

LBIS™ Mouse/Rat High Molecular Weight Adiponectin ELISA Kit

Please, read this instruction carefully before use.

1. Intended use

LBIS™ Mouse/Rat High Molecular Weight Adiponectin ELISA Kit is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of mouse or rat High Molecular Weight Adiponectin. This is for research use only.

2. Introduction

Adiponectin is one of cytokines secreted from adipocyte (adipocytokines, adipokines), and controls lipid metabolism and insulin sensitivity. Adiponectin is an important substance showing anti-diabetic, anti-atherosclerotic, and anti-inflammatory actions. In blood, adiponectin monomer molecules are associated to form trimer, hexamer or 12 - 18-mers. The monomer form of adiponectin is found only in adipocytes, and homomultimer, i.e. trimer, hexamer and 12 - 18-mers formed from adiponectin monomer are found in plasma. Trimer (low molecular weight complexes/LMW) is formed by interaction of non-covalent bonds of triple helix area and by hydrophobic interaction between globular Cq1 domain, and hexamer (middle molecular weight complexes/MMW) or larger complexes (higher molecular weight/HMW) are formed through disulfide bonds between cysteines at 39 of LMW-complexes.

Adiponectin is believed to influence on cell growth, angiogenesis, and tissue remodeling by isolating various growth factors through binding with distinct affinity. The affinity is dependent upon the type of complexes, LMW, MMW and HMW.

The blood levels of HMW were reported to reflect BMI, sex, effect of body weight decrease, glucose tolerance, liver insulin sensitivity, metabolic syndrome or DM2 more than total adiponectin levels. This means that assay for HMW is expected to be more useful for analysis of metabolic syndrome and DM2. FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS™ Mouse/Rat High Molecular Weight Adiponectin ELISA Kit is specific to HMW.

3. Assay Principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS™ Mouse/Rat High Molecular Weight Adiponectin ELISA Kit, standards or diluted samples are incubated in monoclonal anti-adiponectin antibody-coated wells to capture HMW adiponectin. After 2 hours incubation and washing, HRP (horse radish peroxidase)-labeled anti-adiponectin antibody is added, and incubated for 90 minutes. After washing, HRP-complex remaining in wells is reacted with a TMB Solution for 30 minutes, and reaction is stopped by addition of acidic solution, and absorbance of yellow product is measured spectrophotometrically at 450 nm. The absorbance is nearly proportional to HMW adiponectin concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against standard HMW adiponectin concentrations. HMW adiponectin concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

4. Performance Characteristics

- Assay range

The assay range of the kit is 3.13 ng/mL - 200 ng/mL.

- Specificity

The kit uses two monoclonal antibodies specific to mouse/rat HMW adiponectin.

| Sample | Cross reaction | Sample | Cross reaction |
|-----------------------------|----------------|-----------------------|----------------|
| Mouse adiponectin (HMW) | 100% | Rat adiponectin (HMW) | 100% |
| Mouse adiponectin (Hexamer) | < 5% | Tested at 1000 ng/mL. | |

No cross reaction at 1000 ng/mL : Mouse adiponectin (Trimer), Mouse adiponectin (Monomer), Mouse MCH, Mouse TNF- α , Mouse INF- γ , Mouse Insulin, Mouse Leptin, Rat adiponectin (Monomer), Rat TNF- α , Rat INF- γ , Rat Insulin, Rat Leptin

- Precision of assay

Within assay variation (2 samples, 5 replicates assay), mean CV was within 10%.

- Reproducibility

Between assay variation (3 samples, 4 days, duplicate assay), mean CV was within 10%

- Recovery test

HMW Adiponectin was added in 3 concentrations to 2 serum samples and was assayed.

The recoveries were 94.4% - 105%

- Dilution test
2 serum samples were serially diluted by 3 steps.
The dilution curves showed excellent linearity. ($R^2=0.999$)

5. Reference Assay Data

| Strain | Week | Gender | numbers | Results (ng/mL) | | Remarks |
|----------|------|--------|---------|-----------------|-----|---|
| | | | | Mean | SD | |
| BALB/c | 6 w | ♂ | 10 | 2369 | 743 | Serum, ad libitum feeding ad libitum feeding |
| ICR | 6 w | ♂ | 10 | 2119 | 802 | Serum, ad libitum feeding Serum |
| CD (rat) | 8 w | ♂ | 9 | 3220 | 670 | Serum, ad libitum feeding Serum |

These data should be considered as guidance only. Each laboratory should establish its own normal and pathological reference ranges for HMW Adiponectin levels independently.

6. Precautions

- For professional use only, beginners are advised to use this kit under the guidance of experienced person.
- Wear gloves and laboratory coats when handling assay materials.
- Do not drink, eat or smoke in the areas where assays are carried out.
- In treating assay samples of animal origin, be careful for possible biohazards.
- This kit contains components of animal origin. These materials should be handled as potentially infectious.
- Be careful not to allow the reagent solutions of the kit to touch the skin, eyes and mucus membranes. Especially be careful for the Stop Solution because it is sulfuric acid. The Stop Solution and the TMB Solution may cause skin/eyes irritation. In case of contact with these wash skin/eyes thoroughly with water and seek medical attention, when necessary.
- Avoid contact with the acidic Stop Solution and TMB Solution containing hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine. Wear gloves and eye and clothing protection when handling these reagents.
- The materials must not be pipetted by mouth.
- Residual samples and used tips should be rinsed in 1% formalin, 2% glutaraldehyde, or more than 0.1% sodium hypochlorite solution for more than 1 hour, or be treated by an autoclave before disposal.
- Dispose consumable materials and unused contents in accordance with applicable regional/national regulatory requirements.
- Use clean laboratory glassware.
- In order to avoid dryness of wells, contamination of foreign substances and evaporation of dispensed reagents, never forget to cover the well plate with a plate seal supplied, during incubation.
- ELISA can be easily affected by your laboratory environment. Room temperature should be at 20°C - 25°C strictly. Avoid airstream velocity over 0.4 m/sec. (including wind from air conditioner), and humidity less than 30%.

7. Reagents supplied

| Components | Use Status | Amount |
|---|-----------------------------------|----------------------|
| (A) Antibody-coated Plate | Use after washing. | 96 wells/1 plate |
| (B) Adiponectin Standard | Concentrated. Use after dilution. | 200 μ L/1 bottle |
| (C) Buffer | Ready for use. | 60 mL/1 bottle |
| (D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution | Concentrated. Use after dilution. | 100 μ L/1 bottle |
| (F) TMB Solution | Ready for use. | 12 mL/1 bottle |
| (H) Stop Solution | Ready for use. | 12 mL/1 bottle |
| (I) Wash Solution (10 \times) | Concentrated. Use after dilution. | 100 mL/1 bottle |
| Plate Seal | – | 3 sheets |

[Storage and Stability]

[(A) Antibody-coated Plate]

If seal is not removed, put the strip back in a plastic bag with zip-seal originally used for well-plate container and store at 2°C - 10°C.

[(B) Adiponectin Standard (2000 ng/mL)]

Standard solutions prepared above should be used as soon as possible, and should not be stored.

[(C) Buffer] & [(F) TMB Solution]

If not opened, store at 2°C - 10°C. Once opened, we recommend using them as soon as possible to avoid influence by environmental condition.

[(D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution]

Unused working solution (already diluted) should be disposed.

[(H) Stop Solution]

Close the stopper tightly and store at 2°C - 10°C.

[(I) Wash Solution (10×)]

If not opened, store at 2°C - 10°C. Dispose any unused diluted buffer.

8. Equipments or supplies required but not supplied Use as a check box

Deionized water (or Distilled water). Test tubes for preparation of standard solution series.

Glassware for dilution of Wash Solution (10×) (a graduated cylinder, a bottle). Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 5 μL - 10 μL precisely, and another for 50 μL - 500 μL. Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipipette plus which can dispense 50 μL. Paper towel to remove washing buffer remaining in wells. A vortex-type mixer. A shaker for 96 well-plate (600 rpm - 1200 rpm). An automatic washer for 96 well-plate (if available), or a wash bottle with a jet nozzle. A 96 well-plate reader (450 nm ± 10 nm, 620 nm : 600 nm - 650 nm) Software for data analysis.

9. Preparation of Samples

This kit is intended to measure HMW Adiponectin in mouse or rat serum, plasma or culture medium. The necessary sample volume for the standard procedure is 10 μL.

Samples should be immediately assayed or stored below -35°C for several days. Defrosted samples should be mixed thoroughly for best results.

Hemolytic and hyperlipemic serum samples are not suitable.

***To avoid influence of blood (high lipid or hemolysis, etc.), if your original samples have heavy chyle or hemolysis, do not use them for assay. Abnormal value might be obtained with hemolysis above 80 mg/dL with this kit.**

If presence of interfering substance is suspected, examine by dilution test at more than 2 points. Turbid samples or those containing insoluble materials should be centrifuged before testing to remove any particulate matter. Sample dilution should be carried out with the (C) Buffer using small test tube such as PP, PE or glass, before assay. You can choose dilution rate 25 - 50 × if necessary.

| Example of dilution : | Rate | 50× | (25×) |
|-----------------------|------|-----|-------|
| Sample (μL) | | 10 | (10) |
| Buffer solution (μL) | | 490 | (240) |

Storage and stability

Adiponectin in samples will be inactivated if stored at 2°C - 10°C. If you have to store assay samples for a longer period, snap-freeze samples and keep them below -35°C. Avoid repeated freezing and thawing.

10. Preparation of Reagents

◆ Bring all reagents of the kit to room temperature (20°C - 25°C) before use.

◆ Prepare reagent solutions in appropriate volume for your assay. Do not store the diluted reagents.

[Concentrated reagents]

[(B) Adiponectin Standard (2000 ng/mL)]

Make a serial dilution of original standard solution to prepare each standard solution. An example is shown below.

| Volume of standard solution | (C) Buffer | Concentration (ng/mL) |
|------------------------------|------------|-----------------------|
| Original solution : 50 μL | 450 μL | 200 |
| 200 ng/mL solution : 200 μL | 200 μL | 100 |
| 100 ng/mL solution : 200 μL | 200 μL | 50 |
| 50 ng/mL solution : 200 μL | 200 μL | 25 |
| 25 ng/mL solution : 200 μL | 200 μL | 12.5 |
| 12.5 ng/mL solution : 200 μL | 200 μL | 6.25 |
| 6.25 ng/mL solution : 200 μL | 200 μL | 3.13 |
| 0 (Blank) | 200 μL | 0 |

[(D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution]

Prepare working solution by dilution of (D) with the (C) Buffer to **1 : 100**.

[(I) Wash Solution (10×)]

Dilute 1 volume of the concentrated Wash Solution (10×) to **10 volume** with deionized water (or distilled water) to prepare working solution. Example : 100 mL of concentrated Wash Solution (10×) and 900 mL of deionized water (or distilled water).

11. Assay Procedure

Remove the cover sheet of the 96 well-plate after bringing up to room temperature.

- (1) Wash the (A) Antibody-coated Plate by filling the well with washing buffer and discard 3 times (*①), then strike the plate upside-down onto several layers of paper towels to remove residual buffer in the wells.
- (2) Pipette 50 μ L of diluted samples to the designated sample wells.
- (3) Pipette 50 μ L of standard solution to the wells designated for standards.
- (4) Shake the plate gently on a plate shaker (*②)
- (5) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate for 2 hours at 20°C - 25°C.
- (6) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (7) Pipette 50 μ L of (D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution to all wells, and shake as step (4).
- (8) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate the plate for 90 minutes at 20°C - 25°C.
- (9) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (10) Pipette 50 μ L of (F) TMB Solution to wells, and shake as step (4).
- (11) Stick a plate seal (*③) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at 20°C - 25°C.
- (12) Add 50 μ L of the (H) Stop Solution to all wells and shake as step (4).
- (13) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620 nm*) immediately using a plate reader.

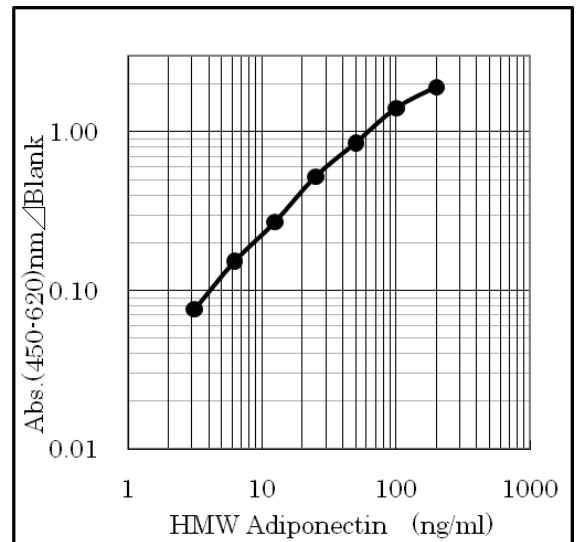
*Refer to 15. Summary of Assay Procedure for notes of *①, *② and *③.

12. Technical Tips

- In manual operation, proficiency in pipetting technique is recommended.
- The reagents are prepared to give accurate results only when used in combination within the same box. Therefore, do not combine the reagents from kits with different lot numbers. Even if the lot number is the same, it is best not to mix the reagents with those that have been preserved for some period.
- Be careful to avoid any contamination of assay samples and reagents. We recommend the use of disposal pipette tips, and 1 tip for 1 well.
- Optimally, the reagent solutions of the kit should be used immediately after reconstitution. Otherwise, store them in a dark place at 2°C - 10°C.
- Time the reaction from the pipetting of the reagent to the first well.
- Prepare a standard curve for each assay.
- Dilution of the assay sample must be carried out using the buffer solution provided in the kit.
- The TMB Solution should be almost clear pale yellow before use. It turns blue during reaction, and gives yellowish color after addition of Stop Solution. Greenish color means incomplete mixing.
- To avoid denaturation of the coated antibody, do not let the plate go dry.
- As the Antibody-coated Plate is module type of 8 wells \times 12 strips, each strip can be separated by cutting the cover sheet with a knife and used independently.
- When ELISA has to be done under the airstream velocity over 0.4 m/sec. and the humidity less than 30%, seal the well plate with a plate seal and place the well plate in an incubator or a styrofoam box in each step of incubation.

13. Calculations

- (1) Prepare a standard curve using semi-logarithmic or two-way logarithmic section paper by plotting absorbance* (Y-axis) against HMW adiponectin concentration (ng/mL) on X-axis. Physiological or pathological situation of animals should be judged comprehensively taking other examination results into consideration.
 - (2) Using the standard curve, read the HMW adiponectin concentration of a sample at its absorbance*, and multiply the assay value by dilution factor if the sample has been diluted. Though the assay range is wide enough, in case the absorbance of some samples is higher than that of the highest standard, please repeat the assay after proper dilution of samples with the buffer solution.
- * We recommend the use of 3rd order regression curve for log-log plot, or 4 or 5 parameters method for log-normal plot in computer calculation.
- (3) Assay results from this product and results from other commercially available mouse/rat (total) adiponectin ELISA kits cannot be compared because of the difference of the assay systems.



HMW adiponectin assay standard curve (an example)
Absorbance may change due to assay environment.

14. Trouble Shooting

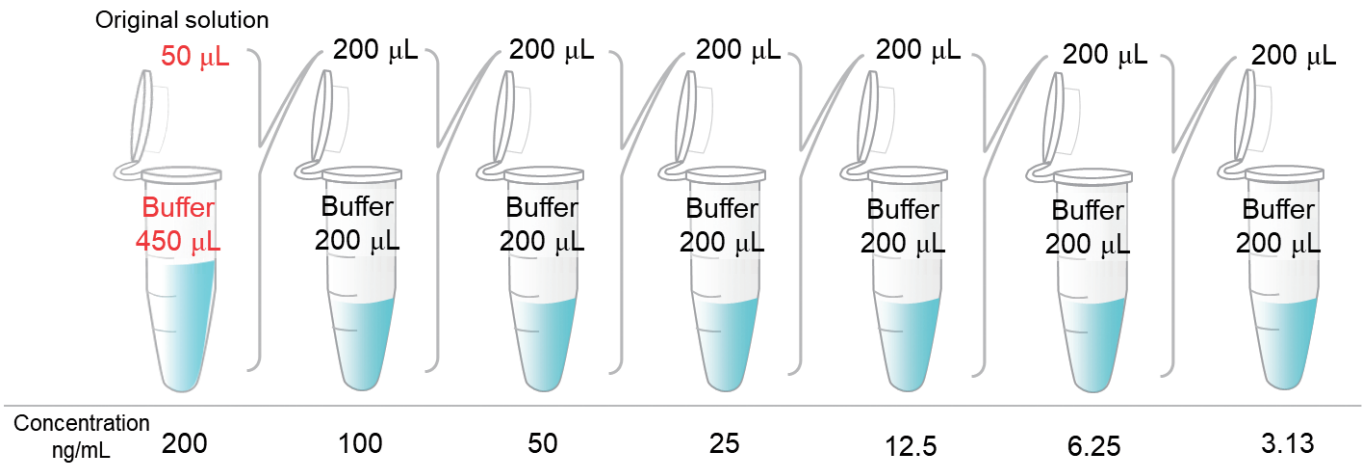
- Low absorbance in all wells
Possible explanations :
 - 1) The standard or samples might not be added.
 - 2) Reagents necessary for coloration such as Peroxidase-conjugated Antibody Solution, or TMB Solution might not be added.
 - 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of Peroxidase-conjugated Antibody Solution.
 - 4) Contamination of enzyme inhibitor (s).
 - 5) Influence of the temperature under which the kits had been stored.
 - 6) Excessive hard washing of the well plate.
 - 7) Addition of TMB Solution soon after taking out from a refrigerator might cause poor coloration owing to low temperature.
- The OD of blank is higher than that of the lowest standard concentration (3.13 ng/mL)
Possible explanations :

Improper or inadequate washing. (Change washing repetition from 3 times to 4 - 6 times after the reaction with Peroxidase-conjugated Antibody Solution.)
- High coefficient of variation (CV)
Possible explanation :
 - 1) Improper or inadequate washing.
 - 2) Improper mixing of standard or samples.
 - 3) Pipetting at irregular intervals.
- Q-1 : Can I divide the plate to use it for the other testing?
A-1 : Yes, cut off the clear seal on the plate with cutter along strip. Put the residual plate, which is still the seal on, in a refrigerator soon
- Q-2 : I found there contains liquid in 96 well-plate when I opened the box. What is it?
A-2 : When we manufacture 96 well-plate, we put protective solution in wells.

15. Summary of Assay Procedure : Use as a check box

* First, read this instruction manual carefully and start your assay after confirmation of details.

- Bring the well-plate and all reagents to **20°C - 25°C for 2 hours**.
- Wash Solution (10×) concentrate must be diluted to **10 times** by deionized water (or distilled water) that returned to 20°C - 25°C.
- Adiponectin Standard dilution example : Mix the original standard solution by pipetting so as not to make bubbles, and dilute using the (C) Buffer (of 20°C - 25°C).



- Antibody-coated Plate
- ↓ Washing 3 times (*①) *⑤
- Diluted Samples / Standards 50 µL
- ↓ Shaking (*②), Incubation for 2 hours at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- Dilute (D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution to **1 : 100** by using (C) Buffer and use. (Dilute reagents during the first reaction.)
- ↓ Washing 3 times (*①) *⑤
- Peroxidase-conjugated Antibody Solution 50 µL
- ↓ Shaking (*②), Incubation for 90 minutes at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- ↓ Washing 3 times (*①) *⑤
- TMB Solution 50 µL
(After dispense, the color turns to blue depending on the concentration.)
- ↓ Shaking (*②), Incubation for 30 minutes at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- Stop Solution 50 µL
(After dispense, the color turns to yellow depending on the concentration.)
- ↓ Shaking (*②) (Immediately shake.)
- Measurement of absorbance (450 nm, Ref 620 nm (*④)) immediately. (Ref. wave cancels the dirt in the back of plate.)

*① After dispensing wash buffer to wells, lightly shake the plate on your palm for 10 seconds and remove the buffer. Guideline of washing volume : 300 µL/well for an automatic washer and for a pipette if the washing buffer is added by pipette. In case of washing by using 8 channel pipette, sometimes the back ground tends to be high. If so, change washing frequency from 3 times to 4 - 6 times at the constant stroke after the reaction with Peroxidase-conjugated Antibody Solution.

Standard of plate-washing pressure : 5 mL/min - 25 mL/min. (Adjust it depending on the nozzle's diameter.)

*② Guideline of shaking : 600 rpm - 1200 rpm for 3 times for 10 seconds.

*③ Seal the plate during the reaction after shaking. Peel off the protective paper from the seal and stick the seal on the plate. Do not reuse the plate seal used once.

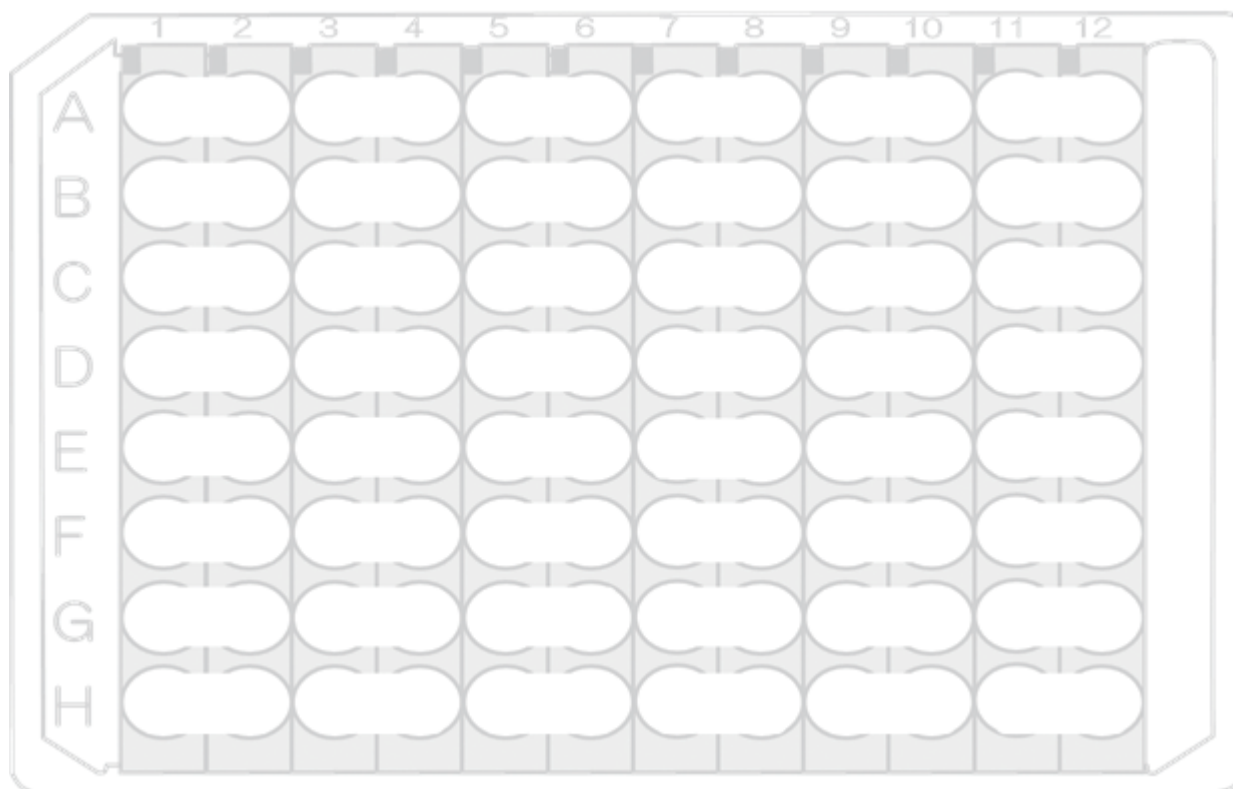
*④ 600 nm - 650 nm can be used as reference wavelength.

*⑤ After removal of wash buffer, immediately dispense the next reagent.

Worksheet Example

| | Strip 1&2 | Strip 3&4 | Strip 5&6 | Strip 7&8 | Strip 9&10 | Strip 11&12 |
|---|------------|-----------|-----------|-----------|------------|-------------|
| A | 200 ng/mL | Sample 1 | Sample 9 | Sample 17 | Sample 25 | Sample 33 |
| B | 100 ng/mL | Sample 2 | Sample 10 | Sample 18 | Sample 26 | Sample 34 |
| C | 50 ng/mL | Sample 3 | Sample 11 | Sample 19 | Sample 27 | Sample 35 |
| D | 25 ng/mL | Sample 4 | Sample 12 | Sample 20 | Sample 28 | Sample 36 |
| E | 12.5 ng/mL | Sample 5 | Sample 13 | Sample 21 | Sample 29 | Sample 37 |
| F | 6.25 ng/mL | Sample 6 | Sample 14 | Sample 22 | Sample 30 | Sample 38 |
| G | 3.13 ng/mL | Sample 7 | Sample 15 | Sample 23 | Sample 31 | Sample 39 |
| H | 0 (Blank) | Sample 8 | Sample 16 | Sample 24 | Sample 32 | Sample 40 |

Assay Worksheet



16. Storage and Expiration

The complete kit is stored at 2°C - 10°C (Do not freeze). Opened reagents should be used as soon as possible to avoid loss in optimal assay performance caused by storage environment.

LBIS™ Mouse/Rat High Molecular Weight Adiponectin ELISA Kit

[Storage] Store the kit at 2°C - 10°C (Do not freeze).

[Expiration date] Indicated on the label.

[Package] For 96 tests

[Cat #] 297-90701

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://fwk.fujifilm.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>

レビス™ マウス/ラット高分子アディポネクチン ELISA キット

1. イントロダクション

アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるサイトカインすなわち adipocytokine (adipokine) のひとつで脂肪代謝とインスリン感受性を制御し、抗糖尿病、抗アテローム (抗粥状硬化症)、抗炎症性作用を示す重要な物質です。血中アディポネクチンは単量体が集合して3量体、6量体あるいは12～18量体を形成しています。3量体 (LMW) はコラーゲン領域にある三重鎖ヘリックスの非共有結合相互作用と球状C1qドメインにある疎水性交互作用によって形成されます。3量体が集まって6量体 (MMW) やもっと大きな複合体 (HMW) を形成します。アディポネクチンはさまざまな成長因子と明瞭な親和性で結合し、隔離することで細胞の成長と血管新生、組織の再構成に影響を及ぼすとされています。

血中 HMW の測定値はトータルアディポネクチンよりも BMI や性別、体重減少の影響、グルコース・トレランス、肝臓のインスリン感受性、メタボリック症候群や2型糖尿病をより明確に反映するとされています。従って HMW の測定はトータルアディポネクチンを測定するより、メタボリック症候群や DM2 の解析により役に立つことが期待されます。弊社「マウス/ラット高分子アディポネクチン ELISA キット」は高分子アディポネクチン (HMW) のみを測定します (弊社製品ページより学術情報をご参照下さい)。

本キットはマウス/ラット高分子アディポネクチンを定量的に測定するためのサンドイッチ酵素免疫測定法です。本キットは研究のみにご使用下さい。

◆製品の特長

- ・全反応時間は4時間です。
- ・マウス/ラット血清または血漿、培養上清中の高分子アディポネクチンを測定します。
- ・微量な検体で測定可能です。
- ・1キットは96ウェルです。
- ・標準品はマウス由来です。
- ・全ての試薬は溶液タイプです。

2. 測定原理

本キットは標準品、希釈検体を抗アディポネクチン抗体固相化マイクロプレートウェル中でインキュベートします。2時間のインキュベーションと洗浄後、ペルオキシダーゼ結合抗アディポネクチン抗体を加え、90分間インキュベートします。再度の洗浄後、ウェルに残った HRP (ペルオキシダーゼ) を TMB 溶液と反応させます。反応は酸性の溶液の添加で停止され、反応の結果生じた黄色の産物が 450nm (副波長 620nm) で比色測定されます。吸光度は高分子アディポネクチン濃度にほぼ比例します。標準品濃度に対して吸光度をプロットし標準曲線を作成し、この標準曲線から未知検体中の濃度が決定されます。

3. キットの性能

- ・測定範囲
3.13ng/mL ~ 200ng/mL の範囲で測定できます。
- ・特異性
この ELISA 系では2種類の抗体によりマウス/ラット高分子アディポネクチンを特異的に捕捉します。関連物質を本キットで測定した結果は次表のとおりです。

| 検体名 | 交差性 | 検体名 | 交差性 |
|-----------------------------|------|---------------------------|------|
| Mouse Adiponectin (HMW) | 100% | Rat Adiponectin (HMW) | 100% |
| Mouse Adiponectin (Hexamer) | < 5% | 交差性は、1000ng/mL 濃度時のデータです。 | |

1000ng/mL 添加で交差性が認められなかったもの: Mouse Adiponectin (Trimer), Mouse Adiponectin (Monomer), Mouse MCH, Mouse TNF- α , Mouse INF- γ , Mouse Insulin, Mouse Leptin, Rat Adiponectin (Monomer), Rat TNF- α , Rat INF- γ , Rat Insulin, Rat Leptin

- ・精度試験 (アッセイ内変動) (5重測定、2検体) 平均 C.V. 値は 10% 未満
- ・再現性試験 (アッセイ間変動) (2重測定、3検体、4日間) 平均 C.V. 値は 10% 未満
- ・添加回収試験
2血清検体に異なる3濃度の高分子アディポネクチンを添加し測定した結果、回収率は 94.4% から 105%
- ・希釈直線性
2血清検体を連続的に希釈用緩衝液で3段階希釈し測定した結果、直線回帰の R² は 0.999

4. 参考値

| 系統 | 週齢 | 雌雄 | 匹数 | 測定値 (ng/mL) | | 備考 |
|----------------|----|----|----|-------------|-----|---------|
| | | | | Mean | SD | |
| BALB/c (mouse) | 6w | ♂ | 10 | 2369 | 743 | 血清、不断給餌 |
| ICR (mouse) | 6w | ♂ | 10 | 2119 | 802 | 血清、不断給餌 |
| CD (rat) | 8w | ♂ | 9 | 3220 | 670 | 血清、不断給餌 |

飼育条件、採血条件、検体保管条件により測定値は変動しますので、この測定値は目安としてお使い下さい。

5. ご使用前にご確認頂きたい技術上のヒント及び注意事項

- 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（エアコンの風も含む）：0.4m/sec 以上、湿度 30% 未満の環境下での測定は避けて下さい。やむを得ず、測定操作を風速：0.4m/sec 以上、湿度 30% 未満の環境下で実施する場合には、各ステップの静置反応時、プレートシールをすることに加え、下記のような方法をご検討下さい。
例) インキュベータ内、発泡スチロール製箱内で静置反応させる等。測定室の環境条件により対策方法が異なる場合がありますので、詳細はお問い合わせ下さい。
- 各ステップでの静置反応時には、ウェルの乾燥、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。
- 検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけて下さい。1 ウェル / 1 チップのご使用をお薦めします。
- TMB 溶液は 96 ウェルプレートに使用するまでは薄い黄色澄明です。光を避けて保存して下さい。
- 反応停止液は使用するまでは無色です。
- 本キットは ELISA 法の研修を修了した方、または指導者の方のご使用下さい。的手法操作で測定する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。
- 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。
- 試薬類を皮膚に付けないで下さい。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。
- 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。
- 試薬類は口でピペッティングしないで下さい。
- ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。
- 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。
- 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。

6. 構成品

| 構成品 | 状態 | 容量 |
|---|--------|----------------------|
| (A) Antibody-coated Plate 抗体固相化プレート | 洗浄後使用 | 96wells (8×12) / 1 枚 |
| (B) Adiponectin Standard アディポネクチン標準品 | 希釈後使用 | 200 μL / 1 本 |
| (C) Buffer 緩衝液 | そのまま使用 | 60mL / 1 本 |
| (D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution ペルオキシダーゼ結合抗体溶液 | 希釈後使用 | 100 μL / 1 本 |
| (F) TMB Solution TMB 溶液 | そのまま使用 | 12mL / 1 本 |
| (H) Stop Solution 反応停止液 | そのまま使用 | 12mL / 1 本 |
| (I) Wash Solution (10×) 洗浄液 (10×) | 希釈後使用 | 100mL / 1 本 |
| Plate Seal プレートシール | — | 3 枚 |

【試薬の安定性と保存方法】

(A) 抗体固相化プレート

未使用（冷蔵状態を保った状態でシールを剥がしていない）抗体固相化ストリップは同梱のジップシールパックに戻し、そのまま 2℃～10℃で保存して下さい。

(B) アディポネクチン標準品 (2000ng/mL)

キットを分割して使用する際は使用する直前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ないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

(C) 緩衝液 及び (F) 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、残りは室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。

(D) ペルオキシダーゼ結合抗体溶液

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ないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(H) 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。

(I) 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。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

7. キット以外に必要な器具 □チェックリスト

□精製水 (蒸留水) □標準溶液希釈用試験管 □洗浄液希釈用ガラス器具 (メスシリンダー・ビーカー・瓶) □チップ交換型ピペット (使い捨てチップで5μL～10μLを正確にピペッティングできるもの、及び50μL～500μLを正確にピペッティングできるもの) □連続分注ピペット (例 Eppendorf の multipette plus)、50μL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600rpm～1200rpm) □96 ウェルプレート用洗浄機 (あれば好ましい) または噴射ピン □96 ウェルプレートリーダー (450nm ± 10nm、620nm : 600nm～650nm) □データ計算用ソフトウェア

8. 検体の調製

本キットはマウス/ラット血清または血漿、培養上清中の高分子アディポネクチンを測定します。

- ・検体は定法にしたがって採取しすぐに測定するか、-35℃以下で凍結保存して下さい。凍結した検体は測定する直前に解凍し十分に攪拌して下さい。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。正しい結果が得られない原因になります。
- ・採血の際、ヒト用採血管をご使用になるのは避けて下さい。血清分離剤や凝固促進剤等の添加剤が測定系に影響を与える可能性が考えられます。
- ・溶血した検体や高脂質検体は異常値の発生原因となりますので避けて下さい。
※血液成分の影響 (高脂質・溶血等) を抑制する為に原検体中の脂質 (乳び)・溶血が高い場合は異常値発生の原因となる場合がありますので測定に使用しないで下さい。本キットの場合、溶血は80mg/dL以上で影響が現れます。
- ・濁り及び不溶物のある検体は遠心分離等で除去後測定に用いて下さい。
- ・妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、異なる2ポイント以上の希釈率で希釈直線性を確認して下さい。
- ・検体を希釈する場合は、あらかじめ試験管 (PP、PE、ガラス製) 等を用いて緩衝液で希釈し測定ウェルに分注して下さい。正常検体の希釈目安は50倍 (～25倍) です。

| 希釈例 | 倍率 | 50倍 | (25倍) |
|-----|----------|-----|-------|
| | 検体 (μL) | 10 | (10) |
| | 緩衝液 (μL) | 490 | (240) |

【検体の安定性と保存方法】

検体を長期に保管する場合は、-35℃以下での凍結保管を推奨します。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。また、検体の希釈は用時調製として下さい。

9. 試薬の調製

- *キットの試薬は使用前に必ず室温 (20℃～25℃) に戻して下さい (2時間位が目安です)。
- *6.で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で調製して下さい。
- *測定に必要な分だけ試薬を調製して下さい (ご不明な際にはお問い合わせ下さい)。

【濃縮された試薬類】

[(B) アディポネクチン標準品 (2000ng/mL)] ; 標準曲線作成用

(B) アディポネクチン標準品 (2000ng/mL) (原液) と (C) 緩衝液を使って標準溶液を調製して下さい。

下記は一例です。

| 標準品の容量 | (C) 緩衝液 | 濃度 (ng/mL) |
|--------------------------|-------------|------------|
| 標準品原液 50 μ L | 450 μ L | 200 |
| 200ng/mL 溶液 200 μ L | 200 μ L | 100 |
| 100ng/mL 溶液 200 μ L | 200 μ L | 50 |
| 50ng/mL 溶液 200 μ L | 200 μ L | 25 |
| 25ng/mL 溶液 200 μ L | 200 μ L | 12.5 |
| 12.5ng/mL 溶液 200 μ L | 200 μ L | 6.25 |
| 6.25ng/mL 溶液 200 μ L | 200 μ L | 3.13 |
| 0 (Blank) | 200 μ L | 0 |

[(D) ペルオキシダーゼ結合抗体溶液]

100 μ L を充分分取できる量をご提供しています。濃縮液を (C) 緩衝液で **100 倍** に希釈して下さい。

[(I) 洗浄液 (10 \times)]

洗浄液 (10 \times) を室温化された精製水 (蒸留水) で **10 倍** に希釈して下さい。

例：100mL の洗浄液 (10 \times) + 900mL の精製水 (蒸留水) (96 ウェル全てを使用する場合)

10. 測定操作法

洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意して下さい。

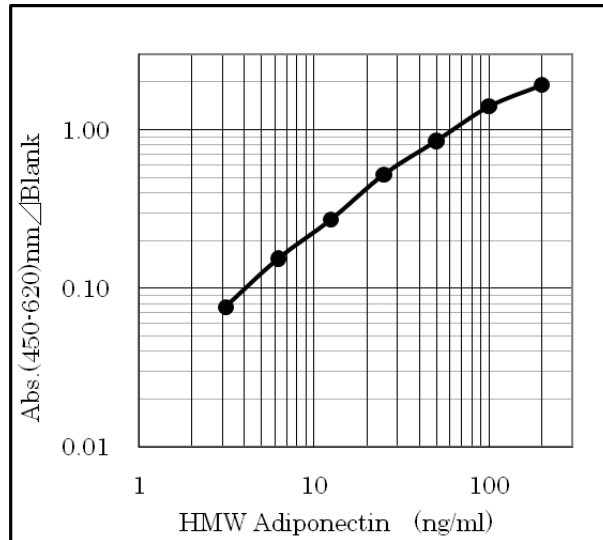
(A) 抗体固相化プレートのシールは、プレートが十分に室温に戻ってから剥がして下さい。

- (1) プレート保護液を捨て、あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし、3回洗浄 (*①) 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ェルに残った液を取り除きます。
 - (2) 検体測定ウェルに緩衝液で希釈した検体を 50 μ L ずつ分注します。
 - (3) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 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 (*②) します。
 - (5) プレートシールを貼り、室温 (20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) で 2 時間静置 (*③) します。
 - (6) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし、3回洗浄 (*①) 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ェルに残った液を取り除きます。
 - (7) 各ウェルに (D) ペルオキシダーゼ結合抗体溶液を 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 (*②) します。
 - (8) プレートシールを貼り、室温 (20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) で 90 分間静置 (*③) します。
 - (9) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし 3 回洗浄 (*①) 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ェルに残った液を取り除きます。
 - (10) 各ウェルに (F) TMB 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 (*②) します。
 - (11) プレートシールを貼り、室温 (20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) で 30 分間静置 (*③) します。
 - (12) 各ウェルに (H) 反応停止液を 50 μ L ずつ分注し、発色反応を停止します。
 - (13) 攪拌 (*②) 後、直ちに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 600nm ~ 650nm の範囲で使用できます。
- (*①)、(*②)、(*③) 13. 測定手順概要とチェックリストをご参照下さい。

11. 計算

- (1) 測定毎に標準曲線を作成します。両対数を使用し X 軸を標準溶液濃度 (ng/mL)、Y 軸を吸光度の標準曲線グラフを作成して下さい。
 - (2) 標準曲線より、検体の吸光度に対応する濃度 (ng/mL) を読み取ります。読み取った濃度に検体希釈率を乗じ測定値とします。
- * 検体の吸光度が標準曲線吸光度より外れた場合は (C) 緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施して下さい。
- * 一番高濃度の標準溶液の吸光度付近の検体は (C) 緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定することをお勧め致します。
- * 演算処理では、3 次多項式または 4 または 5 パラメーターの使用をお勧め致します。
- * 本キットにおける測定結果と、反応系が異なる市販のマウス並びにラットトータルアディポネクチン測定キットで得た測定結果の対比はできません。

下のグラフは標準曲線例です (吸光度は、測定環境により変動します)。プレートリーダーは Safire2 (TECAN) を使用。



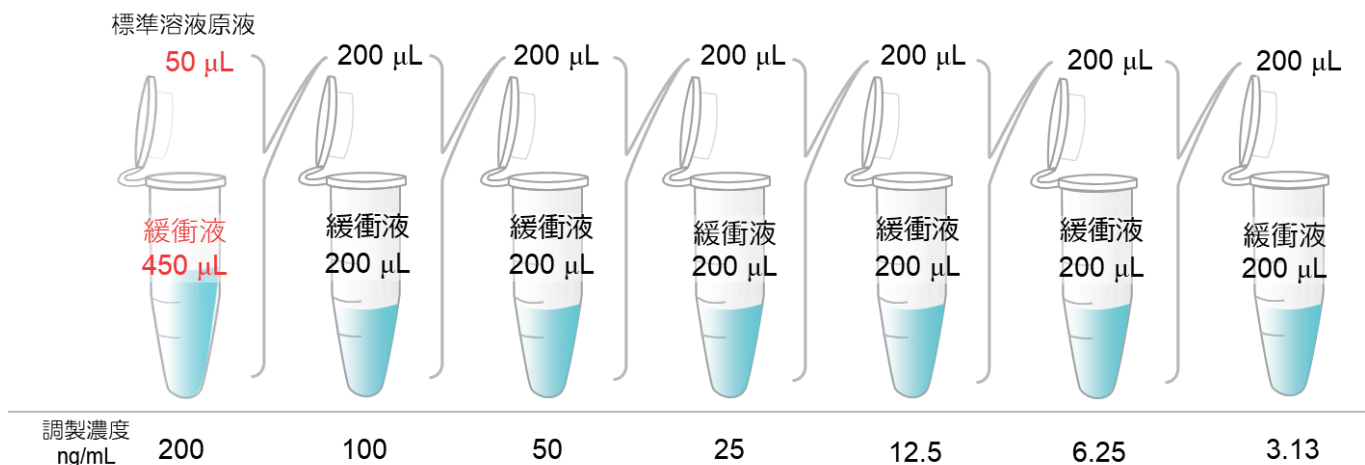
12. トラブルシューティングと Q&A

- ・すべてのウェルでの反応が弱い
原因として考えられること
 - 1) 標準品や検体の入れ忘れ。
 - 2) 発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
 - 3) 発色に関連する試薬溶液の取り違いや希釈調製不良。
 - 4) 酵素阻害剤の混入。
 - 5) キット保管温度の影響（凍結した場合）。
 - 6) プレートの過剰な洗浄。
 - 7) TMB 溶液の温度が低かった。
- ・最小標準溶液濃度（3.13ng/mL）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。
原因として考えられること
洗浄が不適當、不完全であった。
(ペルオキシダーゼ標識物と反応後の洗浄回数3回を同じ流速で4回～6回に増やして下さい。)
- ・変動係数 (CV) が大きい
原因として考えられること
 - 1) 洗浄が不適當、不完全であった。
 - 2) 標準品や管理血清、または検体の攪拌が不充分であった（凍結検体の攪拌は充分に行って下さい）。
 - 3) ピペッティング操作が一定ではなかった。
- ・Q-1: キットは分割して使用することができますか？
A-1: できます。プレートに貼られた透明シールをストリップの間にそってカッターなどで切り離してご使用下さい。使用しないプレートはシールを貼った状態で冷蔵庫に保管して下さい。
- ・Q-2: プレートを取り出したらウェルの中に液体が入っていましたが何ですか？
A-2: 出荷時には保存安定液が充填してあります。

13. 測定手順概要とチェックリスト

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。

- ウェルプレート、試薬類を十分に室温（20℃～25℃）に戻して下さい。**室温化には2時間位必要**
- (I) 洗浄液（10×）の希釈：室温化された精製水で、**10倍**に希釈して下さい。
- 標準品の希釈（例）：標準溶液を泡立てないようピペッティングで攪拌し、室温化された（C）緩衝液で、希釈して下さい。



各操作注意事項並びに関連情報

- 抗体固相化プレート
- ↓ 洗浄 3 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注) *①
- 希釈検体または標準品 50 µL
- ↓ 攪拌、室温 (20℃～25℃)、2 時間反応、静置 *②*③
- (D) ペルオキシダーゼ結合抗体溶液の希釈。室温化された (C) 緩衝液で **100 倍** に希釈して下さい。
希釈溶液の調製は第一反応中に行う。
- ↓ 洗浄 3 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注) *①
- ペルオキシダーゼ結合抗体溶液 50 µL
- ↓ 攪拌、室温 (20℃～25℃)、90 分間反応、静置 *②*③
- ↓ 洗浄 3 回 (洗浄液除去後、直ちに (F) TMB 溶液分注) *①
- TMB 溶液 **TMB が室温化されていることを確認** 50 µL
- 分注後、濃度により青色に変色
- ↓ 攪拌、室温 (20℃～25℃)、30 分間反応、静置 *②*③
- 反応停止液 **強酸性につき取扱注意** 50 µL
- 分注後、濃度により黄褐色に変色
- ↓ 攪拌 (直ちに攪拌) *②
- 直ちに吸光度測定 (主波長 450nm、副波長 620nm : 600nm～650nm)
- 副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします

(*①) 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。万一、最小標準溶液濃度 (3.13ng/mL) の OD 値よりブランク OD 値が高くなる場合は解決方法の 1 つとして、ペルオキシダーゼ結合物と反応後の洗浄回数 3 回を同じ流速で 4 回～6 回に増やして下さい。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5mL / 分～25mL / 分 (ノズルの径により異なります) です。第一反応後の初回の洗浄のみウェル間のコンタミに注意して下さい。

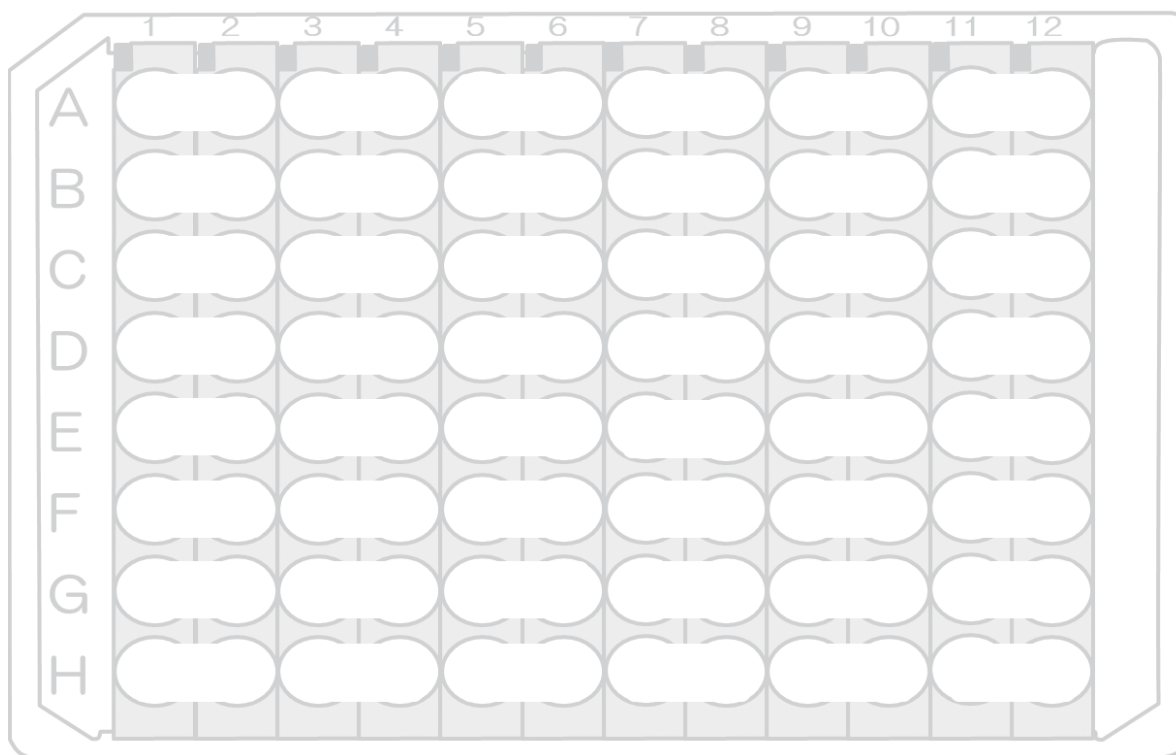
(*②) 攪拌の目安は 600rpm～1200rpm-10 秒間、3 回。

(*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。

ワークシート (例)

| | Strip 1&2 | Strip 3&4 | Strip 5&6 | Strip 7&8 | Strip 9&10 | Strip 11&12 |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-------------|
| A | 200ng/mL | 検体 1 | 検体 9 | 検体 17 | 検体 25 | 検体 33 |
| B | 100ng/mL | 検体 2 | 検体 10 | 検体 18 | 検体 26 | 検体 34 |
| C | 50ng/mL | 検体 3 | 検体 11 | 検体 19 | 検体 27 | 検体 35 |
| D | 25ng/mL | 検体 4 | 検体 12 | 検体 20 | 検体 28 | 検体 36 |
| E | 12.5ng/mL | 検体 5 | 検体 13 | 検体 21 | 検体 29 | 検体 37 |
| F | 6.25ng/mL | 検体 6 | 検体 14 | 検体 22 | 検体 30 | 検体 38 |
| G | 3.13ng/mL | 検体 7 | 検体 15 | 検体 23 | 検体 31 | 検体 39 |
| H | 0 (Blank) | 検体 8 | 検体 16 | 検体 24 | 検体 32 | 検体 40 |



14. キットの保存と使用期限

キットは2℃～10℃で保存して下さい（凍結厳禁）。使用期限の過ぎた試薬は使用しないで下さい。開封した各試薬につきましては、保管状態により影響を受ける可能性がありますので早めのご使用を推奨します。

【測定名】

【所属】

【測定者】

【測定日】

【ロット番号】

【使用期限】

【備考】

【製品名】 レビス™ マウス / ラット 高分子アディポネクチン ELISA キット
【和光コード】 297-90701
【英語表記】 LBIS™ Mouse/Rat High Molecular Weight Adiponectin ELISA Kit
【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