

## Vasopressin ELISA Kit Wako

### [1. Introduction]

This ELISA kit is designed for quantitative determination of (Arg8)-vasopressin. Vasopressin is a 9-amino acid peptide hormone produced in the hypothalamus and released mainly from the posterior pituitary gland. It is called (Arg8)-vasopressin (AVP) because in humans and many mammals the eighth amino acid is arginine. Vasopressin has three types of receptors, V1a, V1b and V2. The V2 receptor is reported to be abundantly expressed in the kidney and involved in its antidiuretic action. On the other hand, V1a and V1b are expressed predominantly in the central nervous system. Recently, it was found that vasopressin is also widely distributed in the brain, and its function in the central nervous system has been attracting attention. Vasopressin has been reported to be involved in stress, social behavior, information processing, spatial learning, and aggressive behavior. Furthermore, vasopressin has been linked to various psychiatric disorders (depression, schizophrenia, autism, anxiety disorders, eating disorders, etc.), and research on vasopressin may be useful in elucidating these disorders and developing therapeutic agents.

### [2. Assay Principle]

The microplate is coated with anti-vasopressin antibody. In each well, the standard solution or sample and biotin-conjugated vasopressin 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 (Arg8)-vasopressin in the sample.

### [3. Kit Performance]

Calibration curve range	1.00 - 2,000 pg/mL
Analyte	(Arg8)-vasopressin
Sample	Human : Serum, Plasma (EDTA), Saliva, Urine Mouse : Serum, Plasma (EDTA) Rat : Serum, Plasma (EDTA)
Sample amount required	50 $\mu$ L (Measurable at n=2) *1
Assay time	Approx. 2.5 hours
Detection method	Luminescent detection*2

\*1 Sample preparation is required for measurement. Please refer to [7. Sample Preparation].

\*2 Requires luminescence plate reader for measurement.

### [4. Precautions for Use]

1. It is important to bring the kit reagents to room temperature (20 - 25°C) before use (approximately 2 hours).
2. Prepare the reagents to be used in the next step in advance, before starting each step.
3. Use this kit after completing training in ELISA methods or under the guidance of an instructor.
4. For manual measurements, individuals who have demonstrated consistent reproducibility in pipette operation should perform the assay.
5. Wear gloves, glasses, and protective clothing during preparation and when using this kit.
6. Prevent reagents coming into contact with the skin. In the event the kit's reagents accidentally come into contact with eyes, mouth, wounds, skin, etc., immediately wash thoroughly with running water and seek medical attention from a physician if necessary.
7. Do not eat, drink, or smoke in the area where this kit is being used.
8. Handle samples with particular care as they may pose a risk of infection. This kit contains animal-derived components.
9. Dispose of used specimens, used reagents, consumables, and unused reagents in accordance with your institution's regulations and local laws and regulations.
10. Do not mix reagents from different lots.
11. It is important to cover the plate with a plate seal to prevent drying of the wells, contamination, temperature fluctuations, and evaporation of dispensed reagents during incubation at each step.
12. ELISA methods can be affected by the assay environment. Strictly adhere to the following : Room temperature should be 20 - 25°C (on the bench or in the incubator) during operation and incubation. Do not perform the assay in environments with wind speeds (including air conditioning) exceeding 0.4 m/sec and humidity levels below 30%.

## **[5. Materials Supplied]**

### **5-1. Kit Components**

Components	Use Status	Amount
Antibody-coated Plate	Use after washing.	96 wells (8×12) / 1 plate
Vasopressin Standard	Freeze-dried. Use after reconstitution.	2 bottles
Buffer	Ready to use.	60 mL / 1 bottle
Biotin-conjugated Vasopressin	Freeze-dried. Use after reconstitution.	2 bottles
Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Use after dilution.	100 μL / 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×)	Use after dilution.	100 mL / 1 bottle
Sample Buffer 1	Ready to use.	10 mL / 1 bottle
Sample Buffer 2	Ready to use.	5 mL / 1 bottle
Sample Buffer 3	Ready to use.	15 mL / 1 bottle
Plate Seal	—	4 sheets

### **5-2. Handling of Unused Reagents**

When using the kit in divided portions, refer to the following for the stability and storage of unused reagents.

If unopened, they remain stable through the expiration date.

(1) Antibody-coated Plate

Antibody-coated Plate can be used in divided portions.

Unused antibody-coated strips should be returned into the zip-lock bag provided in the kit and stored at 2 - 10°C.

(2) Vasopressin Standard

Store unused portion at 2 - 10°C. After dissolving, store at 2 - 10°C and use within 1 week.

Note : Do not store diluted standard solutions.

(3) Buffer

When using a portion of the solutions, transfer a slightly larger amount than necessary to separate containers. The remaining unused solutions should be tightly capped and stored at 2 - 10°C immediately ; do not bring them to room temperature.

(4) Biotin-conjugated Vasopressin

After reconstitution, store at 2 - 10°C and use within 1 weeks.

Do not store Biotin-conjugated Vasopressin solution diluted 100-fold with Buffer.

(5) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

When using the kit in divided portions, take out the solution from the refrigerator when ready to prepare dilutions.

The remaining undiluted solution should be tightly capped and stored at 2 - 10°C immediately ; do not bring it to room temperature.

(6) Luminescent Reagent 1/Luminescent Reagent 2

When using the kit in several divided portions, take out the solution from the refrigerator, prepare, immediately close the lid tightly, and store the remaining stock solution at 2 - 10°C (do not return to room temperature).

(7) Wash Solution (10×)

When storing the Wash Solution (10×), close the lid tightly, and store at 2 - 10°C.

(8) Sample Buffer 1/Sample Buffer 2/Sample Buffer 3

When storing the Sample Buffer 1/Sample Buffer 2/Sample Buffer 3, close the lid tightly, and store at 2 - 10°C.

## **[6. Apparatus, Equipment, and Materials Required]**

- Purified water (distilled water)
- Tubes for dilution of standard solutions and samples
- Glassware for dilution of Wash Solution (graduated cylinders, beakers)
- Micropipettes (for 10 μL disposable tips and 100 to 500 μL disposable tips)
- Continuous dispensing pipette, capable of dispensing 100 μL continuously
- Paper towels or other absorbent material (to remove liquid left on the plate after washing)
- Vortex-type mixer
- Microplate shaker (range approx. 500 to 800 rpm)
- Automatic washer for 96-well plate (if available) or washing bottle
- 96-well microplate reader for luminescence detection
- Software for data processing

## 【7. Sample Preparation】

### 7-1. Recommendations and Precautions Before Sample Preparation

- Sample collection
  - Add 100 KIU\*/mL aprotinin and 1/750 amount (v/v) Proclin950 to sample.  
\* Kallikrein Inhibitor Unit
- Sample storage
  - 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.
  - Frozen samples should be thawed just before the assay and thoroughly mixed.
  - If samples are to be diluted, they should be prepared on an as-needed basis.
- Sample dilution
  - Please dilute the sample before the following preparation process (7-2. Sample Preparation).
  - Use saline as the dilution solvent.
  - Use test tubes (PP, PE) to dilute the samples.
  - Dilute the samples just before use.
- Other issues
  - When turbidity or insoluble materials are present in the samples, remove them by centrifugation or other methods before the assay.
  - If it is suspected that the sample contains an interfering substance, perform a dilution linearity check with two or more different dilutions of the same sample.

### 7-2. Sample Preparation

- (1) Add the room temperature Sample Buffer 1 to the sample as shown in the table below and shake.
- (2) Add Sample Buffer 2 at room temperature to (1), shake, and incubate for 5 minutes.  
Shake it again and incubate 5 minutes.
- (3) Add Sample Buffer 3 which gel is mixed evenly to (2).  
Shake it and incubate 5 minutes. Shake it again and incubate 5 minutes.
- (4) After shake it, centrifuge (5,000 - 6,000 g, 10 minutes, 4°C) and use the supernatant as a sample for measurement. Do not suck the gel in the buffer when collecting it.

Sample Preparation		
Sample	Saliva	Serum/Plasma/Urine
Sample Volume	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Sample Buffer 1	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Sample Buffer 2	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Sample Buffer 3	75 $\mu$ L	150 $\mu$ L
Dilution Factor	2.85	3.70

## 【8. Reagent Preparation】

Reagents in the kit must be brought to room temperature (20 - 25°C) before use (about 2 hours).

### 8-1. Preparation of Standard Solution

Reconstitute Vasopressin Standard with purified water in the amount specified in "Reconstitution of standard" to prepare the original standard solution (200 ng/mL). Then prepare a dilution series using the Buffer included in the kit that has been allowed to warm up to room temperature.

\*Find and check "Reconstitution of standard" on this product page. As the amount of purified water to be added varies by lot, be sure to check it for every lot.

Examples :

Concentration (pg/mL)	Volume of the standard solution	Volume of Buffer
2,000	Standard stock solution : 30 $\mu$ L	2,970 $\mu$ L
500	2,000 pg/mL solution : 50 $\mu$ L	150 $\mu$ L
125	500 pg/mL solution : 50 $\mu$ L	150 $\mu$ L
25.0	125 pg/mL solution : 50 $\mu$ L	200 $\mu$ L
5.00	25.0 pg/mL solution : 50 $\mu$ L	200 $\mu$ L
1.00	5.00 pg/mL solution : 50 $\mu$ L	200 $\mu$ L
0 (B0)	—	150 $\mu$ L

#### 8-2. Biotin-conjugated Vasopressin

Before starting the procedure, dissolve the lyophilized product in 100  $\mu$ L of purified water and dilute the required amount 100-fold with Buffer.

The stock solution after dissolution can be stored at 2 - 10°C for up to 1 week.

Discard any remaining diluted solutions.

#### 8-3. Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

During the 2 hours competitive reaction, dilute 100-fold with room temperature Buffer.

#### 8-4. Luminescent Reagent 1/Luminescent Reagent 2 \* extemporaneously prepared

Mix Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 in a 1 : 1 ratio (v/v) and stored protected from light 30 minutes before use\*.

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

    Mix 6 mL of Luminescent Reagent 1 and 6 mL of Luminescent Reagent 2.

\*This means during the reaction of Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution.

#### 8-5. Wash Solution (10 $\times$ )

Wash Solution (10 $\times$ ) 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 $\times$ ) to 900 mL of purified water (distilled water) to prepare 1,000 mL of Wash Solution (1 $\times$ ).

- Other reagents are ready-to-use.

### **[9. Assay Procedure]**

• Prepare the reagents to be dispensed in the next step before starting each step.

• For dispensing reagents in steps (2), (9) and (13), continuous dispensing using a multichannel pipette is recommended.

(1) Fill each well of the Antibody-coated Plate with the diluted Wash Solution and remove. Repeat four times.

    Then, turn the plate upside down on a paper towel and gently tap to remove any remaining liquid in the wells.

    Note : Steps (2) - (5) below should be completed within 10 - 15 minutes.

(2) Dispense 50  $\mu$ L of Biotin-conjugated Vasopressin solution to each well.

(3) Agitate the plate on a microplate shaker.

    Lightly agitation (for about 2 to 3 seconds once) until the liquid level in the well is even.

(4) Dispense 50  $\mu$ L of standard solution into the wells designated for standards.

(5) Dispense 50  $\mu$ L of pretreated-samples (please refer to [7. Sample Preparation]) into the wells designated for samples.

(6) Agitate the plate using a microplate shaker.

    Note : Shaking conditions : 600 - 800 rpm for 10 seconds.

    Repeat 3 times.

    After each cycle of shaking, stop and then restart again.

(7) Cover with a Plate Seal.

    Incubate at room temperature (20 - 25°C) for 2 hours without shaking.

    Note : Peel the protective paper off the plate seal and seal with the adhesive side facing the plate.

        Do not reuse a plate seal that has already been used.

(8) After the reaction is complete, remove the reaction mixture and fill each well with Wash Solution and wash 4 times.

    Then, turn the plate upside down on a paper towel and gently tap to remove any remaining liquid in the wells.

(9) Dispense 100  $\mu$ L of diluted Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to each well.

(10) Agitate the plate using a microplate shaker.

    Note : Shaking conditions : 600 - 800 rpm for 10 seconds.

    Repeat 3 times.

    After each cycle of shaking, stop and then restart again.

(11) Cover with a Plate Seal.

    Incubate at room temperature (20 - 25°C) for 30 minutes without shaking.

    Note : Peel the protective paper off the plate seal and seal with the adhesive side facing the plate.

        Do not reuse a plate seal that has already been used.

(12) After the reaction is complete, remove the reaction mixture and fill each well with Wash Solution and wash 4 times.

    Then, turn the plate upside down on a paper towel and gently tap to remove any remaining liquid in the wells.

(13) Dispense 100  $\mu$ L of Luminescent Reagent prepared at room temperature into 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.

[Supplementary Notes]

Washing Procedure

For each wash, dispense the Wash Solution into the wells, then agitate gently by hand for 10 seconds and discard. After 4 consecutive washes, place the plate upside down on a paper towel and tap to completely remove the Wash Solution. After removing the Wash Solution, immediately dispense the next solution to prevent the wells from drying out. The recommended volume of Wash Solution to be dispensed is 300  $\mu$ L/well. If foam remains during washing, when manually washing using a wash bottle, allow the Wash Solution to overflow during the final cycle of washing to prevent the formation of foam.

**[10. Calculation Method]**

- (1) Create a standard curve by plotting the concentration of the standard solution (pg/mL) on the X-axis against the B/B<sub>0</sub> (%) value on the Y-axis.
- (2) Read the concentration (pg/mL) corresponding to the B/B<sub>0</sub> (%) of the diluted sample.
- (3) Multiply the read concentration by the sample dilution factor to obtain the measured concentration.

[Note]

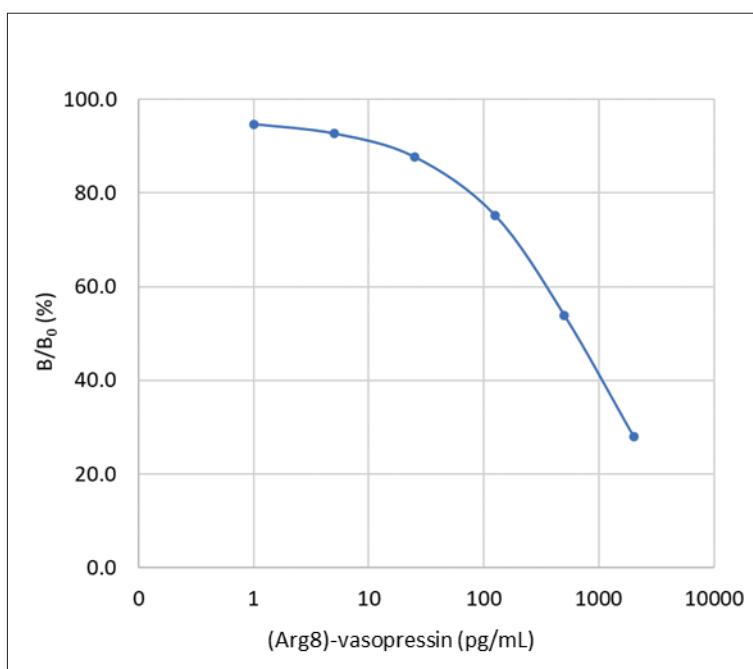
- Luminescence intensity varies depending on the manufacturer and model of the plate reader.
- For calculations using computer software, we recommend the use of a cubic polynomial, and 4 or 5 parameters.

Examples :

Standard solution concentration (pg/mL)	RLU ( $\times 100$ )	B/B <sub>0</sub> (%)
2,000	3,177	28.0
500	6,111	53.9
125	8,530	75.2
25.0	9,941	87.7
5.00	10,506	92.7
1.00	10,733	94.7
0	11,336	100

B/B<sub>0</sub> (%) = (RLU of standard or sample/RLU of 0 pg/mL (B<sub>0</sub>))  $\times 100$

**[11. Typical Standard Curve]**



## 【12. Assay Procedure Summary】

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

- Plates and reagents must be brought to room temperature (20 to 25°C) before use (about 2 hours)
- Dilution of Wash Solution (10×) : Dilute 10-fold with purified water pre-equilibrated to room temperature.

### □ Preparation of Standard Solution :

Reconstitute Vasopressin Standard with purified water in the amount specified in "Reconstitution of standard" \* to prepare the original standard solution (200 ng/mL). Then prepare a dilution series using the Buffer included in the kit that has been allowed to warm up to room temperature.

\*Find and check "Reconstitution of standard" on this product page. As the amount of purified water to be added varies by lot, be sure to check it for every lot.

The following is an example.

Dilution example	Conc.(pg/mL)	2,000	500	125	25.0	5.00	1.00	0
Standard (μL)	stock solution :30	30	50*	50*	50*	50*	50*	—
Buffer (μL)	2,970	150	150	200	200	200	150	

\* : Standard solution at 1 step higher concentration

- \*Preparation of Biotin-conjugated Vasopressin solution: Dissolve the lyophilized product in 100 μL of purified water and dilute the required amount 100-fold with the Buffer.

- \*Prepare samples according to **【7. Sample Preparation】**.

- |   |                    |
|---|--------------------|
| <input type="checkbox"/> <b>Antibody-coated Plate</b>   |                    |
| ↓ Wash 4 times (*1)   |                    |
| <input type="checkbox"/> <b>Diluted Biotin-conjugated Vasopressin solution</b>  | <b>50 μL/well</b>  |
| ↓ Agitate using a microplate shaker   |                    |
| *Lightly agitation (for about 2 to 3 seconds once)  |                    |
| <input type="checkbox"/> <b>Standard solution or sample after preparation</b>   | <b>50 μL/well</b>  |
| ↓ Agitate using a microplate shaker (*2), room temperature (20 - 25°C)  |                    |
| <input type="checkbox"/> ↓ Cover with a Plate Seal. (*3)  |                    |
| ↓ Incubate at room temperature (20 - 25°C) for 2 hours.   |                    |
| <input type="checkbox"/> *Preparation of Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution  |                    |
| (dilute 100-folds with Buffer equilibrated to room temperature)   |                    |
| <input type="checkbox"/> ↓ Washing 4 times (*1).  |                    |
| <input type="checkbox"/> <b>Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution</b>   | <b>100 μL/well</b> |
| ↓ Agitate using a microplate shaker (*2), room temperature (20 - 25°C)  |                    |
| <input type="checkbox"/> ↓ Cover with a Plate Seal. (*3)  |                    |
| ↓ Incubate at room temperature (20 - 25°C) for 30 minutes.  |                    |
| <input type="checkbox"/> *Preparation of the Luminescent Reagent  |                    |
| (mix Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 in 1 : 1 (vol./vol.))  |                    |
| <input type="checkbox"/> ↓ Washing 4 times (*1).  |                    |
| <input type="checkbox"/> <b>Luminescent Reagent</b>   | <b>100 μL/well</b> |
| ↓ Agitate at room temperature (20 - 25°C) for 1 minute.   |                    |
| <input type="checkbox"/> <b>Measurement of luminescence intensity (to be measured between 10 - 20 minutes)</b>  |                    |
| (*1) For each wash, dispense the Wash Solution into the wells, then agitate gently by hand for 10 seconds and discard. After 4 consecutive washes, place the plate upside down on a paper towel and tap to completely remove the Wash Solution. After removing the Wash Solution, immediately dispense the next solution to prevent the wells from drying out. The recommended volume of Wash Solution to be dispensed is 300 μL/well. If foam remains during washing, when manually washing using a wash bottle, allow the Wash Solution to overflow during the final cycle of washing to prevent the formation of foam. |                    |
| (*2) Shaking should be done at 600 - 800 rpm for 10 seconds. Repeat 3 times.  |                    |
| (*3) After shaking is complete, cover with a plate seal and incubate without shaking. Peel the protective paper off the plate seal and seal with the adhesive side facing the plate. Do not reuse a plate seal that has already been used.  |                    |

Vasopressin ELISA Kit *Wako*

[Storage] Store at 2°C - 10°C (Do not freeze).  
[Expiration date] Indicated on the label.  
[Package] For 96 tests  
[Cat #] 291-97301

---

**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://ffwk.fujifilm.co.jp>

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

本品は研究用試薬です。体外診断用として使用できません。

Code No. 291-97301 (96回用)

## パソプレシン ELISA キットワコー

### 【1. はじめに】

本キットは、(Arg8)-パソプレシンを定量的に測定するための ELISA キットです。パソプレシン (vasopressin) は 9 アミノ酸のペプチドホルモンであり、視床下部で產生され、主に下垂体後葉から放出され、抗利尿作用を示します。ヒトや多くの哺乳類では 8 番目のアミノ酸がアルギニンであるため、(Arg8)-パソプレシン (AVP) と呼ばれます。パソプレシンには V1a, V1b と V2 の 3 種の受容体が報告されており、V2 受容体は腎臓に多く発現して抗利尿作用に関与しています。一方、V1a と V1b 受容体は中枢神経系に多く発現しており、近年、パソプレシンも脳内に広く分布していることから、中枢における機能が近年注目されています。その機能として、ストレス、社会的行動、情報処理、空間学習、攻撃行動等に関与することが報告されています。さらにパソプレシンは様々な精神疾患（うつ、統合失調症、自閉症、不安障害、摂食障害等）との関与が多数報告されており、疾患の原因解明や治療薬の開発に役立つことが期待されています。

### 【2. 測定原理】

測定プレートの各ウェルには抗パソプレシン抗体が固相化されています。このウェルに標準溶液または検体とビオチン結合パソプレ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 (Arg8)-パソプレシン濃度を求めることができます。

### 【3. キット性能】

検量線範囲	1.00 ~ 2,000 pg/mL
測定対象	(Arg8)-パソプレシン
測定対象検体	ヒト：血清、血漿 (EDTA)、唾液、尿 マウス：血清、血漿 (EDTA) ラット：血清、血漿 (EDTA)
必要検体量	50 μL (n=2 での測定が可能) <sup>*1</sup>
測定時間	約 2.5 時間
検出法	発光系 <sup>*2</sup>

※ 1 測定には検体の前処理が必要です。【7. 検体の調製方法】を確認して下さい。

※ 2 測定には発光プレートリーダーが必要です。

### 【4. 使用上の注意】

- 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 (約 2 時間程度)。
- 各操作を始める前に、次の操作で使用する試薬を前もって用意して下さい。
- 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ベ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、保護眼鏡、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。
- 検体は感染の危険性があるものとして十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、使用した試薬、消耗品等および未使用の試薬類は、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。
- ロット番号の異なる試薬と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 ~ 25°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。

## 【5. キット内容】

### 5-1. キット構成品

構成品	状態	容量
抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12)／1枚
パソプレシン標準品	凍結乾燥品・溶解後使用	2本
緩衝液	そのまま使用	60mL／1本
ビオチン結合パソプレシン	凍結乾燥品・溶解後使用	2本
ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液	調製後使用	100 μL／1本
発光試薬 1	そのまま使用	6mL／1本
発光試薬 2	そのまま使用	6mL／1本
洗浄液 (10×)	調製後使用	100mL／1本
検体前処理液 1	そのまま使用	10mL／1本
検体前処理液 2	そのまま使用	5mL／1本
検体前処理液 3	そのまま使用	15mL／1本
プレートシール	—	4枚

### 5-2. 未使用の試薬の取扱い

キットを分割して使用される際、未使用の試薬の安定性と保存方法は、以下を参考にして下さい。

#### (1) 抗体固相化プレート

プレートは分割使用可能です。

未使用の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°Cで保存して下さい。

#### (2) パソプレシン標準品

未使用の場合、2～10°Cで保存して下さい。溶解後は2～10°Cで保存し、1週間以内に使用して下さい。

※希釈調製後の各標準溶液は保存しないで下さい。

#### (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て下さい。

残りの未使用の溶液は室温に戻さず直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10°Cで保存して下さい。

#### (4) ビオチン結合パソプレシン

未使用の場合、2～10°Cで保存して下さい。溶解後は2～10°Cで保存し、1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パソプレシン溶液は保存しないで下さい。

#### (5) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

キットを分割して使用する際は希釈時に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さず直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10°C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。

#### (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°Cで保存して下さい。

#### (7) 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°C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。

#### (8) 検体前処理試薬 1、検体前処理試薬 2、検体前処理試薬 3

蓋をしっかりと閉め、2～10°Cで保存して下さい。

## 【6. 器具及び装置】

□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100～500 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（あれば好ましい）

□ペーパータオル等の吸水性のあるもの（洗浄後にプレートに残った液を取り除く）

□攪拌器（Vortex タイプ）

□マイクロプレート振とう器（約500～800rpm）

□96ウェルプレート用洗浄機（あれば好ましい）または洗浄瓶

□96ウェ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

## 【7. 検体の調製方法】

### 7-1. 検体調製前の推奨・注意事項

#### ・検体採取時

100KIU<sup>※</sup>/mL アプロチニン、1/750 量 (v/v) Proclinc950 の添加を推奨します。

※ Kallikrein Inhibitor Unit

#### ・検体保管時

・検体に 100KIU/mL アプロチニン、1/750 量 (v/v) Proclinc950 を添加後、-80°C 以下の凍結保管を推奨します。

なお、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攪拌して下さい。

また、検体を希釈する場合は用時調製として下さい。

#### ・検体希釈時

・検体の希釈は、下記調製処理（7-2. 検体調製方法）を行う前に行って下さい。

・希釈用溶媒には生理食塩水を使用して下さい。

・希釈容器は、試験管 (PP、PE) 等を用いて下さい。

・検体を希釈する際は、用時調製として下さい。

#### ・その他

・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。

### 7-2. 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 を添加し攪拌します。

(2) (1) に、室温化した検体前処理液 2 を添加し、攪拌後 5 分静置します。

その後再度攪拌し、さらに 5 分間静置します。

(3) (2) に、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 3 を添加し、攪拌後 5 分静置します。

その後再度攪拌し、さらに 5 分静置します。

(4) 攪拌後、遠心処理 (5,000g ~ 6,000g、10 分、4°C) を行い、上清を測定用の前処理済み検体とします。

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	唾液検体	血清 / 血漿 / 尿検体
検体量	50 μL	50 μL
検体前処理液 1	50 μL	50 μL
検体前処理液 2	5 μL	10 μL
検体前処理液 3	75 μL	150 μL
希釈率	2.85	3.70

## 【8. 試薬類の調製方法】

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)。

### 8-1. 標準溶液

操作を始める前にパソプレシン標準品に精製水を「標準品原液の調製について」に記載の指定量<sup>※</sup>を加え溶解し、パソプレシン標準品原液 (200ng/mL) を調製して下さい。

その後、室温化されたキット添付の緩衝液で調製して下さい。

※「標準品原液の調製について」は、当社製品ページより確認して下さい。

ロットにより添加する精製水量が異なるため、必ずロットごとにご確認下さい。

下表は一例です。

濃度 (pg/mL)	標準溶液の容量	緩衝液
2,000	標準品原液 : 30 μL	2,970 μL
500	2,000pg/mL 溶液 : 50 μL	150 μL
125	500pg/mL 溶液 : 50 μL	150 μL
25.0	125pg/mL 溶液 : 50 μL	200 μL
5.00	25.0pg/mL 溶液 : 50 μL	200 μL
1.00	5.00pg/mL 溶液 : 50 μL	200 μL
0 (B0)	-	150 μL

#### 8-2. ビオチン結合パソプレシン

操作を始める前に凍結乾燥品を精製水 100  $\mu$ L で溶解し、必要量を緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。

溶解後の原液は、2 ~ 10°C で 1 週間まで保存できます。

希釈溶液が残った場合は保存せず、廃棄して下さい。

#### 8-3. ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビシン溶液

2 時間競合反応させている間に、室温化させた緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。

#### 8-4. 発光試薬 1 及び発光試薬 2 ※用時調製

使用する 30 分前（ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビシン溶液の反応中）に冷蔵庫より必要量を取り出し、1 : 1 (v/v) で混合して下さい。

使用するまで遮光しておいて下さい。

キットを分割使用する際は、残りの発光試薬は室温に戻さず、蓋をしっかり閉め、2 ~ 10°C で保存して下さい。

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

#### 8-5. 洗浄液 (10×)

操作を始める前に室温化された精製水（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 ウェ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。

### 【9. 測定操作】

- ・ 各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。

- ・ (2)、(9)、(13) の試薬分注操作は、マルチチャネルピペットでの連続分注を推奨します。

- ・ (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ェルに残った液を取り除きます。

※以下、(2)～(5) の工程は 10 ~ 15 分の間で完了させて下さい。

- ・ (2) 各ウェルに希釈調製したビオチン結合パソプレシン溶液を 50  $\mu$ L ずつ分注します。

- ・ (3) マイクロプレート振とう器を用いて軽く攪拌します。

※ウェル中の液面に片寄りがなくなる程度の軽い攪拌 (2 ~ 3 秒程度を 1 回)

- ・ (4) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 50  $\mu$ L ずつ分注します。

- ・ (5) 検体測定ウェルに前処理済みの測定用検体（【7. 検体の調製方法】を参照）を 50  $\mu$ 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。

※攪拌 : 600 ~ 800rpm - 10 秒間／回を 3 回繰り返して下さい。

攪拌は 1 回終わる毎に一旦停止し、再度攪拌して下さい。

- ・ (7) プレートシールを貼り、室温 (20 ~ 25°C) で 2 時間静置します。

※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。

- ・ (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ェ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シン溶液を 100  $\mu$ 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。

※攪拌 : 600 ~ 800rpm - 10 秒間／回を 3 回繰り返して下さい。

攪拌は 1 回終わる毎に一旦停止し、再度攪拌して下さい。

- ・ (11) プレートシールを貼り、室温 (20 ~ 25°C) で 30 分間静置します。

※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。

- ・ (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ェルに残った液を取り除きます。

- ・ (13) 各ウェルに調製し室温化された発光試薬を 100  $\mu$ 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。

#### 〔操作補足〕

##### 洗浄方法

洗浄毎に洗浄液をウェルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。

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。

洗浄液除去後はウェルの乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300  $\mu$ L/ウェルです。

洗浄時に泡が残る場合、洗瓶等のマニュアル洗浄であれば、最終回数の洗浄時のみ洗浄液をオーバーフローさせ、泡を回避する方法をお試し下さい。

#### 【10. 計算方法】

- (1) X 軸に標準溶液濃度 (pg/mL)、Y 軸に  $B/B_0$  (%) の標準曲線を作成します。
- (2) 希釀検体の  $B/B_0$  (%) に対応する濃度 (pg/mL) を読み取ります。
- (3) 読み取った濃度に検体希釀率をかけて測定値とします。

#### 【備考】

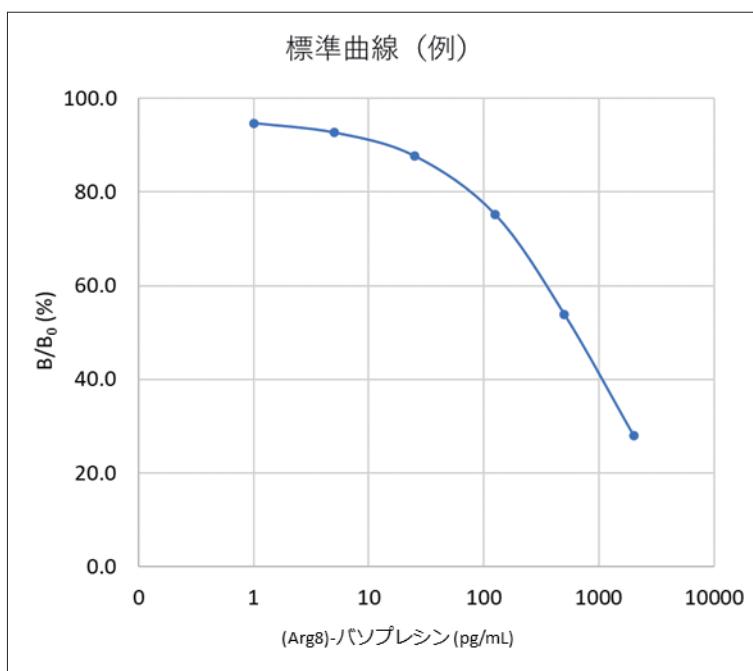
- ・発光強度はプレートリーダーのメーカー及びモデルにより異なります。
- ・コンピュータソフトでの演算処理では、3次多項式、4または5パラメーターの使用をお薦めします。

#### 計算例

標準溶液濃度 (pg/mL)	RLU ( $\times 100$ )	$B/B_0$ (%)
2,000	3,177	28.0
500	6,111	53.9
125	8,530	75.2
25.0	9,941	87.7
5.00	10,506	92.7
1.00	10,733	94.7
0	11,336	100

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

#### 【11. 標準曲線例】



#### 【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 ~ 25°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 倍に希釀して下さい。

□標準溶液の調製 (例)：操作を始める前にバソプレシン標準品に精製水を別紙記載の指定量\*を加え溶解し、バソプレシン標準品原液 (200ng/mL) を調製して下さい。

その後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。

\*ロットにより精製水を添加する量が異なりますので、別紙に記載の指定量をロットごとにご確認下さい。

濃度(pg/mL)	2000	500	125	25.0	5.00	1.00	0
標準溶液(μL)	原液: 30	50*	50*	50*	50*	50*	—
緩衝液(μL)	2970	150	150	200	200	200	150

\*: ひとつ高濃度の標準溶液

□※ビオチン結合パソプレシン溶液の調製：精製水でビオチン結合パソプレ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。

□※【7. 検体の調製方法】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パソプレシン溶液** **50 μL/ ウエル**
- ↓ マイクロプレート振とう機で攪拌(2~3秒を1回程度の軽い攪拌)
- 各標準溶液または調製した検体** **50 μL/ ウエル**
- ↓ マイクロプレート振とう機で攪拌(\*②)、室温(20~25°C)、2時間反応、静置(\*③)
- \*ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビシン溶液の調製(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シン溶液** **100 μL/ ウエル**
- ↓ マイクロプレート振とう機で攪拌(\*②)、室温(20~25°C)、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**
- ↓ マイクロプレート振とう機で1分間攪拌、室温(20~25°C)
- 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。洗浄液除去後はウェルの乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は300 μL/ウェルです。洗浄時に泡が残る場合、洗瓶等のマニュアル洗浄であれば、最終回数の洗浄時のみ洗浄液をオーバーフローさせ、泡を回避する方法をお試し下さい。

(\*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。

【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】	パソプレシン ELISA キットワコ
【和光コード】	291-97301
【英語表記】	Vasopressin ELISA Kit Wako
【貯法】	2~10°Cで保存
【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

— 14/14 —

2410KA2