

## Oxytocin ELISA Kit Wako

### [1. Introduction]

This item is an ELISA kit designed for the quantitative detection and measurement of oxytocin in biological fluids such as saliva, urine, serum and plasma. The kit can be measured by a simple pretreatment, and does not require purification using a C18 column and organic solvent, which was conventionally performed as a pretreatment method. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Oxytocin is called as a love or happy hormone consisting of 9 amino acids. It also has stress relief, learning ability improvement, anxiolytic, and anti-fear effects, and is expected to have therapeutic effects on mental illness (autism, depression, etc.).

### [2. Performance]

Standard curve range	4.00-1,024 pg/mL
Measuring object	Oxytocin
Sample	Human saliva, urine, serum, plasma Mouse serum, plasma Rat serum, plasma
Sample volume	50 $\mu$ L (n = 1, minimum volume) 200 $\mu$ L (n = 2, recommended volume)
Assay time	Approx. 2.5 hours
Detection method	Luminescent detection*

\* Requires luminescence plate reader for measurement.

### [3. Material supplied]

Components	State	Volume or quantity
Antibody-coated Plate	Use after washing	1 plate 96 wells (8 $\times$ 12)
Oxytocin Standard	Use after dilution	100 $\mu$ L/ 1 bottle
Buffer	Ready-to-use	60 mL/ 1 bottle
Biotin-conjugated Oxytocin	Use after reconstitution and dilution	1 bottle
Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Concentrated Use after dilution	100 $\mu$ L/ 1 bottle
Luminescent Reagent 1	Ready-to-use	6 mL/1 bottle
Luminescent Reagent 2	Ready-to-use	6 mL/1 bottle
Wash Solution (10 $\times$ )	Concentrated Use after dilution	100 mL/ 1 bottle
Sample Buffer 1	Ready-to-use	5 mL/1 bottle

Sample Buffer 2	Ready-to-use	12 mL/ 1 bottle
Plate Seal	—	4 sheets
Instruction manual	—	1 book

### [4. Measurement principle]

The microplate is coated with anti-oxytocin antibody. In each well, the standard solution or sample and biotin-conjugated oxytocin are incubated to proceed with the antigen-antibody reaction. Furthermore, peroxidase-conjugated streptavidin is added to proceed with the biotin-streptavidin binding. Finally, peroxidase activity in each well is measured to determine oxytocin in the sample.

### [5. Equipment or materials required but not supplied]

- Purified water (distilled water)
- Test tube for dilution of a standard solution and samples
- Glass utensils for dilution of Wash Buffer (e.g. Graduated cylinders and beakers)
- Pipettes with disposable tips (one capable of pipetting 10  $\mu$ L of liquid accurately and one capable of pipetting 200 to 500  $\mu$ L)
- Dispenser capable of dispensing
- Water-absorbable material such as paper towel (to remove liquid remaining on a plate after washing)
- Mixer (Vortex type)
- Shaker for 96-well plate (approximately 600 to 800 rpm)
- Automatic washer for 96-well plate (If available) or washing bottle
- Microplate reader for luminescence detection
- Software for data analysis

### [6. Reagent preparation]

Bring the reagents to room temperature about 2 hours prior to use.

#### 6.1. Standard Solution

Standard solutions are prepared using Standard solution (102.4 ng/mL) and Buffer as shown below.

Concentration of the standard solution (pg/mL)	Volume of the standard solution	Volume of Buffer
1024	Standard solution (102.4 ng/mL) : 30 $\mu$ L	2970 $\mu$ L
512	Standard solution (1024 pg/mL) : 150 $\mu$ L	150 $\mu$ L
256	Standard solution (512 pg/mL) : 150 $\mu$ L	150 $\mu$ L
64.0	Standard solution (256 pg/mL) : 50 $\mu$ L	150 $\mu$ L
16.0	Standard solution (64 pg/mL) : 50 $\mu$ L	150 $\mu$ L
4.00	Standard solution (16 pg/mL) : 50 $\mu$ L	150 $\mu$ L
0 (B0)	—	150 $\mu$ L

#### 6.2. Biotin-conjugated Oxytocin

Reconstitute Biotin-conjugated Oxytocin with 100  $\mu$ L of distilled water and completely dissolved. Dilute the solution 100-fold with Buffer.

### 6.3. Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution is diluted 100-fold with Buffer.

### 6.4. Luminescent Reagent 1/2

Mix Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 in 1:1 (vol./vol.) and incubate for 30 minutes before use. Keep in the dark.

### 6.5 Wash Solution (10×)

Wash Solution (10×) is diluted 10-fold with purified water (distilled water).

(e.g.) When solution for 96-well reaction is prepared.

Add 100 mL of Wash Solution (10×) to 900 mL of purified water (distilled water) to prepare 1,000 mL of Wash Solution (1×). Other reagents are ready-to-use.

## **[7. Stability and storage method of each reagent]**

### 7.1. Antibody-coated Plate

Unused antibody-immobilized strips (kept refrigerated and sealed) should be returned into the zip-seal bag provided in the kit and stored at 2-10°C. These are stable until the expiration date.

### 7.2. Oxytocin Standard

Store at 2-10°C. It is stable until the expiration date. Discard the remaining diluted standard solution after use.

### 7.3. Buffer

If a part of Buffer is used, transfer the volume slightly greater than needed to another container, immediately close cap lid tightly without bringing the remaining Buffer to room temperature, and store at 2-10°C. It is stable until the expiration date.

### 7.4. Biotin-conjugated Oxytocin

Store at 2-10°C. It is stable until the expiration date.

Reconstituted standard solution should be stored at 2-10°C and should be used up within 2 weeks. Discard the remaining diluted solution after use.

### 7.5. Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

If the kit is divided for multiple assays, prepare these solutions by dilution just after taking out of the refrigerator, immediately close the cap tightly without bringing the remained stock solution to room temperature, and store at 2-10°C. It is stable until the expiration date. Discard the remaining diluted solution after use.

### 7.6. Luminescent Reagent 1, Luminescent Reagent 2

If the kit is divided for multiple assays, prepare these solutions just after taking out of the refrigerator, immediately close the cap tightly, and store at 2-10°C. It is stable until the expiration date. Discard the remaining mixed Luminescent Reagent.

### 7.7. Wash Buffer (10×)

Store the Wash Buffer (10×) with the cap tightly closed at 2-10°C if applicable.

It is stable until the expiration date. Discard the remaining diluted washing solution.

### 7.8. Sample Buffer 1, Sample Buffer 2

Store with the cap tightly closed at 2-10°C. It is stable until the expiration date.

## **[8. Sample preparation]**

8-1. Add Sample Buffer 1 to sample in the table below. Shake it and incubate 5 minutes. Shake it again and incubate 5 minutes.

8-2. Add Sample Buffer 2 which gel is mixed evenly to sample in the table below. Shake it and incubate 5 minutes. Shake it again and incubate 5 minutes.

8-3. After shake it, centrifuge (5000-6000 g, 10 minutes, 4°C) and use the supernatant as a sample for measurement. Don't suck the gel in the buffer when collecting it.

	Urine			Saliva/Serum/plasma		
Sample volume	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L
Sample Buffer 1	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Sample Buffer 2	27.5 $\mu$ L	55 $\mu$ L	110 $\mu$ L	27.5 $\mu$ L	75 $\mu$ L	150 $\mu$ L
Dilution factor	1.375			1.475		

(Precaution for sample)

• Add 100 KIU/mL aprotinin and 1/750 amount (v/v) Proclin950 to sample at the time of the sample collection.

• It is recommended to store the sample with 100 KIU/mL aprotinin and 1/750 amount (v/v) Proclin950 at -80°C or lower for long-term storage. Avoid repeated freezing and thawing. Thaw the frozen sample just before assay and thoroughly agitate. Prepare the sample before use.

• If presence of interfering substances is suspected for the sample, dilute the concerned one at multiple dilution ratios to check the dilution linearity. Dilute the prepared sample with the Buffer.

• Samples with turbidity and insoluble matter should be used for measurement after removal by centrifugation.

• When diluting a sample, dilute it with physiological saline or Buffer in this kit in advance using a test tube (PP, PE), and dispense it into the measurement well after the preparation process.

• For assay values below the detection limit, try concentrating the sample using the following method.

Note, however, that the amount of sample required will be greater than that used for a normal assay.

For human saliva, human serum and human urine samples, we confirmed concentrating samples up to 3-fold.

## [Reference]

### Sample Concentration Method

Example of concentration protocol (3-fold concentration, duplicate assay)

(1) Collect samples of 300  $\mu$ L (3 times the amount of sample required for a normal duplicate assay).

(2) Add 30  $\mu$ L of Sample Buffer 1. Stir, then allow to stand for 5 minutes. Stir again, and allow to stand for further 5 minutes.

- (3) Add 225  $\mu$ L (for saliva/serum samples) or 165  $\mu$ L (for urine samples) of Sample Buffer 2. Stir, then allow to stand for 5 minutes. Stir again, and allow to stand for further 5 minutes.
- (4) Stir, then centrifuge the sample (5000-6000 g, 10 min, 4°C) and separate 360  $\mu$ L of the supernatant.
- (5) Concentrate and dry the separated supernatant in accordance with the following conditions.  
Equipment : miVac Duo LV (Cat. No. DPP-10000-G00, SP Scientific)  
Concentration conditions : 30°C, 3 hours  
Note : Store dried samples at 4°C.
- (6) Add 120  $\mu$ L of the Buffer supplied with the kit to the dried sample (3-fold concentrated by volume).

#### 【9. Assay Procedure】

1. Wash 4 times the plate with Wash Buffer (1  $\times$ ). Invert the plate and gently blot it against clean paper towels.
2. Add 50  $\mu$ L of biotin-conjugated oxytocin solution to each well.
3. Agitate the plate on a microplate shaker.
4. Add 50  $\mu$ L of standard solution to each well.
5. Add 50  $\mu$ L of samples after preparation (shown as 8. Sample preparation) to each well.
6. Agitate the plate on a microplate shaker.
7. Cover with a Plate Seal. Incubate for 2 hour at room temperature (20-25°C).
8. Discard the solution and wash 4 times with Wash Buffer (1  $\times$ ). Invert the plate and gently blot it against clean paper towels.
9. Add 100  $\mu$ L of diluted peroxidase-conjugated streptavidin solution to each well.
10. Agitate the plate on a microplate shaker.
11. Cover with a new Plate Seal. Incubate for 30 minutes room temperature (20-25°C).
12. Repeat the wash as in step 8.
13. Add 100  $\mu$ L of mixed luminescent reagent 1 and 2 (1 : 1) to each well.
14. Shake the plate for 1 minute using the microplate shaker.
15. After agitation, determine the luminescent intensity (RLU) using the 96-well microplate reader (for luminescence measurement). It is recommended to perform the measurement 10 to 20 minutes after addition of the luminescent reagent.

#### (Calculation)

Create a standard curve by plotting the concentrations (pg/mL) of the standard solutions along the X axis and the RLU ( $B/B_0$  (%)) along the Y axis. Read the concentration (pg/mL) corresponding to the RLU ( $B/B_0$  (%)) of the diluted sample. Multiply the concentration read with the sample dilution factor to obtain a measured value.

\*Use of a tertiary polynomial equation with 4 or 5 parameters is recommended for the arithmetic processing using computer software.

\*The oxytocin concentration using this kit is determined with reference to the WHO International Standard (Oxytocin 4th

International Standard ; NIBSC code : 76/575).

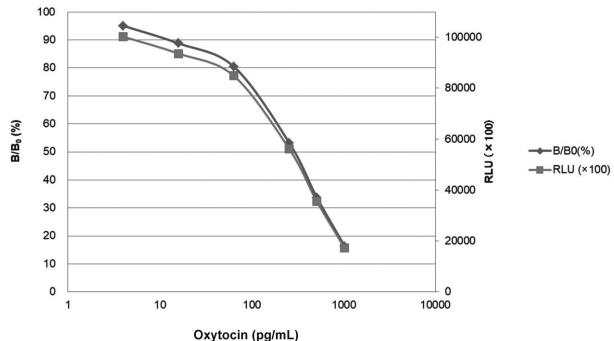
#### Examples

Oxytocin (pg/mL)	RLU	$B/B_0$ (%)
1024	17269	16.4%
512	35560	33.7%
256	56127	53.2%
64.0	84849	80.4%
16.0	93648	88.8%
4.00	100273	95.1%
0 ( $B_0$ )	105488	100%

	RLU	$B/B_0$ (%)	Measured (pg/mL)
Sample 1	53147	50.4%	283
Sample 2	79755	75.6%	85.9

$$B/B_0(\%) = (RLU \text{ of standard or sample}/RLU \text{ of } 0 \text{ pg/mL}(B_0)) \times 100$$

#### 【10. Standard curve】



#### 【11. Precautions】

1. This kit shall be used by an operator who has completed training for ELISA method or under appropriate supervision.
2. This kit shall be used by an operator who has a stably reproducible pipetting skill if the measurement is manually operated.
3. Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection.
4. Avoid skin contact with any reagent. In case where any reagent in this kit comes in contact with eyes, mouth, wound, or skin by mistake, provide emergency care, for instance, rinsing immediately with plenty of water, and seek medical advice if necessary.
5. Do not drink, eat, or smoke in a place where this kit is used.
6. Handle the sample with proper care, being aware that the sample may have an infection risk. This kit contains animal-derived ingredients.
7. Soak any used samples or consumables in a solution containing 1% formalin and 2% glutaraldehyde or  $\geq 0.1\%$  sodium hypochlorite solution for at least 1 hour, or autoclave them before disposition. Dispose used consumables and unused reagents in accordance with rules of the facility and regional regulations.

8. Do not use reagents with different lot numbers together. When allowing the plate to stand in each step, always affix a plate sealer to protect the wells from drying, contamination with foreign matters, uneven temperature, and evaporation of a dispensed reagent.
9. ELISA can be affected by assay environment. Ensure that room temperature at places for assay operation and incubation is strictly controlled at 20 to 25°C (on a bench or in an incubator). Avoid performing assay under air flow (including air flow from an air-conditioning equipment) or in a low-humidity environment.

## 【12. Assay Procedure Summary】

Be sure to read the instruction manual to check the sample conditions, measurement conditions, and measurement method before performing the measurement operation.

- Bring the plate and reagents to room temperature (20-25°C) about 2 hours before use.
- Dilution of Wash Solution (10×) : Dilute Wash Solution (10×) 10-folds with purified water.
- Dilution of the standard solution : prepare the standard solutions by mixing with the Buffer as shown in a table below.

Example	Concentration(pg/mL)	1024	512	256	64.0	16.0	4.00	0
	Standard(μL)	Original: 30	150*	150*	50*	50*	50*	-
	Buffer (μL)	2970	150	150	150	150	150	150

\*Standard solution at a 1-step higher concentration

- Preparation of biotin-conjugated oxytocin solution  
Reconstitute Biotin-conjugated Oxytocin with 100 μL of distilled water and completely dissolved. Dilute the solution 100-fold with Buffer.
- Do sample preparation (shown in 8. Sample preparation)
- Antibody-coated Plate**
- ↓ Washing 4 times (\*1)  
**Diluted biotin-conjugated oxytocin solution 50 μL/well**  
↓ Agitate (\*2)
- Standard solution or sample after preparation 50 μL/well**
- ↓ Agitate (\*2) and shake at room temperature (20-25°C) for 2 hours (500 rpm)
- Preparation of peroxidase-conjugated streptavidin solution (dilute 100-folds with Buffer)
- ↓ Washing 4 times (\*1)
- Peroxidase-conjugated streptavidin solution 100 μL/well**
- ↓ Agitate (\*2) and incubate at room temperature (20-25°C) for 30 minutes (\*3)
- Preparation of the luminescent reagent (mix Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 in 1 : 1 (vol./vol.)
- ↓ Washing 4 times (\*1)
- Luminescent reagent 100 μL/well**
- ↓ Agitate at room temperature (20-25°C) for 1 minute.
- Measurement of luminescence intensity (to be measured between 10 and 20 minutes)**

- (\*)1 In each washing operation, dispense the wash solution (1×) into wells, gently agitate the filled plate on the palm for about 10 seconds, and then empty the wells. After washing the wells 4 times consecutively, reverse the plate, and tap it against paper towel to remove the washing solution completely. After removal of the washing solution, immediately dispense the next solution with care not to dry the wells. Use of a pipet set at the liquid volume of 300 μL may be appropriate for dispensing the washing solution into each well.
- (\*)2 Three repeats of agitation at 600 to 800 rpm for 10 seconds may be appropriate.
- (\*)3 After agitation, cover with a plate sealer. Remove the liner from the plate sealer, and apply its adhesive side to the plate for affixation. Do not re-use any plate sealer.

**【Storage】** Store at 2-10°C

**【Expiration date】** Indicated on the label

**【Package】** For 96 assays

## FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

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

<b>FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation</b>	<b>FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH</b>
1600 Bellwood Road Richmond, VA 23237 U.S.A. Telephone : +1-804-271-7677 Facsimile : +1-804-271-7791 <a href="http://www.wakousa.com">http://www.wakousa.com</a>	Fuggerstrasse 12 D-41468 Neuss Germany Telephone : +49-2131-311-0 Facsimile : +49-2131-311100 <a href="http://www.wako-chemicals.de">http://www.wako-chemicals.de</a>

## オキシトシン ELISA キットワコー

### 【1. はじめに】

オキシトシンは幸せホルモンもしくは愛情ホルモンと言われる9アミノ酸からなるペプチドホルモンです。ストレス緩和、学習能力向上、抗不安、抗恐怖効果もあり、精神疾患（自閉症、うつ等）の治療効果も期待されています。

本品は検体中のオキシトシンを測定可能なELISAキットです。本キットは簡単な前処理で測定可能であり、従来、前処理法として行われていたC18カラムや有機溶媒を用いた精製が不要です。

### 【2. キット性能】

検量線範囲	4.00 ~ 1024pg/mL
測定対象	オキシトシン
測定対象検体	ヒト唾液、血清、血漿、尿 マウス血清、血漿 ラット血清、血漿
必要検体量	50 μL (n=1での最低必要量) 200 μL (n=2での測定推奨量) <sup>※1</sup>
測定時間	約 2.5 時間
検出法	発光系 <sup>※2</sup>

※ 1 前処理後のサンプルを添加するため、必要検体量としては200 μL準備することを推奨します。この量でn=2で測定可能です。

※ 2 測定には発光プレートリーダーが必要です。

### 【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 (8×12)/1枚
Oxytocin Standard/ オキシトシン標準品	調製後使用	100 μL/1本
Buffer/ 緩衝液	そのまま使用	60mL/1本
Biotin-conjugated Oxytocin/ ビオチン結合オキシトシン	凍結乾燥品・ 溶解後使用	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	希釈後使用	100 μL/1本
Luminescent Reagent 1/ 発光試薬 1	そのまま使用	6mL/1本
Luminescent Reagent 2/ 発光試薬 2	そのまま使用	6mL/1本
Wash Solution (10×)/ 洗浄液 (10×)	調製後使用	100mL/1本
Sample Buffer 1/ 検体前処理液 1	そのまま使用	5mL/1本
Sample Buffer 2/ 検体前処理液 2	そのまま使用	12mL/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

— 9/16 —

### 【4. 測定原理】

測定プレートの各ウエルには抗オキシトシン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とビオチン結合オキシトシン溶液を入れて反応させます。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、検体中のオキシトシン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（メスシリンドー・ビーカー）
- チップ交換型ピペット（使い捨てチップで10 μLを正確にピッティングできるもの、および200~500 μLを正確にピッティングできるもの）
- 連続分注ピペット、100 μL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）
- 搅拌器（Vortex タイプ）
- マイクロプレート振とう器（約 600 ~ 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
- 96 ウエルプレートリーダー（発光測定用）
- 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°C)に戻して下さい(2時間程度)。

#### 6-1. 標準溶液の調製

オキシトシン標準品原液 (102.4ng/mL) を室温化されたキット添付緩衝液で調製して下さい。下記は一例です。

濃度 (pg/mL)	標準溶液の容量	緩衝液
1024	標準品原液 : 30 μL	2970 μL
512	1024pg/mL 溶液 : 150 μL	150 μL
256	512pg/mL 溶液 : 150 μL	150 μL
64.0	256pg/mL 溶液 : 50 μL	150 μL
16.0	64.0pg/mL 溶液 : 50 μL	150 μL
4.00	16.0pg/mL 溶液 : 50 μL	150 μL
0 (B <sub>0</sub> )	—	150 μL

#### 6-2. ビオチン結合オキシトシン

精製水 100 μLを加えて溶解し、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. 発光試薬 1 および発光試薬 2

使用する30分前に、発光試薬1と発光試薬2を1:1(vol/vol)で混合して下さい。使用するまで遮光しておいて下さい。

例：発光試薬1 (6mL) : 発光試薬2 (6mL) の混合 (96 ウエル全て使用する場合)

— 10/16 —

#### 6-5. 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。有効期限内安定性を保ちます。

#### 7-2. オキシトシン標準品

2～10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。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。有効期限内安定性を保ちます。

#### 7-4. ビオチン結合オキシトシン

2～10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。溶解後は2～10℃で保存し、2週間以内に使用して下さい。緩衝液で100倍に希釈調製したビオチン結合オキシトシン溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

#### 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。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

#### 7-6. 発光試薬1および発光試薬2

キットを分割して使用する際は冷蔵庫より取り出し調製をして下さい。残りの発光試薬は室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

#### 7-7. 濃縮洗浄液 (10×)

濃縮洗浄液 (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。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

#### 7-8. 検体前処理液1、検体前処理液2

蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

### 【8. 検体調製方法】

- (1) 下記の表のように、検体に、室温化した検体前処理液1を添加し搅拌後5分静置します。その後再度搅拌しさらに5分静置します。
- (2) その後、室温化しゲルが均一になるように懸濁した検体前処理液2を添加し搅拌後5分静置します。その後再度搅拌しさらに5分静置します。
- (3) 搅拌後、遠心処理 (5000g～6000g、10分、4℃) を行い、上清を検体とします。上清採取時にはゲルを吸わないようにして下さい。

#### 検体調製方法

検体	尿検体			唾液／血清／血漿検体		
検体量	50 μL	100 μL	200 μL	50 μL	100 μL	200 μL
検体前処理液1	5 μL	10 μL	20 μL	5 μL	10 μL	20 μL
検体前処理液2	27.5 μL	55 μL	110 μL	27.5 μL	75 μL	150 μL
希釈率	1.375			1.475		

- 検体採取時に、100KIU/mL アプロチニン、1/750量 (v/v) Proclin950の添加をお薦めします。
- 検体を保管する場合は、検体に100KIU/mL アプロチニン、1/750量 (v/v) Proclin950を添加後、-80℃以下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。凍結した検体は測定する直前に解凍し充分に搅拌して下さい。また、検体を希釈する場合は用時調製として下さい。
- 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) 等を用いて生理食塩水もしくはキット添付のBufferで希釈し、上記調製処理後測定ウェルに分注して下さい。
- 検出限界以下の検体には、下記濃縮方法をお試しください。ただし、必要検体量が増えますのでご注意ください。  
なお、ヒト唾液検体、ヒト血清検体およびヒト尿検体では3倍まで濃縮できることを確認しています。

#### [参考]

##### 検体の濃縮方法

###### 濃縮プロトコール例 (3倍濃縮、二重測定)

- (1) 検体を各300 μL (通常の二重測定に必要な検体量の3倍) 採取する。
- (2) 検体前処理液1を30 μL 添加し、搅拌後5分静置する。その後、搅拌しさらに5分静置する。
- (3) 検体前処理液2を225 μL (唾液／血清検体の場合)/165 μL (尿検体の場合) 添加し、搅拌後5分静置する。その後、搅拌しさらに5分静置する。
- (4) 搅拌後、遠心処理 (5000g～6000g、10分、4℃) を行い、上清を360 μL 分取る。
- (5) 分取した上清を以下条件にて濃縮、乾固する。  
使用機器：miVac Duo LV (Cat No. DPP-10000-G00, SP SCIENTIFIC社)  
濃縮条件：30℃、3時間  
※乾固した検体は4℃で保管。
- (6) 乾固検体にキット添付緩衝液を120 μL 添加する。(液量比で3倍濃縮)

### 【9. 測定操作】

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。

- (1) 抗体固相化プレートを、あらかじめ調製した洗浄液にて各ウエルに満たし、4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) 各ウエルに希釈調製したビオチン結合オキシトシン溶液を50 μL ずつ分注します。

- (3) マイクロプレート振とう器を用いて攪拌します。
- (4) 標準品測定ウエルに各濃度の標準溶液を  $50\mu\text{L}$  ずつ分注します。
- (5) 検体測定ウエルに調製した検体を  $50\mu\text{L}$  ずつ分注します。
- (6) マイクロプレート振とう器を用いて攪拌します。
- (7) プレートシールを貼り、室温 ( $20\sim25^\circ\text{C}$ ) でマイクロプレート振とう器を用いて 2 時間攪拌 (500rpm) します。
- (8) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし、4 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。
- (9) 各ウェルに調製したペルオキシダーゼ結合ストレプトアビン溶液を  $100\mu\text{L}$  ずつ分注します。
- (10) マイクロプレート振とう器を用いて攪拌します。
- (11) プレートシールを貼り、室温 ( $20\sim25^\circ\text{C}$ ) で 30 分間静置します。
- (12) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし 4 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。
- (13) 各ウェルに調製した発光試薬を  $100\mu\text{L}$  ずつ分注します。
- (14) マイクロプレート振とう器を用いて 1 分間攪拌します。
- (15) 攪拌後、プレートリーダー（発光測定用）で発光強度を測定します。発光試薬を分注後 10~20 分の間で測定を行って下さい。

**[計算]**

X 軸を標準溶液濃度 (pg/mL)、Y 軸を  $B/B_0$  (%) の標準曲線を作成します。希釈検体の  $B/B_0$  (%) に対応する濃度 (pg/mL) を読み取ります。読み取った濃度に検体希釈率をかけて測定値とします。

発光強度はプレートリーダーのメーカー及びモデルにより異なります。

\*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薦め致します。

\*本キットのオキシトシン濃度は、WHO 世界標準品 (OXYTOCIN 4th International Standard NIBSC code : 76/575) を用いて、値付けを行っております。

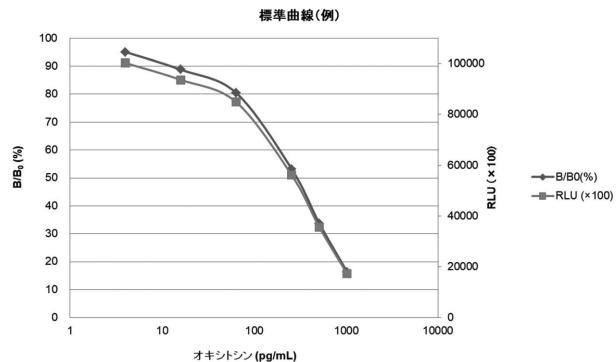
**計算例**

オキシトシン濃度 (pg/mL)	RLU	$B/B_0$ (%)
1024	17269	16.4%
512	35560	33.7%
256	56127	53.2%
64.0	84849	80.4%
16.0	93648	88.8%
4.00	100273	95.1%
0 ( $B_0$ )	105488	100%

	RLU	$B/B_0$ (%)	測定値 (pg/mL)
検体 1	53147	50.4%	283
検体 2	79755	75.6%	85.9

$$B/B_0(\%) = (\text{各標準溶液または検体の発光強度(RLU)}/0\text{濃度標準品}(B_0)\text{の発光強度(RLU)}) \times 100$$

**[10. 標準曲線例]**



**[11. 使用上の注意]**

- 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。
- 用手法操作で測定する際にはピ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充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。
- 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% グルター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。
- 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。
- 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 :  $20\sim25^\circ\text{C}$  (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。

**[12. 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。
- プレート、試薬類を充分に室温 ( $20\sim25^\circ\text{C}$ ) に戻して下さい (約 2 時間)。
- 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）：オキシトシン標準品原液（102.4ng/mL）を室温化されたキット添付緩衝液で調製して下さい。下記は一例です。

濃度(pg/mL)	1024	512	256	64.0	16.0	4.00	0
標準溶液(μL)	原液:30	150*	150*	150*	150*	150*	150
緩衝液(μL)	2970	150	150	150	150	150	150

\*:ひとつ高濃度の標準溶液

\* ビオチン結合オキシトシン溶液の調製：精製水でビオチン結合オキシトシンを完全に溶解し、室温化した緩衝液で100倍に希釈して下さい。

\* 8. 検体調製方法に従って、検体を調製して下さい。

**抗体固相化プレート**

↓洗浄4回 (\*①)

**希釈調製したビオチン結合オキシトシン溶液 50 μL/ ウエル  
↓攪拌**

**各標準溶液または調製した検体 50 μL/ ウエル**

↓攪拌 (\*②)、室温(20～25℃)、マイクロプレート振とう器で2時間、攪拌(500rpm)

\*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倍希釈して下さい）

↓洗浄4回 (\*①)

**調製したペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液 100 μL/ ウエル**

↓攪拌 (\*②)、室温(20～25℃)、30分反応、静置 (\*③)

\*発光試薬の調製（発光試薬1：発光試薬2=1:1(vol./vol.)に混和調製）

↓洗浄4回 (\*①)

**発光試薬 100 μL/ ウエル**

↓1分間攪拌 室温(20～25℃)

**発光強度測定(10分～20分の間に測定)**

(\*①) 洗浄毎に洗浄液をウエルに分注後、手のひらの上で10秒ほど軽く振り廃棄します。4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。洗浄液除去後はウエ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/ ウエルです。

(\*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 製】** 96回用

**【お知らせ】**

本品は試験研究用として販売しております。日本国内で本品を用いた受託解析等の営利活動を行う場合には株式会社エアープランツ・バイオ(〒141-0001 東京都品川区北品川5-18-18)の許諾が必要となります。

○本件に関する問合せ先  
富士フィルム和光純薬株式会社  
〒540-8605 大阪府大阪市中央区道修町3-1-2

**製造発売元**

**富士フィルム 和光純薬株式会社**

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel: 06-6203-3741