

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書に従って測定を実施してください。なお、操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント（動画）]、並びに[Q&A]をご参照ください。また、本キットを初めてご使用になられる場合は後述の「◆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」をご確認の上ご使用ください。

『 レビス® インスリン-ヒト（発光系） 』 取扱説明書

1. イントロダクション

インスリンは膵臓のランゲルハンス島（膵島）の β 細胞から分泌されるホルモンで、分子量は約 5800、等電点 5.4 付近の蛋白質です。A6-A11、A7-B7、A20-B-19 で S-S 結合を形成し、酸性或いは Zn の存在しない中性水溶液では 2 量体を形成しますが、中性で Zn 存在下では Zn 2 個を含む 6 量体を形成します。

肝、筋肉、脂肪組織が主要な標的組織ですが、それぞれに次のような作用を示します。

肝：グリコーゲン合成促進、蛋白合成促進、脂肪酸合成促進、糖利用の促進、糖新生抑制。

筋肉：糖、アミノ酸、K の細胞膜透過性増大、グリコーゲン合成促進、蛋白合成促進、蛋白分解抑制。

脂肪組織：グルコースの細胞膜透過性増大、脂肪酸合成促進。

インスリンは細胞内で 1 本鎖のプロインスリンの形で合成された後、S-S 結合が形成され、酵素分解による活性化がおこって C-ペプチドとインスリンが分離します。

*WHO はヒトインスリンの 1st International Standard、1986 として 26 IU/mg (0.038 mg/IU) の精製品を提供しています。同時にウシインスリンについて 1st International Standard、1986、25.7 IU/mg、ブタインスリン 1st International Standard、1986、26 IU/mg を提供するようになりました。ヒトの場合、治療用に用いられますので、それに合わせてヒトの臨床検査での測定値も IU で表現する方が便利ですが、動物では重量で扱った方が良いでしょう。

上記のように精製インスリンはヒトで 26 IU/mg、ウシで 25.7 IU/mg、ブタで 26 IU/mg となっていますので、大体種を問わず 26 IU/mg 程度であると考えても良いでしょう。

本キットはヒトインスリ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。本キットは体外診断用に用いることはできません。研究のみにご使用ください。

◆製品の特長

- 全反応時間は約 2 時間です。
- ヒト血清または血漿（EDTA またはヘパリン血漿を推奨します）、培養上清、細胞抽出液中のインスリンを測定します。
- 微量な検体（標準操作法は 5 μ L）で測定可能です。
- 1 キットは 96 ウェルです。
- 全ての試薬は溶液タイプです。

2. 測定原理

本キットはペルオキシダーゼ結合抗インスリン抗体、標準品、検体を抗インスリンモノクローナル抗体固相化マイクロプレートウェル中で 2 時間インキュベートします。ウェル中のペルオキシダーゼ活性を測定することにより、検体中のヒトインスリンの濃度を求めることができます。発光強度(RLU)はインスリン濃度にほぼ比例します。標準品濃度に対して発光強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. キットの保存と使用期限

キットは 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C で保存してください（凍結厳禁）。この保存条件下でキットは外箱のラベルに記載された有効期限内安定です。有効期限の過ぎた試薬は使用しないでください。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。

4. 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 5 μ L を正確にピペッティングできるもの、及び 50 μ L ~ 100 μ L、100 μ L ~ 1000 μ L 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）、50 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（500 rpm ~ 1200 rpm） □96 ウェルプレート用洗浄機（あれば好ましい）または噴射ビン □96 ウェルプレートリーダー（発光測定用）
- データ計算用ソフトウェア

5. 構成成品

構 成 品	状 態	容 量
(A) Anti-Insulin antibody coated plate 抗体固相化 96 ウェルプレート	洗浄後使用	96 wells(8×12)/1 枚
(B) Standard human insulin solution (200 ng/mL) 標準ヒトインスリン溶液(200 ng/mL)	希釈後使用	50 µL/1 本
(C) Buffer solution 緩衝液	そのまま使用	60 mL/1 本
(D) HRP-conjugated anti-insulin antibody ペルオキシダーゼ結合抗インスリン抗体	希釈後使用	100 µL/1 本
(E) Luminescent Reagent 1 発光試薬 1	(E)と(F)を 1 : 1 に 等量混合後使用	6 mL/1 本
(F) Luminescent Reagent 2 発光試薬 2		6 mL/1 本
(I) Wash stock solution (10×) 濃縮洗浄液(10×)	希釈後使用	100 mL/1 本
プレートシール		1 枚
取扱説明書		1 部

6. 試薬の調製

- * キットの試薬は使用前に必ず室温(20 °C~25 °C)に戻してください (2 時間位が目安です)。
- * 5. 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ください。
- * 測定に必要な分だけ試薬を調製してください (ご不明な際にはお問い合わせください)。

【濃縮された試薬類】

【(B) Standard human insulin solution (200 ng/mL)】; 標準曲線作成用

(B) Standard human insulin solution (200 ng/mL) (原液) と (C) Buffer solution を使って標準溶液を調製してください。下記は一例です。※µIU/mL 換算は 26 IU/mg で行っております (イントロダクション参照)

標準溶液の容量	(C) Buffer solution	濃度(ng/mL)	濃度(µIU/mL※)
標準溶液原液 10 µL	90 µL	20.0	520.0
20.0 ng/mL 溶液 50 µL	125 µL	5.71	148.6
5.71 ng/mL 溶液 50 µL	125 µL	1.63	42.45
1.63 ng/mL 溶液 50 µL	125 µL	0.466	12.13
0.466 ng/mL 溶液 50 µL	125 µL	0.133	3.465
0.133 ng/mL 溶液 50 µL	125 µL	0.0381	0.9901
0(Blank)	125 µL	0	0

【(D) HRP-conjugated anti-insulin antibody】

100 µL を充分分取できる量をご提供しています。濃縮液を (C) Buffer solution で **100 倍** に希釈してください。

【(E) Luminescent Reagent 1】 及び 【(F) Luminescent Reagent 2】

使用する 15 分~30 分前に、(E) Luminescent Reagent 1 及び (F) Luminescent Reagent 2 を **1:1(vol.:vol.)** で混合してください。使用するまで遮光しておいてください。使用残りの混合液は廃棄してください。

【(I) Wash stock solution (10×)】

濃縮洗浄液(10×)を室温化された精製水 (蒸留水) で **10 倍** に希釈してください。

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

【試薬の安定性と保存方法】

(A) Anti-Insulin coated plate

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バックに戻し、そのまま 2 °C~8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(B) Standard human insulin solution (200 ng/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 °C~8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないでください。

(C) Buffer solution 及び (E) Luminescent Reagent 1、(F) Luminescent Reagent 2

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℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(D) HRP-conjugated anti-insulin antibody

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℃～8℃で保存してください。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ください。

(I) Wash stock solution (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℃～8℃で保存してください。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ください。

7. 検体の調製

本キットはヒト血清または血漿 (EDTA またはヘパリン血漿を推奨します)、培養上清、細胞抽出液中のインスリンを測定します。

- 検体は定法に従い採血、分離したヒト血清または血漿を使用してください。
- 血清分離促進剤等を使用する際は事前にその影響を確認してください。
- 検体は採取後すぐに測定するか、-35℃以下で凍結保存してください。凍結した検体は測定する直前に解凍し十分に攪拌してください。繰り返しの凍結融解は避けてください。正しい結果が得られない原因になります。
- 溶血した検体や高脂質検体は使わないでください。
※ 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ください。
- 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ください。
- 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ください。
- 検体を希釈する場合は、あらかじめ試験管 (PP、PE) 等を用いて緩衝液で希釈し測定ウェルに分注してください。検体希釈は用時調製してください。

【検体の安定性と保存方法】

インスリン分解酵素等のプロテアーゼの働きを抑えるため、採血時に最終濃度が100 KIU/mL～500 KIU/mLのアプロチニンを添加して保管することをお勧めします。また、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ください。(KIU: kallikrein inhibitor unit)

8. 測定操作法

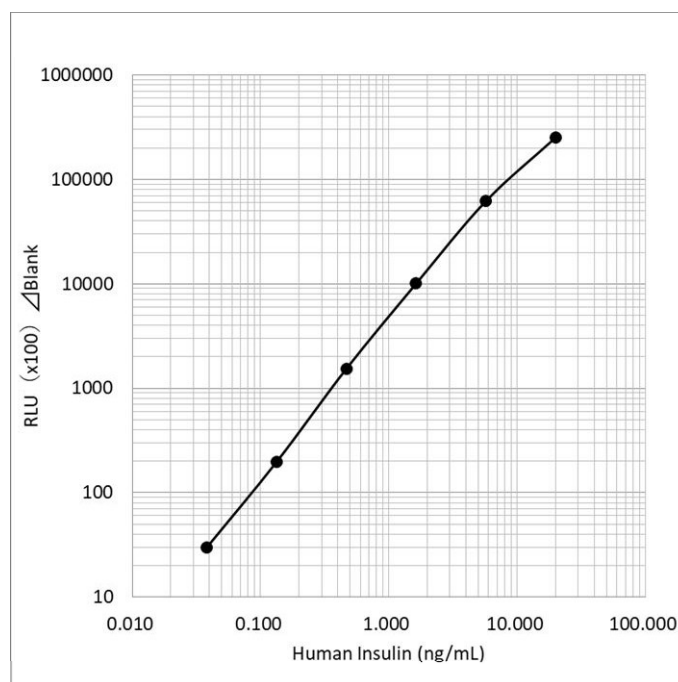
洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意してください。

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ください。

- (1) あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし4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) 各ウェルにペルオキシダーゼ結合抗インスリン抗体を50 µL 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。
 - (3) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を5 µL 分注します。
 - (4) 検体測定ウェルに検体を5 µL ずつ分注します。
 - (5) マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
 - (6) プレートシールを貼り、室温(20℃～25℃)で2時間静置(*③)します。
 - (7) 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(*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。
 - (8) 各ウェルに混合した発光試薬を50 µL 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1分間攪拌(*②)します。
 - (9) 攪拌後マイクロプレート用プレートリーダー (発光測定用) で発光強度を測定します。
発光試薬添加後、10分～20分の間で測定することを推奨します。
- (*①)、(*②)、(*③)測定手順概要 (5、6 ページ) をご参照ください。

9. 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 軸を発光強度の標準曲線グラフを作成してください。標準曲線は弊社 Web サイト「技術情報」「ELISA の標準曲線」をご参照ください。
- (2) 標準曲線より、検体の発光強度に対応する濃度 (ng/mL) を読み取ります。
* 検体の発光強度が標準曲線発光強度より外れた場合は (C) Buffer solution にて適当倍率に調製し再度測定を実施してください。
* 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。



グラフは標準曲線例です（発光強度は、測定環境により変動します）。

*プレートリーダーは Infinite f200 (TECAN)を使用

10.キットの性能

●測定範囲

ヒトインスリンを 0.0381 ng/mL～20 ng/mL の範囲で測定できます。

※本キットによって得られた測定値は、下記計算式に従って NIBSC/WHO International Standard Insulin, Human (code: 83/500) (4th)を基準にしたユニット濃度に換算することができます。

1 IU=0.03846 mg, 26.0 IU/mg

NIBSC/WHO (code: 83/500)ユニット濃度(μIU/mL)=26×本キット測定値 (ng/mL)

●精度試験（アッセイ内変動）

正常血清に異なる濃度のインスリンを添加した 3 検体を 5 重測定

n / ID	Sample1 (ng/mL)	Sample2 (ng/mL)	Sample3 (ng/mL)
1	5.84	0.980	0.207
2	5.92	0.943	0.210
3	5.79	0.962	0.207
4	5.91	0.940	0.201
5	5.74	0.973	0.201
mean	5.84	0.960	0.205
SD	0.078	0.018	0.004
CV(%)	1.3	1.9	2.0

平均 C.V.値は 15 %未満

●再現性試験（アッセイ間変動）

正常血清に異なる濃度のインスリンを添加した 3 検体を 4 日間 3 重測定

Day /ID	Sample1 (ng/mL)	Sample2 (ng/mL)	Sample3 (ng/mL)
0 日目	5.52	0.472	0.742
1 日目	5.72	0.469	0.723
2 日目	5.55	0.467	0.785
3 日目	5.55	0.440	0.772
mean	5.58	0.462	0.756
SD	0.090	0.015	0.028
CV(%)	1.6	3.2	3.7

平均 C.V.値は 15 %未満

●添加回収試験(正常血清または血漿検体に異なる 6 濃度のインスリンを添加し測定)回収率は 91.4 %～103 %

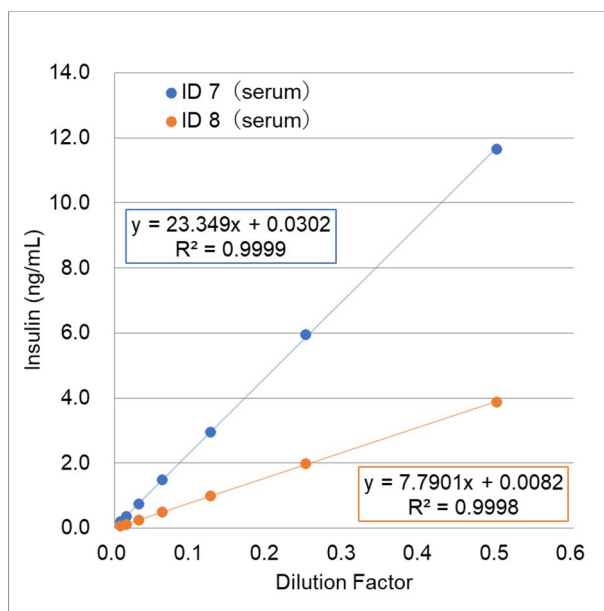
血清検体

添加量 (ng/mL)	実測値 (ng/mL)	回収量 (ng/mL)	回収率 (%)
–	0.409	–	–
0.143	0.548	0.139	97.2
0.358	0.746	0.337	94.1
0.896	1.24	0.830	92.6
2.24	2.57	2.16	96.0
5.60	5.64	5.23	93.4
14.0	13.7	13.3	95.0

血漿検体(EDTA)

添加量 (ng/mL)	実測値 (ng/mL)	回収量 (ng/mL)	回収率 (%)
–	0.484	–	–
0.143	0.632	0.148	103
0.358	0.834	0.350	97.8
0.896	1.33	0.843	94.1
2.24	2.62	2.13	95.1
5.60	5.87	5.39	96.3
14.0	13.3	12.8	91.4

- 希釈直線性(正常血清または血漿に異なる濃度のインスリンを添加した2検体を連続的に緩衝液で6段階希釈し測定)



11.トラブルシューティングと Q&A

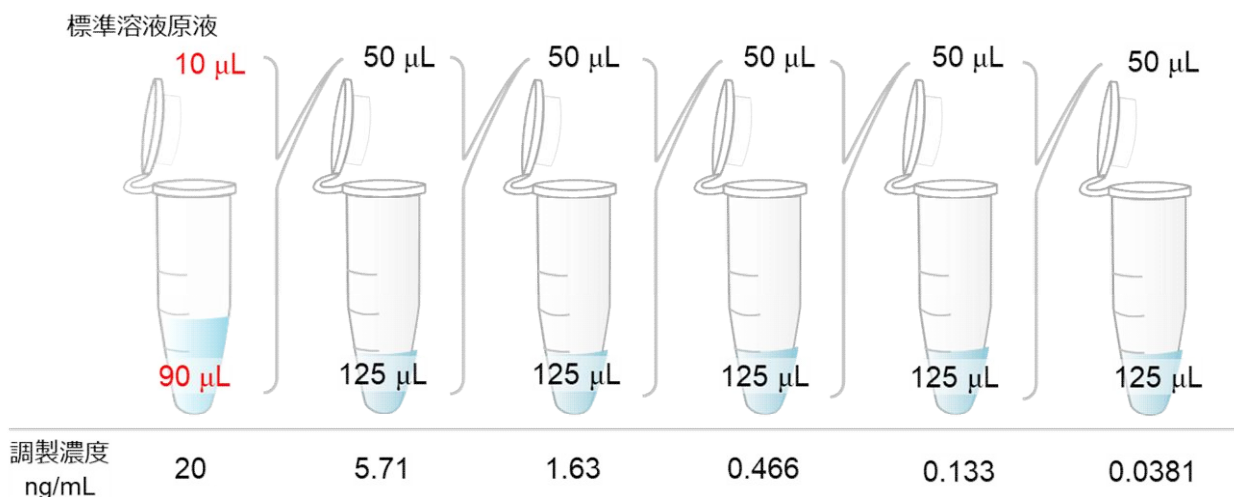
- すべてのウェルでの反応が弱い
原因として考えられること
1)標準品や検体の入れ忘れ。
2)発光に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
3)発光に関連する試薬溶液の取り違いや希釈調製不良。
4)ペルオキシダーゼ酵素阻害剤の混入。
5)キット保管温度の影響（凍結した場合）。
6)プレートの過剰な洗浄。
7)発光試液の温度が低かった。
- 最小標準溶液濃度(0.0381 ng/mL)の発光強度(RLU)よりブランク RLU 値が高くなる
原因として考えられること
・・・洗浄が不適当、不完全であった。(ペルオキシダーゼ結合抗インスリン抗体/検体と反応後の洗浄回数4回を同じ流速で5回~6回に増やしてください。)
- 変動係数(C.V.)が大きい
原因として考えられること
1)洗浄が不適当、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ください)。
3)ピペ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ください。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ください。
- 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。
- Q-3: 検体を融かしたらモヤモヤした不溶解物がありましたが測定に影響がありますか?
A-3: 影響が出る可能性があります。測定値が低く出たり、測定下限以下になる場合があります。
- Q-4: 血漿でも測定できますか?
A-4: 血漿でも測定できます。血漿採血時の抗凝固剤には、EDTA (またはヘパリン) を使用してください。
- 更に詳しいトラブルシューティングや Q&A は弊社ホームページをご覧ください。

【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ください。

操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント (動画)] 並びに「Q&A」をご参照ください。

- ☐ ウェルプレート、試薬類を十分に室温(20℃～25℃)に戻してください。室温化には2時間位必要
- ☐ 濃縮洗浄液の希釈：室温化された精製水で、**10倍**に希釈してください。
- ☐ 標準溶液の希釈 (例)：室温化された緩衝液で、希釈してください。



- ☐ ペルオキシダーゼ結合抗インスリン抗体の希釈
室温化された緩衝液で **100倍**に希釈してください。

各操作注意事項並びに関連情報

☐ 抗体固相化 96 ウェルプレート		
☐ ↓洗浄 4 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インスリン抗体	50 µL	* ④
☐ ↓攪拌		* ②
☐ 検体 または 標準ヒトインスリン溶液	5 µL	* ④
☐ ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、2時間反応、静置		* ②、* ③
☐ 室温化した(E)発光試薬 1 及び (F) 発光試薬 2 を 1 : 1(vol.:vol.)で混合してください。	使用する 15 分～30 分前に混ぜておいてください。	
☐ ↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに発光試薬を分注)		* ①
☐ 発光試薬	50 µL	
☐ ↓攪拌 1 分間		* ②
☐ 発光強度測定 10 分～20 分の間で測定することを推奨します。		

(* 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。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(0.0381 ng/mL)の RLU 値よりブランク RLU 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抗インスリン抗体/検体と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5 回～6 回に増やしてください。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5 mL/分～25 mL/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ください。「洗浄操作」の動画をご参照ください。

(* ②) 攪拌の目安は 500 rpm～1200 rpm-10 秒間、3 回。「攪拌操作」の動画をご参照ください。

(* ③) 攪拌終了後プレートシールを貼り静置してください。「反応条件」の動画をご参照ください。

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ください。一度使用したプレートシールは再使用しないでください。

(*④)ピペッティングに関する注意事項は「ピペッティング」の動画をご参照ください。

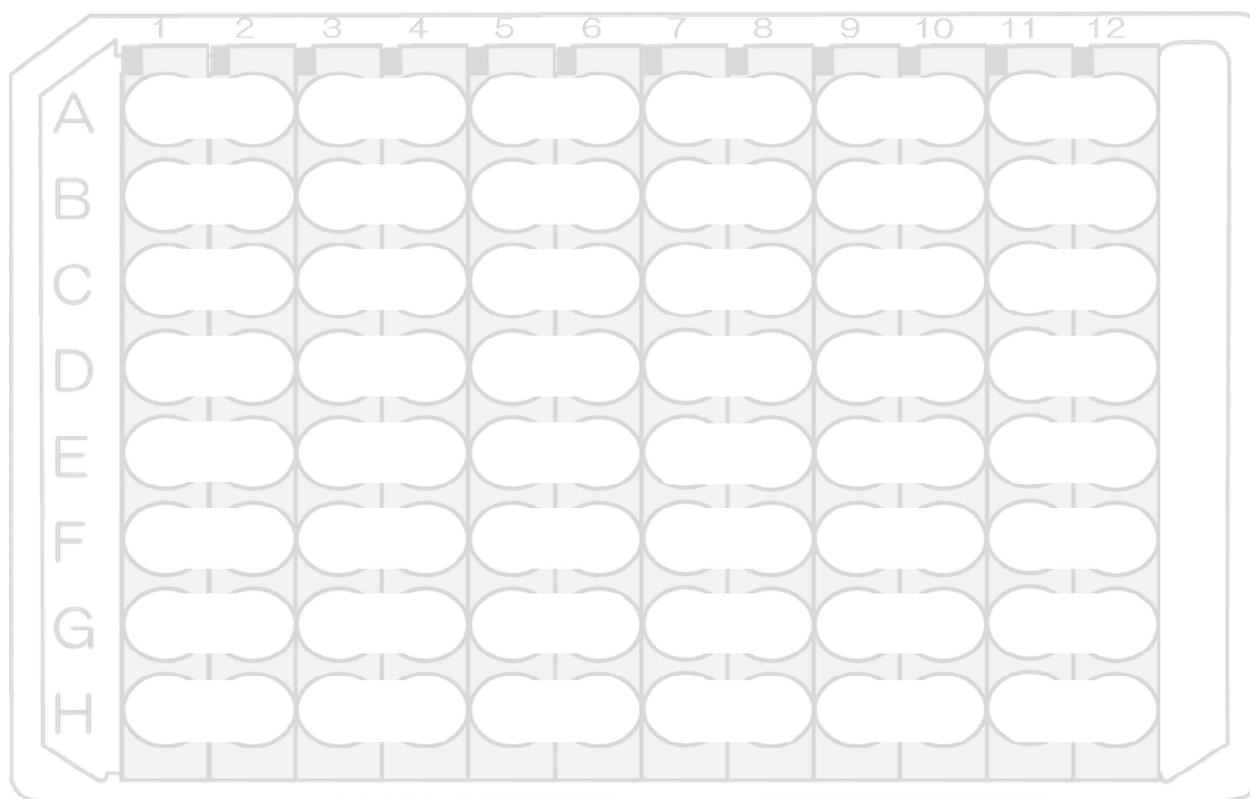
ワークシート (例)

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	20 ng/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
B	5.71 ng/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
C	1.63 ng/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
D	0.466 ng/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
E	0.133 ng/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
F	0.0381 ng/mL	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
G	0(Blank)	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40
H	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33	検体 41

◆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）を厳守してください。また、風速（エアコンの風も含む）：0.4 m/sec 以上、湿度 30 %未満の環境下での測定は避けてください。やむを得ず、測定操作を風速：0.4 m/sec 以上、湿度 30 %未満の環境下で実施する場合には、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ください。
- 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、詳細を弊社 Web サイトの動画「反応条件」でご確認ください。
- 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ください。
- 検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけてください。1 ウェル／1 チップのご使用をお勧めします。
- 発光試薬 1, 2 および混合液は 96 ウェルプレートに使用するまでは光を避けて保存してください。
- 本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の方でご使用ください。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ください。
- 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ください。
- 試薬類を皮膚に付けないでください。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ください。
- 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ください。
- 試薬類は口でピペッティングしないでください。
- ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないでください。
- 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ください。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定法に従い滅菌処理して廃棄してください。処理した検体、使用した消耗品や試薬溶液、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ください。

LBIS Human Insulin ELISA Kit (Luminescent type) (AKH-INSL)



【測定名】

【所属】

【測定者】

【測定日】

【ロット番号】

【有効期限】

【備考】

【製品名】 レビス® インスリン-ヒト（発光系）

【シバヤギコード】 AKH-INSL 【和光コード】 634-52911

【英語表記】 LBIS Human Insulin ELISA Kit (Luminescent type)
(AKH-INSL, FUJIFILM Wako Shibayagi, Gunma, Japan)

【お問い合わせ先】

製造

富士フイルムワコーシバヤギ株式会社

〒377-0007 群馬県渋川市石原 1062-1 TEL.0279-25-0279 FAX.0279-23-0313

<E-mail>wksb-info@fujifilm.com <URL>http://www.shibayagi.co.jp

販売

富士フイルム 和光純薬株式会社

[LBIS Human Insulin ELISA Kit (Luminescent type)]

Cat # 634-52911 (Manufacture # AKH-INSL)

Please, read this instruction carefully before use.

This kit is manufactured by FUJIFILM Wako Shibayagi Corporation. Use only the current version of Instruction Manual enclosed with the kit! For the detailed assay procedure, refer to [Key points for ELISA by movie] on our website.

1. Intended use

LBIS Human Insulin ELISA Kit (Luminescent type) is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of human insulin. This is intended for research use only. Not for use in diagnostics procedure.

2. Storage and expiration

When the complete kit is stored at 2 °C -8 °C (Do not freeze), the kit is stable until the expiration date shown on the label on the container. Opened reagents should be used as soon as possible to avoid less than optimal assay performance caused by storage environment.

3. Introduction

Insulin is a peptide hormone secreted from B cells of islet of Langerhans in the pancreas with a molecular weight of about 5800 and pI 5.4. It is consisted of 2 chains, A and B. It has 3 disulfide bonds formed between A6 and A11, A7 and B7, and A20 and B19. Insulin exists as a dimer molecule in acidic to neutral solution without Zn ion, and as a hexamer including two Zn ions in neutral solution if Zn ions are present. Main targets of insulin are liver, muscle, and adipose tissue. Insulin actions in these targets are as follows. In the liver, it promotes glycogenesis, protein synthesis, fatty acid synthesis, carbohydrate utilization, and inhibition of gluconeogenesis. In the muscle, it promotes membrane permeability for carbohydrates, amino acids and K ion, glycogenesis, protein synthesis, while inhibits protein degradation. In the adipose tissue, it promotes membrane permeability for glucose and fatty acid synthesis.

A precursor of insulin, called proinsulin with a single polypeptide chain, is first synthesized in the cell, then sulfide bonds are formed, and finally by enzymatic cutting at two sites, active insulin and c-peptide (connecting peptide) are formed. Potency of an insulin preparation was originally determined by bioassay. However, whole body bioassay inevitably shows poor precision owing to individual variation.

WHO issued 1st International Standard for human insulin in 1986 which has the potency of 26 IU/mg (0.038 mg/IU). In the same year, 1st International Standard of bovine insulin, the potency of which is 25.7 IU/mg, and Porcine insulin 1st International Standard, 26 IU/mg, were provided. Before these standards, in 1974, 1st International Reference Preparation of human insulin for immunoassay was provided as 3 IU/ampoule. Based on the above data, if the biological activity of insulin per molecule is the same among various animal species, potencies of animal insulin might be calculated from their molecular weights. But, so far, we do not have experimental proof about this. As the molecular weights of insulin of various animals are nearly the same, and the differences are within 1 %, there may be no critical fault if we think that the general potency of insulin is 26 IU/mg. Rat and mouse have two molecular species of insulin, type 1 and type 2. Amino acid sequences of these molecular species are same between rat and mouse. But as their ratios are different between these two animal species, it is recommended to use standard preparation derived from each animals.

4. Assay principle

In Shibayagi's LBIS Human Insulin ELISA Kit (Luminescent type), HRP-conjugated anti-insulin antibody, and standard or sample are incubated in monoclonal anti-insulin-coated wells to capture insulin bound with HRP-conjugated anti-insulin antibody. After 2 hours' incubation and washing, HRP remaining in wells are reacted with a luminescent reagent. Finally, peroxidase activity in each well is measured to determine insulin in the sample. The Relative Light Units (RLU) is proportional to insulin concentration. The standard curve is prepared by plotting RLU against standard insulin concentrations. Insulin concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

5. Precautions

- For professional use only, beginners are advised to use this kit under the guidance of experienced person. In manual operation, proficiency in pipetting technique is recommended.
- Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection.
- Avoid contact of skin and mucous membranes with kit reagents or specimens. If any reagents come in

LBIS Human Insulin ELISA Kit (Luminescent type) (AKH-INSL)

contact with eyes, skin, or mucous membranes, wash with copious amounts of water and contact a physician.

- Do not drink, eat, or smoke in a place where this kit is used.
- Handle the sample with proper care, being aware that the sample may have an infection risk. This kit contains animal-derived ingredients.
- Do not use reagents with different lot numbers together.
- It is recommended to store the sample frozen at -35 °C or lower if long-term storage is intended. Avoid repeated freezing and thawing. Thaw the frozen sample just before assay and thoroughly agitate. Prepare the sample before use.
- Do not use a sample with hemolysis or containing high lipid.
- Centrifuge the sample to remove turbidity or insoluble matters where necessary before use for the assay.
- 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 Diluent Buffer.
- 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.
- 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.
- The materials must not be pipetted by mouth.
- Residual samples and used tips should be sterilized before disposal.
- Dispose consumable materials and unused contents in accordance with applicable regional/national regulatory requirements.

6. Reagents supplied

Components	State	Amount
(A) Anti-Insulin antibody coated plate	Use after washing	96 wells/1 plate
(B) Standard human insulin solution (200 ng/mL)	Concentrated. Use after dilution	50 µL/1 vial
(C) Buffer solution	Ready to use.	60 mL/1 bottle
(D) HRP-conjugated anti-insulin antibody	Concentrated. Use after dilution.	100 µL/1 vial
(E) Luminescent Reagent 1	Mix (E) Luminescent Reagent 1 and (F) Luminescent Reagent 2 in 1 : 1 (vol./vol.)	6 mL/1 bottle
(F) Luminescent Reagent 2		6 mL/1 bottle
(I) Wash stock solution (10×)	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle
Plate seal	—	1 sheet
Instruction Manual	—	1 copy

(D) HRP-conjugated anti-insulin antibody: Vials contain more than volumes shown in the list. You can easily take out 100 µL, respectively, from vials.

7. 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 stock solution (10×) (a graduated cylinder, a bottle). ☐ Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 5 µL precisely, and another for 50 µL-100 µL, 100 µL -1000 µL.
- ☐ Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipette 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 (500-1200 rpm). ☐ An automatic washer for 96 well-plate (if available), or a wash bottle with a jet nozzle. ☐ A 96 well-plate reader for luminescence detection ☐ Software for data analysis.

8. Preparation of reagents

- ◆ Bring the reagents to room temperature (20 °C -25 °C) about 2 hours prior to use.
- ◆ Reagents described as “Use after dilution” in **【6. Reagent supplied】** shall be prepared as follows.
- ◆ Prepare reagent solutions in appropriate volume for your assay. Do not store the diluted reagents.

【Concentrated reagents】

[(B) Standard human insulin solution (200 ng/mL)]

Make a serial dilution of master standard (200 ng/mL) solution to prepare each standard solution (0.0381-20 ng/mL). * Unit reduction for µIU/mL is 26 IU/mg. (Refer to 3. Introduction.)

Volume of standard solution	Buffer solution	Concentration (ng/mL)	Concentration (μ IU/mL)*
Original solution: 10 μ L	90 μ L	20.0	520.0
20.0 ng/mL solution: 50 μ L	125 μ L	5.71	148.6
5.71 ng/mL solution: 50 μ L	125 μ L	1.63	42.45
1.63 ng/mL solution: 50 μ L	125 μ L	0.466	12.13
0.466 ng/mL solution: 50 μ L	125 μ L	0.133	3.465
0.133 ng/mL solution: 50 μ L	125 μ L	0.0381	0.9901
0 (Blank)	125 μ L	0	0

[(D)HRP-conjugated anti-insulin antibody]

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

6 mL of the diluted solution is enough for 96 wells.

[(E) Luminescent Reagent 1]&[(F) Luminescent Reagent 2]

Mix Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 in **1 : 1 (vol./vol.)** and incubate for 15-30 minutes before use. **Keep in the dark.** Dispose any unused mixed luminescent reagent.

6 mL of the diluted solution is enough for 96 wells.

[(I) Wash stock solution (10 $\times$)]

Dilute 1 volume of the concentrated Wash stock solution (10 $\times$) to 10 volume with deionized water (or distilled water) to prepare working solution. Example: 100 mL of concentrated washing buffer (10 $\times$) and 900 mL of deionized water (or distilled water).

【Storage and stability】

[(A)Anti-Insulin 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 -8 °C. The strip will be stable until expiration date.

[(B) Standard human insulin solution (200 ng/mL)]

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

[(C)Buffer solution]

If not opened, store at 2 °C -8 °C. It maintains stability until expiration date. Once opened, we recommend using as soon as possible to avoid influence by environmental condition.

[(D)HRP-conjugated anti-insulin antibody]

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 °C,-8 °C. It is stable until the expiration date. Unused working solution (already diluted) should be disposed.

[(E) Luminescent reagent 1, (F) 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 °C,-8 °C. It is stable until the expiration date. Discard the remaining mixed luminescent reagent.

[(I) Wash stock solution (10 $\times$)]

The rest of undiluted buffer: if stored tightly closed at 2 °C -8 °C, it is stable until expiration date.

Dispose any unused diluted buffer.

9. Technical tips

- 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.
- 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.
- Optimally, the reagent solutions of the kit should be used immediately after reconstitution. Otherwise, store them in a dark place at 2 °C -8 °C.
- Time the reaction from the pipetting of the reagent to the first well.
- Dilution of the assay sample must be carried out using the buffer solution provided in the kit.
- 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. For more details, watch our web movie [Assay circumstance].

10. Preparation of samples

This kit is intended to measure insulin in human serum, plasma (preferably obtained with EDTA or heparin), culture medium and tissue/cell extracts. The necessary sample volume for the standard procedure is 5 μ L. 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.

If presence of interfering substance is suspected, examine by dilution test at more than 2 points. Dilution of a sample should be made in a test tube using buffer solution prior to adding them to wells. Turbid samples or those containing insoluble materials should be centrifuged before testing to remove any particulate matter.

Storage and stability

Insulin in samples will be inactivated if stored at 2°C - 8°C . If it is necessary to store sample in refrigerator (2°C - 8°C), add aprotinin at final concentration of 100-500 KIU/mL. (KIU: kallikrein inhibitor unit).

If you have to store assay samples for a longer period, snap-freeze samples and keep them below -35°C . Avoid repeated freeze-thaw cycles.

11. Assay procedure

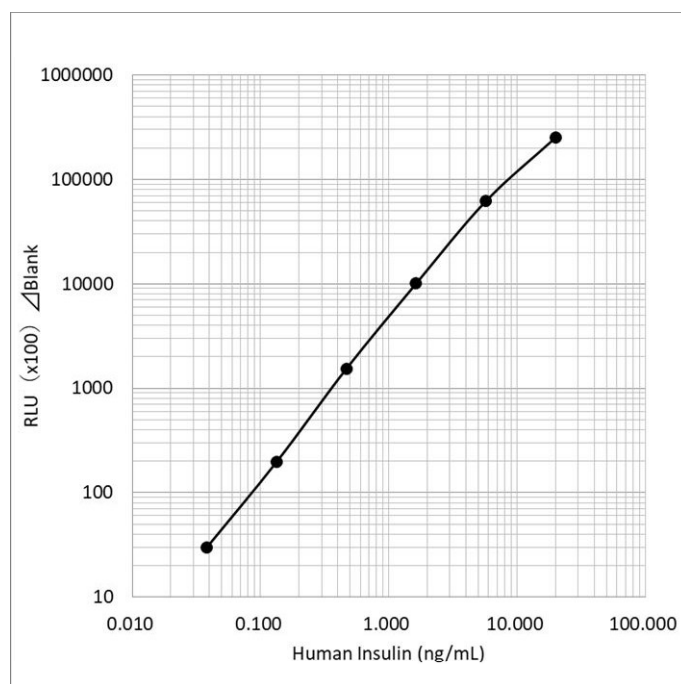
Remove the cover sheet of the anti-Insulin-coated plate after bringing up to room temperature.

- (1) Wash the anti-Insulin-coated plate (A) by filling the wells with 300 μ L of washing buffer and discard 4 times(*①), then strike the plate upside-down onto several sheets of paper towel to remove residual buffer in the wells.
- (2) Pipette 50 μ L of HRP-conjugated anti-insulin antibody to all wells. Shake the plate gently on a plate shaker(*②).
- (3) Pipette 5 μ L of standard solution to the wells designated for standards.
- (4) Pipette 5 μ L of sample to the designated sample wells..
- (5) Shake the plate gently on a plate shaker(*②).
- (6) Stick a plate seal(*③) on the plate and incubate for 2 hours at room temperature (20°C - 25°C).
- (7) Discard the reaction mixture. Rinse wells by filling the wells with 300 μ L of washing buffer and discard 4 times(*①), then strike the plate upside-down onto several sheets of paper towel to remove residual buffer in the wells.
- (8) Pipette 50 μ L of mixed luminescent reagent to all wells, and shake for 1 minute using a plate shaker. (*②)
- (9) After agitation, determine the luminescent intensity using a 96-well microplate reader (for luminescence measurement). It is recommended to perform the measurement 10 to 20 minutes after addition of the luminescent reagent.

*Refer to the page 14-15 for notes of *①, *② and *③.

12. Calculations

- (1) Prepare a standard curve for each assay. Prepare a standard curve using two-way logarithmic section paper by plotting RLU(Y-axis) against insulin concentration (ng/mL) on X-axis.
 - (2) Using the standard curve, read the insulin concentration of a sample at its RLU, and multiply the assay value by dilution factor if the sample has been diluted. Though the assay range is wide enough, in case the RLU 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.
 - Physiological or pathological situation of animals should be judged comprehensively taking other examination results into consideration.



13. Performance characteristics

- Assay range; The assay range of the kit is 0.0381 ng/mL ~ 20 ng/mL.

NIBSC/WHO International Standard Insulin, Human (code: 83/500) (4th) approximate value (μIU/mL)
 = 26 x 「LBIS Human Insulin ELISA Kit (Luminescent type)」 value (ng/mL)
 1 IU = 0.03846 mg, 26.0 IU/mg

- Precision of assay (Within assay variation)

3 samples, 5 replicated assay

n / ID	Sample1 (ng/mL)	Sample2 (pg/mL)	Sample3 (pg/mL)
1	5.84	0.980	0.207
2	5.92	0.943	0.210
3	5.79	0.962	0.207
4	5.91	0.940	0.201
5	5.74	0.973	0.201
mean	5.84	0.960	0.205
SD	0.078	0.018	0.004
CV(%)	1.3	1.9	2.0

Mean CV was within 15 %.

- Reproducibility (Between assay variation)

3 samples, 4 days, assayed in triplicate

Day / ID	Sample1 (ng/mL)	Sample2 (ng/mL)	Sample3 (ng/mL)
Day 0	5.52	0.472	0.742
Day 1	5.72	0.469	0.723
Day 2	5.55	0.467	0.785
Day 3	5.55	0.440	0.772
mean	5.58	0.462	0.756
SD	0.090	0.015	0.028
CV(%)	1.6	3.2	3.7

Mean CV was within 15 %

- Recovery test

Standard insulin was added in 6 concentrations to 3 samples and were assayed.

The recoveries were 91.4 ~ 103 %, 91.4 % ~ 103 %

Serum

Added (ng/mL)	Found (ng/mL)	Recovered (ng/mL)	Recovery (%)
—	0.409	—	—
0.143	0.548	0.139	97.2
0.358	0.746	0.337	94.1
0.896	1.24	0.830	92.6
2.24	2.57	2.16	96.0
5.60	5.64	5.23	93.4
14.0	13.7	13.3	95.0

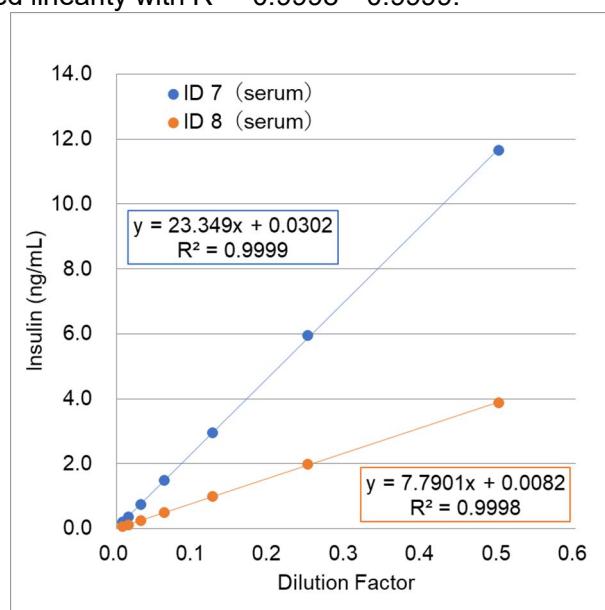
Plasma (EDTA)

Added (ng/mL)	Found (ng/mL)	Recovered (ng/mL)	Recovery (%)
—	0.484	—	—
0.143	0.632	0.148	103
0.358	0.834	0.350	97.8
0.896	1.33	0.843	94.1
2.24	2.62	2.13	95.1
5.60	5.87	5.39	96.3
14.0	13.3	12.8	91.4

● Dilution test

Two serum samples were serially diluted by 6 steps.

The dilution curves showed linearity with $R^2 = 0.9998 \sim 0.9999$.



14. Trouble shooting

● Low RLU in all wells

Possible explanations:

- 1) The standard or samples might not be added.
- 2) Wrong reagents related to luminescence might have been added. Wrong dilution of HRP-conjugated anti-insulin antibody.
- 3) Contamination of peroxidase enzyme inhibitor(s).
- 4) Influence of the temperature under which the kits had been stored.
- 5) Excessive hard washing of the well plate.
- 6) Addition of luminescent reagent soon after taking out from a refrigerator might cause poor luminescence owing to low temperature.

● Intense luminescence in all wells including blank

Possible explanations:

- 1) Improper or inadequate washing. (Change washing frequency from 4 times to 5-6 times at the constant stroke after the reaction with HRP-conjugated anti-insulin / sample.)
- 2) Too high incubation temperature. Adjust the temperature to 20 °C-25 °C.

● 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 insert preservation stabilizer in wells.

For detailed FAQs and explanations, refer to "Trouble shooting and Important Points in Shibayagi's ELISA kits" on our website.

Summary of assay procedure ☐ : Use as a check box

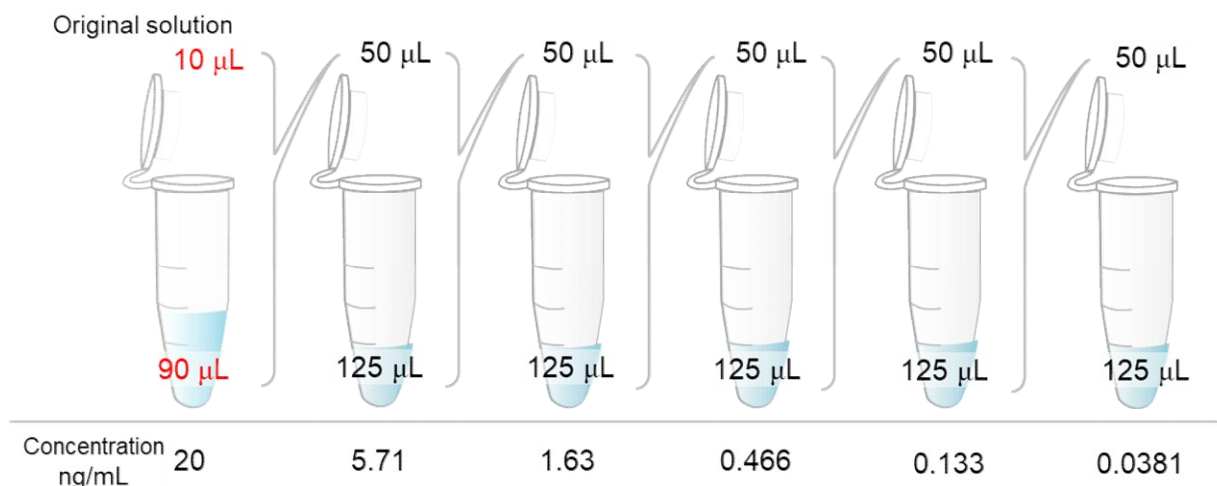
* First, read this instruction manual carefully and start your assay after confirmation of details.

For more details, watch our web movie [ELISA by MOVIE] on our website.

☐ Bring the well-plate and all reagents back to room temperature at 20 °C -25 °C for 2 hours.

☐ Wash stock solution (10×) must be diluted to 10 times by deionized water (or distilled water that returned to 20 °C -25 °C).

☐ Standard human insulin solution dilution example:



☐ (D)HRP-conjugated anti-insulin antibody : Dilute to **100 times** by using buffer solution(C) and use.

☐ Anti-Insulin-coated plate		
☐ ↓Washing 4 times(* ①)		* ④
☐ HRP-conjugated anti-insulin antibody	50 µL	* ⑤
☐ ↓Shaking(* ②)		
☐ Samples/Standards	5 µL	* ⑤
☐ ↓Shaking(* ②), Incubation for 2 hours at 20 °C -25 °C. (Standing(* ③))		* ⑥
☐ Mix Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 in 1 : 1 (vol./vol.) and incubate for 15-30 minutes before use.	Keep in the dark.	
☐ ↓Washing 4 times(* ①)		* ④
☐ Mixed luminescent reagent	50 µL	* ⑤
☐ ↓Shaking for 1 minute(* ②)		
☐ Measurement of luminescence intensity.		
☐ It is recommended to perform the measurement 10 to 20 minutes after addition of the luminescent reagent.		

* 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 4 times to 5-6 times at the constant stroke after the reaction with HRP-conjugated anti-insulin antibody/sample.
Standard of plate-washing pressure: 5-25 mL/min. (Adjust it depending on the nozzle's diameter.) Refer to our web movie [Washing of microplate].

* ② Guideline of shaking: 500-1200 rpm for 10 seconds × 3 times.

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

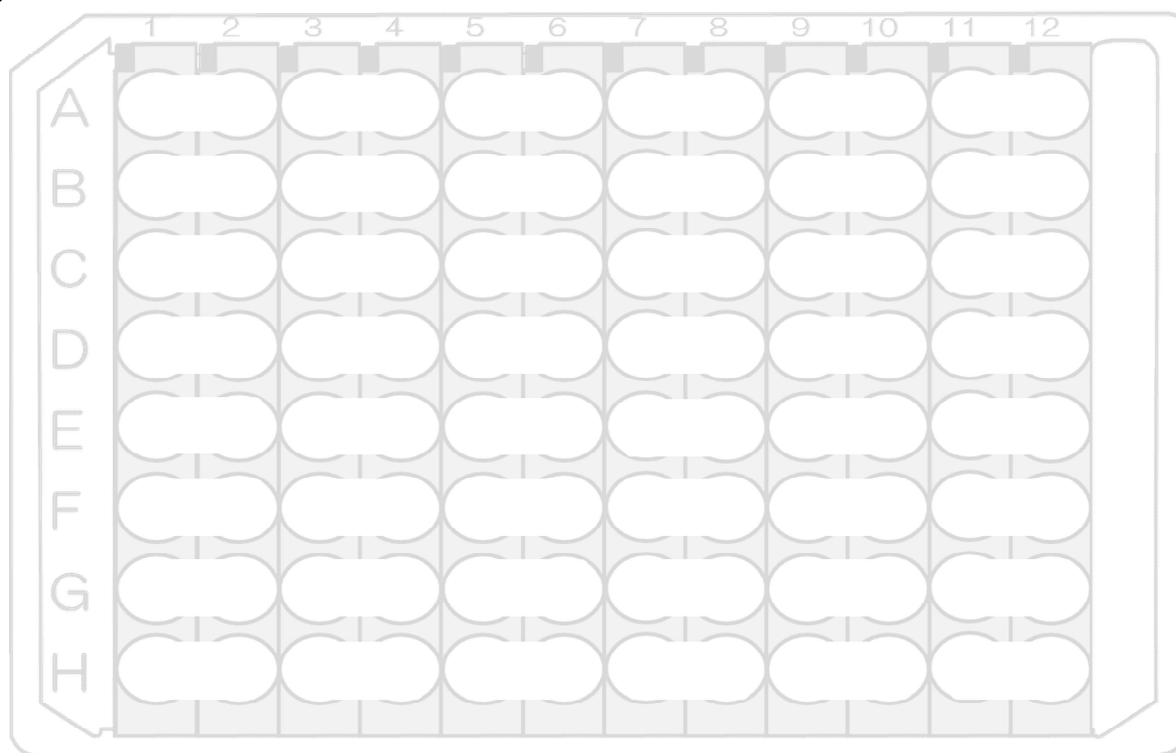
* ⑤ Refer to our web movie [Handling of pipetting].

* ⑥ Refer to our web movie [Assay circumstance].

Worksheet example

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	20.0 ng/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
B	5.71 ng/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
C	1.63 ng/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
D	0.466 ng/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
E	0.133 ng/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
F	0.0381 ng/mL	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39
G	0(Blank)	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32	Sample 40
H	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33	Sample 41

Assay worksheet



LBIS Human Insulin ELISA Kit (Luminescent type)

[Storage condition] Store the kit at 2 °C -8 °C (Do not freeze).

[Term of validity] Expiration date is indicated on the container.

[Manufacture #] AKH-INSL

[Cat #] 634-52911

This kit is
manufactured by

FUJIFILM Wako Shibayagi Corporation

1062-1 Ishihara, Shibukawa, Gunma, Japan 377-0007

TEL.+81-279(25)0279, FAX.+81-279(23)0313

<E-mail>wksb-info@fujifilm.com

<URL><http://www.shibayagi.co.jp>

distributed by

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation