to each well to stop the color development reaction.
- (16) Agitate the plate, then measure the absorbance at 450 nm (sub-wavelength : 620 nm) using a microplate spectrophotometer. A range of 600-650 nm can also be used for the sub-wavelength.

[10. Calculation method]

Prepare a standard curve by plotting the absorbance readings on the Y-axis against the concentrations of the standard solution (pM) on the X-axis**.

Read the unknown sample concentration (pM) corresponding to the absorbance of the diluted sample from the standard curve.

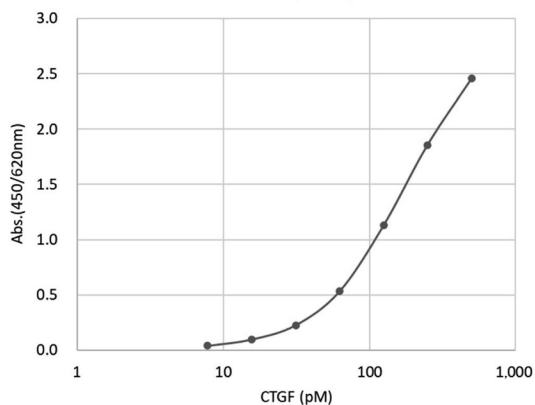
Multiply this concentration by the dilution factor to determine the assay value.

To determine the CTGF (N-terminal region) concentration, obtain the measured value with the CTGF (Full + N-terminal region) Kit *Wako* and subtract the measured value of CTGF (Full) from the measured value of CTGF (Full + N-terminal region).
Calculation formula : CTGF (N-terminal region) concentration (pM) = CTGF (Full + N-terminal region) concentration (pM) - CTGF (Full) concentration (pM)

**For calculations using computer software, we recommend the use of a cubic polynomial, and 4 or 5 parameters.

[11. Typical standard curve]

Standard curve (example)



— 5/16 —

[12. PRECAUTIONS]

1. This kit should only be used by persons who have completed training in ELISA techniques, or under the direction of an instructor.
2. When performing the assay using manual procedures, ensure that the reproducibility of the pipetting is stable.
3. Wear protective gloves, eyewear, and clothing during preparation and when using this kit.
4. Avoid contact of skin with kit reagents. If any reagents come in contact with the eyes, mouth, wounds, skin, etc., immediately wash with copious amounts of tap water and seek treatment from a physician if necessary.
5. Do not drink, eat, or smoke in any location where this kit is used.
6. Handle the sample with thoroughgoing care, being aware that the sample may present an infection risk. This kit contains animal-derived ingredients.
7. Used samples and other used consumable items should be immersed in 1% formalin, 2% glutaraldehyde or more than 0.1% sodium hypochlorite solution for more than 1 hour or be sterilized by autoclaving before disposal. Dispose of used consumable items and unused reagents in accordance with the applicable laboratory rules and local regulations.
8. Do not use reagents with different lot numbers in the same assay procedure. When allowing the plate to stand in each step, ensure that a plate seal is applied to prevent the wells drying out, contamination with foreign matter, deviations in temperature, and evaporation of the dispensed reagents.
9. The ELISA is affected by measurement environment. Strictly adhere to the measurement operations and maintain the room temperature at the place of static reaction (20 to 25°C as the temperature on the laboratory table or in the incubator). Also, avoid taking measurements in a windy, low-humidity environment (including air conditioner wind). Do not place a heat source (e.g., personal computer, incubator) near the reaction plate.

[13. Assay procedure summary]

Ensure that you read the instruction manual and check the sample conditions, assay conditions, and assay procedure before beginning the assay.

- Thoroughly equilibrate the plates and reagents to room temperature (20°C to 25°C) before use (approx. 2 hours).
- Dilution of Wash Solution (10×) : Dilute 10-fold with purified water brought to room temperature.
- Preparation of standard solution (example) : Reconstitute CTGF Standard with the amount of purified water specified in the accompanying sheet*** to prepare the Standard Stock Solution (5,000 pM).
Next, prepare the standard solution with the room-temperature Standard Sample Buffer supplied with the kit. Refer to the accompanying sheet for the amount of purified water to be added.
***The amount of purified water to be added varies depending on the lot, so first check the amount specified on the accompanying sheet. An example follows below.

— 6/16 —

Dilution example	Concentration (pM)							
	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.81	0
Standard Solution (μL)	30	150*	150*	150*	150*	150*	150	
Standard Sample								
Buffer (μL)	270	150	150	150	150	150	150	150

* : Standard solution at 1 step higher concentration

<input type="checkbox"/>	Antibody-coated Plate
<input type="checkbox"/>	↓ Wash 3 times (*1)
<input type="checkbox"/>	Sample or Standard Solution 50 μL/well
<input type="checkbox"/>	↓ Agitate (*2), then allow to stand for 1 hour at room temperature (20°C to 25°C) (*3).
<input type="checkbox"/>	*Preparation of Biotin-conjugated Antibody Solution (Dilute 100-fold with room-temperature buffer.)
<input type="checkbox"/>	↓ Wash 3 times (*1)
<input type="checkbox"/>	Biotin-conjugated Antibody Solution 50 μL/well
<input type="checkbox"/>	↓ Agitate (*2), then allow to stand for 1 hour at room temperature (20°C to 25°C) (*3).
<input type="checkbox"/>	*Preparation of Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution (Dilute 100-fold with room-temperature buffer)
<input type="checkbox"/>	↓ Wash 3 times (*1)
<input type="checkbox"/>	Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution 50 μL/well
<input type="checkbox"/>	↓ Agitate (*2), then allow to stand for 30 minutes at room temperature (20°C to 25°C) (*3).
<input type="checkbox"/>	↓ Wash 3 times (*1)
<input type="checkbox"/>	TMB Solution 100 μL/well
<input type="checkbox"/>	↓ Agitate (*2), then allow to stand for 20 minutes at room temperature (20°C to 25°C) (*3).
<input type="checkbox"/>	Stop Solution 50 μL/well
<input type="checkbox"/>	↓ Agitate (*2)
<input type="checkbox"/>	Measure the absorbance (main wavelength, 450 nm ; sub-wavelength, 620 nm ; 600 to 650 nm)

(*1) After dispensing the washing solution into the wells for each wash, shake the plate gently in the palm of your hand for 10 seconds to discard. After 3 consecutive washes, blot the plate upside down on a paper towel to completely remove the wash solution. Following removal of the wash solution, immediately dispense the next solution, ensuring that the wells do not dry out. The recommended volume of washing solution to be added when using a pipette is 300 μL/well.

(*2) Three 10-second cycles of agitation at 600 to 800 rpm are recommended.

(*3) After agitation, cover with a plate seal and allow to stand. Peel off the protective paper and affix the plate seal with the adhesive side facing the plate. Do not reuse used plate seals.

[Storage]

Store at 2°C to 10°C

[Expiration date]

Indicated on the label

[Packaging]

For 96 assays

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
 Telephone : + 81-6-6203-3741
 Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
 Richmond, VA 23237
 U.S.A.
 Telephone : + 1-804-271-7677
 Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggenstrasse 12
 D-41468 Neuss
 Germany
 Telephone : + 49-2131-311-0
 Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

CTGF (全長 + N 末領域) ELISA キットワコー

【1. はじめに】

CTGF は臍静脈と血管内皮細胞から産生される約 38kDa の分泌タンパク質です。CTGF は Module 1-4 の 4 つの部位からなり、Module 1 は IGF 結合ドメイン、Module 2 は vWC ドメイン、Module 3 は TSP-1 ドメイン、Module 4 は CT ドメインと呼ばれ、それぞれのドメインに異なる因子が結合します。軟骨細胞の増殖と分化、細胞間接着に関与することが知られているほか、組織の線維化の主要因子としても知られており、各種線維化症のマーカー候補として報告されています。

一方、血中の CTGF は C 末領域が切れた N 末領域が存在すると報告されており、採血の際に血小板由来の全長 CTGF と混ざって血中の N 末領域 CTGF 量が測定できない問題点がありました¹⁾。N 末領域の CTGF は肺線維化症のバイオマーカーになる報告がされています²⁾。

本品は CTGF Module 1 を認識するモノクローナル抗体と Module 2 を認識するモノクローナル抗体を用いて CTGF (全長) および CTGF (N 末領域) を検出する ELISA キットで、CTGF (全長) を検出するキット (コード No. 290-84701 CTGF (全長) ELISA キットワコー) と併用することで血中の N 末領域の CTGF 量を測定可能です¹⁾。

1) Miyazaki, O. *et al.*: *Ann. Clin. Biochem.*, **47**, 205 (2010).

2) Kono, M. *et al.*: *Clin. Chim. Acta*, **412**, 2211 (2011).

【2. キット性能】

検量線範囲	7.81 ~ 500pM
測定対象	CTGF (全長) および CTGF (N 末領域)
測定対象検体	ヒト血清、ヒト血漿 (EDTA)
必要検体量	ヒト血清 5 μ L ヒト血漿 (EDTA) 10 μ L
測定時間	2 時間 50 分
検出法	発色

【3. キット内容】

構 成 品	状 態	容 量
Antibody-coated Plate/ 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8 \times 12)/1 枚
CTGF Standard/CTGF 標準品	凍結乾燥品・ 溶解後使用	1 本
Buffer/ 緩衝液	そのまま使用	20mL/1 本
Biotin-conjugated Antibody Solution/ ビオチン結合抗体溶液	調製後使用	100 μ L/1 本
Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution/ ペルオキシダーゼ結合ストレプト アビジン溶液	調製後使用	100 μ L/1 本
TMB Solution/TMB 溶液	そのまま使用	12mL/1 本
Stop Solution/ 反応停止液	そのまま使用	12mL/1 本
Wash Solution (10 \times)/ 洗浄液 (10 \times)	調製後使用	100mL/1 本
Standard Sample Buffer/ 標準品検体調製液	そのまま使用	100mL/1 本

Plate Seal/ プレートシール	そのまま使用	4 枚
取扱説明書	-	1 部

【4. 測定原理】

測定プレートの各ウエルには抗 CTGF Module 1 抗体が固相化されています。このウエルに標準溶液または検体を入れて反応させます。続いてビオチン結合抗 CTGF Module 2 抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを反応させます。最後にウエル中のペルオキシダーゼ活性を測定することにより、検体中の CTGF (全長) および CTGF (N 末領域) の濃度を求めることができます。

【5. 器具および装置】

- 精製水 (蒸留水)
- 標準溶液 / 検体希釈用チューブ
- 洗浄液希釈用ガラス器具 (メスシリンダー・ビーカー)
- チップ交換型ピペット (使い捨てチップで 10 μ L を正確にピペティングできるもの、および 200 ~ 500 μ L を正確にピペティングできるもの)
- 連続分注ピペット、100 μ L を連続分注できるもの
- ペーパータオル等の吸水性のあるもの (洗浄後にプレートに残った液を取り除く)
- 攪拌器 (Vortex タイプ)
- マイクロプレート振とう器 (約 500 ~ 800rpm)
- 96 ウエルプレート用洗浄機 (あれば好ましい) または洗浄瓶
- プレートリーダー (450 \pm 10nm/600 ~ 650nm)
- データ処理ソフトウェア

【6. 試薬類の調製法】

キットの試薬は使用前に必ず室温 (20 ~ 25 $^{\circ}$ C) に戻して下さい (2 時間程度)。

6-1. 標準溶液の調製

CTGF 標準品に別紙記載の指定量^{*1}の精製水を加え溶解し、標準品原液 (5,000pM) を調製して下さい。その後室温化されたキット添付の標準品検体調製液で各濃度の標準溶液を下記のように混合して標準溶液を調製して下さい。

*1 ロットにより精製水を添加する量が異なりますので、別紙に記載の指定量をご確認下さい。下記は一例です。

濃度 (pM)	標準溶液の容量	標準品検体調製液
500	標準品原液: 30 μ L	270 μ L
250	500pM 溶液: 150 μ L	150 μ L
125	250pM 溶液: 150 μ L	150 μ L
62.5	125pM 溶液: 150 μ L	150 μ L
31.3	62.5pM 溶液: 150 μ L	150 μ L
15.6	31.3pM 溶液: 150 μ L	150 μ L
7.81	15.6pM 溶液: 150 μ L	150 μ L
0 (Blank)	-	150 μ L

6-2. ビオチン結合抗体溶液

緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。

6-3. ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液
緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。

6-4. 洗浄液 (10×)

精製水 (蒸留水) で 10 倍に希釈し使用して下さい。
例: 100mL の洗浄液 (10×) + 900mL の精製水 (蒸留水) (96
ウエル全てを使用する場合)
○その他の試薬はそのまま使用します。

【7. 試薬の安定性と保存方法】

7-1. 抗体固相化プレート

未使用抗体固相化ストリップは同梱のジップシールバックに戻し、そのまま 2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。

7-2. CTGF 標準品

調製した標準品原液 (5,000pM) は 2～10℃で保存し、1 週間以内に使用して下さい。希釈調製した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

7-3. 緩衝液

一部の溶液を使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。

7-4. ビオチン結合抗体溶液

キットを分割して使用する際は希釈時に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

7-5. ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

キットを分割して使用する際は希釈時に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

7-6. TMB 溶液

一部の溶液を使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。

7-7. 反応停止液

使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。

7-8. 洗浄液 (10×)

洗浄液 (10×) を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

7-9. 標準品検体調製液

一部の溶液を使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。

【8. 検体調製方法】

血清サンプル : キット添付の標準品検体調製液で 31 倍希釈し測定して下さい。
血漿 (EDTA) サンプル: キット添付の標準品検体調製液で 11 倍希釈し測定して下さい。

【9. 測定操作】

- (1) プレート保護液を除去し、あらかじめ調製した洗浄液を各ウエルに満たし、3 回洗浄します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。
- (2) 標準品測定ウエルに各濃度の標準溶液を 50 μ L ずつ分注します。
- (3) 検体測定ウエルに標準品検体調製液で希釈調製した検体を 50 μ L ずつ分注します。
- (4) マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌します。
- (5) プレートシールを貼り、室温 (20～25℃) で 1 時間静置します。
- (6) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし、3 回洗浄します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。
- (7) 各ウエルにビオチン結合抗体溶液を 50 μ L ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌します。
- (8) プレートシールを貼り、室温 (20～25℃) で 1 時間静置します。
- (9) 反応終了後、ステップ 6 の洗浄操作を行います。
- (10) 各ウエルにペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を 50 μ L ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌します。
- (11) プレートシールを貼り、室温 (20～25℃) で 30 分間静置します。
- (12) 反応終了後、ステップ 6 の洗浄操作を行います。
- (13) 各ウエルに TMB 溶液を 100 μ L ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌します。
- (14) プレートシールを貼り、室温 (20～25℃) で 20 分間静置します。
- (15) 各ウエルに反応停止液を 50 μ L ずつ分注し、発色反応を停止します。
- (16) 攪拌後マイクロプレート用分光光度計で 450nm (副波長 620nm) での吸光度を測定します。副波長は 600～650nm の範囲で使用できます。

【10. 計算方法】

X 軸が標準溶液濃度 (pM)、Y 軸が吸光度の検量線を作成します。検量線より、希釈検体の吸光度に対応する濃度 (pM) を読み取ります*2。

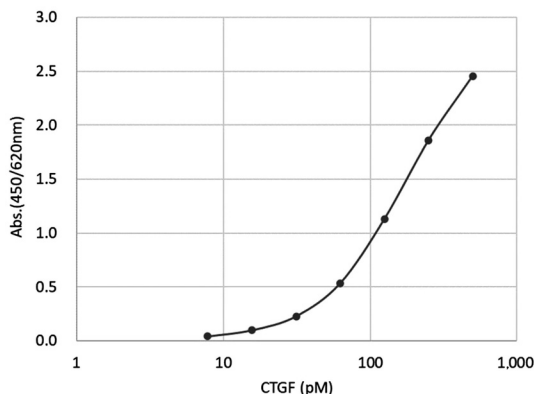
読み取った濃度に検体希釈率をかけて測定値とします。CTGF (N 末領域) 濃度を求める場合は、CTGF (全長) キットワコーで測定値を求め、CTGF (全長 + N 末領域) の測定値から CTGF (全長) の測定値を差し引くことにより、CTGF (N 末領域) 濃度を求めて下さい。

計算式: [CTGF (N 末領域) 値 (pM)] = [CTGF (全長 + N 末領域) 値 (pM)] - [CTGF (全長) 値 (pM)]

*2 コンピュータソフトでの演算処理では、3 次多項式、4 または 5 パラメーターの使用をお勧め致します。

【11. 標準曲線例】

標準曲線 (例)



【12. 使用上の注意】

1. 本キットは ELISA 法の研修を修了した方、または指導者の下でご使用下さい。
2. 用手法操作で測定する際にはピペッティング操作の再現性が安定した方がご使用下さい。
3. 準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけて下さい。
4. 試薬類を皮膚に付けしないで下さい。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受けて下さい。
5. 本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないで下さい。
6. 検体は感染の危険性があるものとして充分注意して取り扱って下さい。本キットは動物由来の成分を含んでいます。
7. 使用済みの検体、使用した消耗品等は 1% ホルマリン、2% グルタルアルデヒドまたは 0.1% 以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。使用した消耗品や未使用の薬品類は所属施設の規定並びに各地域の法令に従って廃棄して下さい。
8. ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。各ステップでの静置反応時には、ウエルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートシールを貼って下さい。
9. ELISA 法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温：20～25℃（実験台上またはインキュベータ内温度）を厳守して下さい。また、風速（エアコン風も含む）低湿度の環境下での測定は避けて下さい。

【13. 測定手順概要】

必ず取扱説明書を一読して検体条件、測定条件、測定方法を確認後、測定操作を行って下さい。

<input type="checkbox"/>	プレート、試薬類を十分に室温（20～25℃）に戻して下さい（約 2 時間）。																											
<input type="checkbox"/>	洗浄液（10×）の調製：室温化された精製水で、10 倍に希釈して下さい。																											
	標準溶液の調製（例）：CTGF 標準品に精製水を別紙に記載の指定量 ^{※3} 加え溶解し、標準品原液（5,000pM）を調製して下さい。その後、室温化したキット添付の標準品検体調製液で調製して下さい。加える精製水の量は別紙をご参照下さい。																											
<input type="checkbox"/>	※ 3 ロットにより精製水を添加する量が異なるため、別紙に記載の指定量をご確認下さい。下記は一例です。																											
調製例	<table border="1"> <tr> <td>濃度 (pM)</td> <td>500</td> <td>250</td> <td>125</td> <td>62.5</td> <td>31.3</td> <td>15.6</td> <td>7.81</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>標準溶液 (μL)</td> <td>30</td> <td>150*</td> <td>150*</td> <td>150*</td> <td>150*</td> <td>150*</td> <td>150</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>標準品検体調製液 (μL)</td> <td>270</td> <td>150</td> <td>150</td> <td>150</td> <td>150</td> <td>150</td> <td>150</td> <td>150</td> </tr> </table>	濃度 (pM)	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.81	0	標準溶液 (μL)	30	150*	150*	150*	150*	150*	150	—	標準品検体調製液 (μL)	270	150	150	150	150	150	150	150
	濃度 (pM)	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.81	0																			
標準溶液 (μL)	30	150*	150*	150*	150*	150*	150	—																				
標準品検体調製液 (μL)	270	150	150	150	150	150	150	150																				
	*：ひとつ高濃度の標準溶液																											

<input type="checkbox"/>	抗体固相化プレート
<input type="checkbox"/>	↓ 洗浄 3 回 (*①)
<input type="checkbox"/>	検体または標準溶液 50 μL/well
<input type="checkbox"/>	↓ 攪拌 (*②)、室温 (20～25℃)、1 時間反応、静置 (*③)
<input type="checkbox"/>	* ビオチン結合抗体溶液の調製 (室温化した緩衝液で 100 倍に希釈して下さい)
<input type="checkbox"/>	↓ 洗浄 3 回 (*①)
<input type="checkbox"/>	ビオチン結合抗体溶液 50 μL/well
<input type="checkbox"/>	↓ 攪拌 (*②)、室温 (20～25℃)、1 時間反応、静置 (*③)
<input type="checkbox"/>	* ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液の調製 (室温化した緩衝液で 100 倍に希釈して下さい)
<input type="checkbox"/>	↓ 洗浄 3 回 (*①)
<input type="checkbox"/>	ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液 50 μL/well
<input type="checkbox"/>	↓ 攪拌 (*②)、室温 (20～25℃)、30 分間反応、静置 (*③)
<input type="checkbox"/>	↓ 洗浄 3 回 (*①)
<input type="checkbox"/>	TMB 溶液 100 μL/well
<input type="checkbox"/>	↓ 攪拌 (*②)、室温 (20～25℃)、20 分間反応、静置 (*③)
<input type="checkbox"/>	反応停止液 50 μL/well
<input type="checkbox"/>	↓ 攪拌 (*②)
<input type="checkbox"/>	吸光度測定 (主波長 450nm、副波長 620nm : 600～650nm)

(*①) 洗浄毎に洗浄液をウェルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。3 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後はウェルの乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300 μL / ウェルです。
 (*②) 攪拌の目安は 600～800rpm - 10 秒間、3 回。
 (*③) 攪拌終了後プレートシールを貼り静置して下さい。プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

【貯 法】

2-10℃保存

【使用期限】

ラベルに記載

【包 装】

96 回用

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪府中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741