

Orexin A ELISA Kit *Wako*

[Introduction]

Orexin is a neuropeptide that controls eating and sleep/wakefulness. Orexin occurs as two types, orexin A and orexin B, produced by cleavage of the same precursor, and they act by binding to orexin receptors. There are two types of orexin receptors, OX1R and OX2R, and it has been reported that OX1R exhibits about 50-time higher affinity to orexin A compared to orexin B and OX2R exhibits equal affinity to orexin A and B.

Orexin is considered to have a function in regulating wakefulness and sleep because orexin A was decreased remarkably in the cerebrospinal fluid of patients with narcolepsy, a sleep disorder.

This product is an ELISA kit for simple measurement of orexin A in human cerebrospinal fluid as well as rat cerebrospinal fluid, serum and plasma. The kit does not cross-react with orexin B.

[Kit performance]

Range of the calibration curve	4.69 to 300 pg/mL
Measurement samples	Human cerebrospinal fluid, rat cerebrospinal fluid, rat plasma, rat serum
Necessary amount of sample	25 μ L
Duration of measurement	About 20 hours
Within-run reproducibility	CV < 5%
Between-run reproducibility	CV < 16%

[Components of the kit]

1) Antibody-coated 96-well plate	1 plate
2) Orexin A Standard	300 pg $\times$ 1 vial
3) Anti Orexin A, Biotin-conjugated	12 mL $\times$ 1 bottle
4) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	12 mL $\times$ 1 bottle
5) TMB Solution	12 mL $\times$ 1 bottle
6) Buffer	20 mL $\times$ 1 bottle
7) Stop Solution	12 mL $\times$ 1 bottle
8) Wash Solution (20 $\times$)	50 mL $\times$ 1 bottle
9) Plate Seal	4 sheets

[Measurement principle]

In each well of the measurement plate (96 wells), rabbit polyclonal orexin A antibody is immobilized. A standard solution or sample is placed in this well to bind orexin A with the antibody. Then, biotin-conjugated anti orexin A mouse monoclonal antibody and peroxidase-conjugated streptavidin are allowed to react. Finally, the peroxidase activity in the well is measured to determine the concentration of orexin A in the sample.

[Apparatuses and equipment to be used]

- ☐ Micropipets and tips (25 to 1000 μL) (8- or 12-channel multichannel pipet is recommended)
- ☐ Microplate reader (equipment that can measure the absorbance up to 3.0 at 450 nm)
- ☐ Microplate agitator or shaker
- ☐ Glass test tubes
- ☐ Microplate washer (continuous dispenser, needle dispenser, and aspirator or vacuum pump are recommended for manual method)
- ☐ Volumetric cylinder (1000 mL)
- ☐ Distilled water or deionized water

[Methods for preparation of reagents]

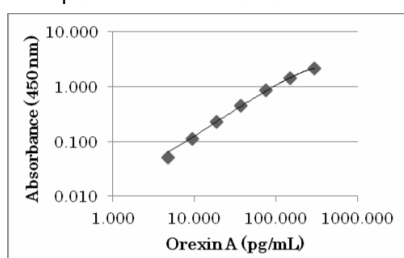
- ☐ **Standard solutions**
Add 1 mL of the Buffer to the container of the reference standard to dissolve the content and prepare 300 pg/mL standard solution. Pipet 0.2 mL of this standard solution, and dilute this with 0.2 mL of the Buffer to prepare 150 pg/mL standard solution. Repeat the same dilution procedure and prepare 75.0, 37.5, 18.8, 9.38, and 4.69 pg/mL standard solutions. Use the Buffer as it is as 0 pg/mL standard solution.
- ☐ **Washing solution**
Dilute 50 mL (whole volume) of the concentrated washing solution with 950 mL of distilled water and use.
- ☐ **Use other reagents as they are.**

[Measurement procedure]

1. Equilibrate the components of the kit at room temperature (20 to 30 $^{\circ}\text{C}$).
2. Dispense 350 μL of the washing solution to each well, discard the solution by sucking with the aspirator or turning over the plate, and remove the solution completely by lightly patting against paper towel. Repeat the procedure two more times to wash the plate 3 times in total.
3. Dispense 100 μL of the Buffer to each well and, then, add 25 μL of the standard solution or sample. Perform the procedure from the start of dispensing the standard solution to the end of dispensing the sample as quickly as possible (within 30 minutes).
4. Seal the measurement plate with a plate seal and agitate at room temperature for 18-24 hours (at about 100 rpm).
5. Remove the solution from each well, and perform the washing procedure similarly to 2. three times in total.
6. Add 100 μL of Anti Orexin A, Biotin-conjugated to each well.
7. Seal the measurement plate with a Plate Seal and agitate at room temperature for 1 hour (at about 100 rpm).
8. Separate a necessary amount of TMB Solution about 1 hour before use and return to room temperature under the condition protected from light.

9. Remove the solution from each well, and perform the washing procedure similarly to 2. three times in total.
10. Add 100 μ L of Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to each well.
11. Seal the measurement plate with a Plate Seal and agitate at room temperature for 30 minutes (at about 100 rpm).
12. Remove the solution from each well, and perform the washing procedure similarly to 2. four times in total.
13. Add 100 μ L of TMB Solution to each well, leave to stand under the condition protected from light, and allow to react at room temperature for 30 minutes.
14. Add 100 μ L of the Stop Solution to each well.
15. Determine the absorbance at 450 nm using an absorption spectrometer for microplates.
16. Prepare a standard curve from the measured values of the absorbance at the respective concentrations of orexin A standard solutions using a commercially available software and 5 (or 4)-parameter regression equation and determine the concentration of orexin A in the sample. If double logarithmic plotting paper is used, plot the concentration of the standard solution along the horizontal axis and the absorbance of the standard solution at each concentration along the vertical axis to prepare the standard curve, apply the absorbance of the sample to the standard curve, and read the concentration of orexin A.

Example of calibration curve



[Precautions for use]

1. For collecting cerebrospinal fluid samples, it is strongly advised to add Triton X-100 to prevent a decrease in the measured values due to adhesion of orexin A in the sample to the container. For addition, prepare phosphate-buffered saline solution containing 0.3% Triton X-100 and mix in the sample in the ratio of 1 to 100 as follows. As an alternative, mixing equal amounts of cerebrospinal fluid and Buffer give the same effect.

Examples of addition

Amount of sample	Amount of 0.3% Triton X-100/PBS added
1 mL or less	10 μ L
1-2 mL	20 μ L
2-3 mL	30 μ L

2. After collecting a blood sample, separate serum or plasma and measure promptly. After collecting a cerebrospinal fluid sample, remove cellular blood and cell components by centrifugation and perform the measurement promptly. If not measured promptly, subdivide appropriately and store in a freeze at -30°C or lower. Collect plasma in blood sampling tubes containing EDTA-2Na (1 mg/mL). Do not repeat freezing and thawing samples.
3. Prepare the reagents just before use as a rule. In particular, use the reference standard promptly after preparation. If the kit is used in divided times, use a glass container (such as a vial) for storage of the reference standard after dissolution. In divided uses, dilute newly from the 300 pg/mL standard solution. The reference standard (300 pg/mL) after dissolution is stable for 1 week of refrigerated storage at 4°C and for about 4 weeks of frozen storage at -30°C or lower.
4. Perform the procedure from the start to the end of dispensing of the standard solution as quickly as possible (within 30 minutes).
5. In the case of a sample at a concentration higher than 300 pg/mL, dilute the sample with the Buffer attached to this kit.
6. For dilution of the standard solution, make sure to use a new tip at each dilution step. Use a new tip for each sample when pipetting into the well.
7. Make sure to perform the measurement in duplicate.
8. Agitate the measurement plate by the microplate agitator to allow reaction (except for coloring reaction). Agitate slowly taking care not to splash the reaction solution on the Plate Seal (at about 100 rpm).
9. Do not use the kits of different lots in combination.
10. Be sure to prepare a standard curve for each measurement as the color development level of the enzyme substrate may be affected slightly by the reaction temperature or time, or degree of agitation of the measurement plate.
11. After stopping the reaction, determine the absorbance promptly.
12. The concentrated washing solution may form precipitation during its storage but this precipitation dissolves by dilution with no quality issue.
13. Take care not to expose each reagent to intense light during storage or use.
14. Use TMB Solution after returning to room temperature under the condition protected from light.

[Measurement examples]

■ Recovery test

	No addition	Orexin A (5 pg/mL)		Orexin A (20 pg/mL)		Orexin A (100 pg/mL)	
	Measured value (pg/mL)	Measured value (pg/mL)	Recovery	Measured value (pg/mL)	Recovery	Measured value (pg/mL)	Recovery
Rat Cerebrospinal fluid [1]	51.82	54.96	96.7%	63.74	88.8%	120.77	79.6%
Rat Cerebrospinal fluid [2]	47.69	55.55	105.4%	63.40	93.7%	109.95	74.5%
Rat Cerebrospinal fluid [3]	38.05	43.99	102.2%	59.12	101.8%	101.16	73.3%
Human Cerebrospinal fluid [1]	12.25	14.29	82.8%	23.25	72.1%	65.16	58.1%
Human Cerebrospinal fluid [2]	47.21	50.45	96.6%	55.71	82.9%	107.12	72.8%
Human Cerebrospinal fluid [3]	24.41	25.99	88.4%	35.07	79.0%	83.51	67.1%
Rat Serum [1]	Not detected	5.64	112.8%	19.94	99.7%	89.58	89.6%
Rat Serum [2]	6.42	12.26	107.4%	25.05	94.8%	93.60	88.0%
Rat Plasma [1]	1.45	6.81	105.6%	20.30	94.6%	91.13	89.8%
Rat Plasma [2]	2.28	7.20	98.9%	21.64	97.1%	90.51	88.5%

■ Dilution test

	x 1	x 2		x 4		x 8	
	Measured value (pg/mL)	Measured value (pg/mL)	Recovery	Measured value (pg/mL)	Recovery	Measured value (pg/mL)	Recovery
Rat Cerebrospinal fluid [1]	47.47	19.77	83.3%	9.47	79.8%	4.46	75.2%
Rat Cerebrospinal fluid [2]	126.06	60.37	95.8%	30.21	95.9%	14.92	94.7%
Rat Cerebrospinal fluid [3]	116.04	56.39	97.2%	27.18	93.7%	12.99	89.6%
Rat Cerebrospinal fluid [4]	173.06	94.49	109.2%	49.82	115.2%	26.72	123.5%
Human Cerebrospinal fluid [1]	21.48	8.71	81.1%	4.65	86.6%	2.71	100.9%
Human Cerebrospinal fluid [2]	18.37	7.28	79.3%	3.61	78.6%	2.44	106.3%
Human Cerebrospinal fluid [3]	16.50	6.36	77.1%	3.08	74.7%	1.53	74.2%
	x 1	x 1.5		x 2		x 3	
	Measured value (pg/mL)	Measured value (pg/mL)	Recovery	Measured value (pg/mL)	Recovery	Measured value (pg/mL)	Recovery
Human Cerebrospinal fluid [4]	58.59	39.63	101.5%	29.84	101.9%	20.12	103.0%
Human Cerebrospinal fluid [5]	26.14	20.87	119.8%	15.76	120.6%	11.86	136.1%

[Outline of procedure]

- ☐ Fully return plates and reagents to room temperature (20 to 30 °C).
- ☐ Dilution of concentrated washing solution : Dilute 20 times with distilled water.
- ☐ Preparation of standard solutions: Dissolve Orexin A Standard thoroughly by adding 1 mL of the Buffer to the vial to prepare 300 pg/mL standard solution. Then, dilute the solution with the Buffer as follows to prepare 150, 75, 37.5, 18.8, 9.38, and 4.69 pg/mL standard solutions.

Concentration (pg/mL)	300	150	75	37.5	18.8	9.38	4.69	0
Standard solutions (mL)	0.2*	0.2*	0.2*	0.2*	0.2*	0.2*	0.2*	0.2*
Buffer (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

* : Standard solution of one-level higher concentration

- ☐ Antibody-coated 96-well plate
 - ↓ Wash three times.
- ☐ Buffer, 100 μ L/well
- ☐ Sample or standard solution, 25 μ L/well
 - ↓ Cover the plate with a Plate Seal and agitate at room temperature for 18-24 hours (at about 100 rpm).
 - ↓ Wash three times.
- ☐ Anti Orexin A, Biotin-conjugated, 100 μ L/well
 - ↓ Cover the plate with a Plate Seal and agitate at room temperature for 1 hour (at about 100 rpm).
 - ↓ Separate TMB Solution, and return to room temperature under protection from light (1 hour before use).
 - ↓ Wash three times.
- ☐ Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution, 100 μ L/well
 - ↓ Cover the plate with a Plate Seal and agitate at room temperature for 30 minutes (at about 100 rpm).
 - ↓ Wash four times.
- ☐ TMB Solution, 100 μ L/well
 - ↓ Leave to stand for 30 minutes at room temperature under protection from light.
- ☐ Stop Solution, 100 μ L/well
 - ↓ Determine the absorbance at 450 nm by the plate reader.

[Storage condition]

Store at 2 to 10 °C.

[Expiration date]

Indicated on the label.

[Packaging]

96 times

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

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

Fuggerstrasse 12
 D-41468 Neuss
 Germany
 Telephone : + 49-2131-3111-0
 Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 293-79801

オレキシンの ELISA キット

〔はじめに〕

オレキシンは摂食および睡眠・覚醒を制御する神経ペプチドです。オレキシンには同一の前駆体から切り出されてできるオレキシンAとオレキシンBの2種があり、オレキシン受容体に結合して作用します。オレキシン受容体にはOX1RとOX2Rの2種があり、OX1RはオレキシンAへの親和性がオレキシンBより約50倍高く、OX2RはオレキシンAとBで同等の親和性を示すと報告されています。

睡眠障害であるナルコレプシー患者にて脳脊髄液中のオレキシンAの顕著な低下が見られたことから、オレキシンは覚醒・睡眠制御において重要と考えられています。本品はヒト脳脊髄液およびラット脳脊髄液、血清、血漿中のオレキシンAを簡便に測定可能なELISAキットです。オレキシンBには交差反応しません。

〔キット性能〕

検量線範囲	4.69～300 pg/mL
測定対象検体	ヒト脳脊髄液、ラット脳脊髄液 ラット血漿、ラット血清
必要検体量	25 µL
測定時間	約20時間
同時再現性	CV < 5 %
日差再現性	CV < 16 %

〔キット内容〕

1) Antibody-coated 96-well Plate/抗体固相化96ウエルプレート	1 プレート
2) Orexin A Standard/オレキシン A 標準品	300 pg × 1 本
3) Anti Orexin A, Biotin-conjugated/ビオチン標識抗オレキシン A 抗体	12 mL × 1 本
4) 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	12 mL × 1 本
5) TMB Solution/TMB溶液	12 mL × 1 本
6) Buffer/緩衝液	20 mL × 1 本
7) Stop Solution/反応停止液	12 mL × 1 本
8) Wash Solution (20×)/濃縮洗浄液 (20×)	50 mL × 1 本
9) Plate Seal/プレートシール	4 枚

〔測定原理〕

測定プレート（96ウエル）の各ウエルには、抗オレキシン A、ウサギポリクローナル抗体が固相化されています。このウエルに標準液または検体を入れて抗体にオレキシン A を結合させます。その後ビオチン標識抗オレキシン A、マウスモノクローナル抗体および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、検体中のオレキシン A 濃度を求めることができます。

〔使用器具および装置〕

- ☐ マイクロピペットおよびチップ（25～1,000 μL ）（8 連または12連のマルチチャンネルピペット推奨）
- ☐ マイクロプレートリーダー（測定波長450 nmで吸光度3.0まで測定できる装置）
- ☐ マイクロプレート用振とう機またはシェーカー
- ☐ ガラス製の試験管
- ☐ マイクロプレート洗浄装置（用手法の場合は連続分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプ推奨）
- ☐ メスシリンダー（1,000 mL）
- ☐ 蒸留水または脱イオン水

〔試薬類の調製法〕

○ 標準液

標準品の容器に緩衝液を1 mL加えて内容物を溶解させ、300 pg/mLの標準液を調製します。この標準液から0.2 mLをとり、これを緩衝液0.2 mLで希釈し、150 pg/mLの標準液を調製します。以下同様の希釈操作を繰り返し、75.0、37.5、18.8、9.38、4.69 pg/mLの各標準液を調製します。0 pg/mLの標準液は緩衝液をそのまま使用します。

○ 洗浄液

濃縮洗浄液50 mL（全量）を950 mLの蒸留水にて希釈して使用します。

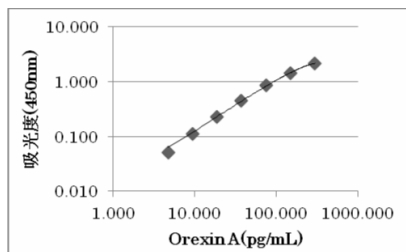
○ その他の試薬はそのまま使用します。

〔測定操作〕

1. キットの部材を室温（20～30 $^{\circ}\text{C}$ ）において、室温平衡します。
2. 各ウェルに、洗浄液350 μL を分注し、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして完全に液を除きます。この操作をさらに2回繰り返し、合計3回の洗浄操作を行います。
3. 各ウェルに緩衝液100 μL を入れ、ついで標準溶液または検体25 μL を加えます。標準液の分注を始めてから検体の分注を終えるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください（30分以内）。
4. 測定プレートをプレートシールでシールし、室温で18-24時間振とうします（約100 rpm）。
5. 各ウェル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計3回行います。
6. 各ウェルにビオチン標識抗オレキシン A 抗体100 μL を添加します。
7. 測定プレートをプレートシールでシールし、室温で1時間振とうします（約100 rpm）。
8. 必要量のTMB溶液を使用する約1時間前に分取し、遮光状態で室温に戻します。
9. 各ウェル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計3回行います。
10. 各ウェルにペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液100 μL を添加します。

11. 測定プレートを購入プレートシールでシールし、室温で30分間振とうします（約100 rpm）。
12. 各ウェル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を4回行います。
13. 各ウェルにTMB溶液100 μ Lを加え、遮光状態で静置し、室温で30分間反応させます。
14. 各ウェルに反応停止液100 μ Lを添加します。
15. マイクロプレート用吸光度計で450 nmの吸光度を測定します。
16. 市販のソフトウェアを用いて、5（or 4）-Parameterの回帰式を使用し、オレキシン A 標準液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、検体のオレキシン A 濃度を求めます。両対数方眼紙を用いる場合は、横軸に標準液の濃度を、縦軸に標準液各濃度の吸光度をプロットして標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、オレキシン A の濃度を読み取ります。

検量線例



〔使用上の注意〕

1. 脳脊髄液の採取時は検体中のオレキシン A の容器吸着による測定値の低下を避けるためTriton X-100の添加を強く推奨します。添加には0.3% Triton X-100 PBSを調製して下記のように検体に約 1/100 の量で混合してください。別法としてキットの緩衝液を脳脊髄液に等量混合することでも同様の効果を得られます。

添加例

検体量	0.3% Triton X-100/PBS添加量
1 mL以下	10 μ L
1-2 mL	20 μ L
2-3 mL	30 μ L

2. 血液検体は採取後、血清または血漿を分離し、直ちに測定してください。脳脊髄液検体は採取後、血球および細胞成分を遠心分離により取り除いた後、直ちに測定してください。直ちに測定できない場合は適宜小分けして、-30℃以下で凍結保存してください。血漿はEDTA-2Na（1 mg/mL）添加採血管で採取してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。

3. 試薬は用時調製を原則としてください。特に標準品は調製後、直ちに使用してください。キットを分割使用する場合、溶解後の標準品の保存にはガラス製の容器（バイアル瓶等）をご使用ください。分割使用の際は300 pg/mLの標準液から新たに希釈調製を行ってください。溶解後の標準品（300 pg/mL）は4℃の冷蔵保存で1週間、-30℃以下の凍結保存で約4週間安定です。
4. 標準溶液の分注を始めてから検体の分注を終えるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください（30分以内）。
5. 300 pg/mLを超える濃度の検体の場合は、検体を本キット添付の緩衝液にて希釈してください。
6. 標準液を希釈するときは、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。検体をウエルに注入する場合は、検体ごとに新しいチップを使用してください。
7. 測定はすべて2重測定してください。
8. 反応には必ずマイクロプレート用振とう機で測定プレートを振とうしてください（呈色反応の場合を除く）。なお振とうはプレートシールに反応液がはねないようにゆっくりと行ってください（約100 rpm）。
9. 異なるロットのキットを組み合わせ使用しないでください。
10. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度などでわずかですが影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごとに作成してください。
11. 反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
12. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈すると溶解しますので、品質には問題ございません。
13. 各試薬の保存中もしくは使用中に強い光が当たらないように注意してください。
14. TMB溶液は遮光状態で室温に戻してから使用してください。

〔測定例〕

■ 添加回収試験

	未添加	5pg/mL オレキシンA添加		20pg/mL オレキシンA添加		100pg/mL オレキシンA添加	
	測定値 (pg/mL)	測定値 (pg/mL)	Recovery	測定値 (pg/mL)	Recovery	測定値 (pg/mL)	Recovery
ラット 脳脊髄液①	51.82	54.96	96.7%	63.74	88.8%	120.77	79.6%
ラット 脳脊髄液②	47.69	55.55	105.4%	63.40	93.7%	109.95	74.5%
ラット 脳脊髄液③	38.05	43.99	102.2%	59.12	101.8%	101.16	73.3%
ヒト 脳脊髄液①	12.25	14.29	82.8%	23.25	72.1%	65.16	58.1%
ヒト 脳脊髄液②	47.21	50.45	96.6%	55.71	82.9%	107.12	72.8%
ヒト 脳脊髄液③	24.41	25.99	88.4%	35.07	79.0%	83.51	67.1%
ラット 血清①	Not detected	5.64	112.8%	19.94	99.7%	89.58	89.6%
ラット 血清②	6.42	12.26	107.4%	25.05	94.8%	93.60	88.0%
ラット 血漿①	1.45	6.81	105.6%	20.30	94.6%	91.13	89.8%
ラット 血漿②	2.28	7.20	98.9%	21.64	97.1%	90.51	88.5%

■ 希釈試験

	×1		×2		×4		×8	
	測定値 (pg/mL)		測定値 (pg/mL)	Recovery	測定値 (pg/mL)	Recovery	測定値 (pg/mL)	Recovery
ラット								
脳脊髄液①	47.47		19.77	83.3%	9.47	79.8%	4.46	75.2%
ラット								
脳脊髄液②	126.06		60.37	95.8%	30.21	95.9%	14.92	94.7%
ラット								
脳脊髄液③	116.04		56.39	97.2%	27.18	93.7%	12.99	89.6%
ラット								
脳脊髄液④	173.06		94.49	109.2%	49.82	115.2%	26.72	123.5%
ヒト								
脳脊髄液①	21.48		8.71	81.1%	4.65	86.6%	2.71	100.9%
ヒト								
脳脊髄液②	18.37		7.28	79.3%	3.61	78.6%	2.44	106.3%
ヒト								
脳脊髄液③	16.50		6.36	77.1%	3.08	74.7%	1.53	74.2%

	×1		×1.5		×2		×3	
	測定値 (pg/mL)		測定値 (pg/mL)	Recovery	測定値 (pg/mL)	Recovery	測定値 (pg/mL)	Recovery
ヒト								
脳脊髄液④	58.59		39.63	101.5%	29.84	101.9%	20.12	103.0%
ヒト								
脳脊髄液⑤	26.14		20.87	119.8%	15.76	120.6%	11.86	136.1%

〔操作概要〕

- ☐ プレート、試薬類を十分に室温（20～30℃）に戻します。
- ☐ 濃縮洗浄液の希釈：蒸留水で20倍に希釈します。
- ☐ 標準溶液の調製：オレキシン A 標準品のバイアルに緩衝液 1 mLを入れて十分に溶解し、300 pg/mLの標準溶液を調整します。その後下記のように緩衝液希釈して150、75、37.5、18.8、9.38、4.69 pg/mLの標準溶液を作製します。

濃度(pg/mL)	300	150	75	37.5	18.8	9.38	4.69	0
標準溶液(mL)	0.2*	0.2*	0.2*	0.2*	0.2*	0.2*	0.2	
緩衝液(mL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

*：ひとつ高濃度の標準溶液

- ☐ 抗体固相化96ウェルプレート
 - ↓ 洗浄 3 回
 - ☐ 緩衝液 100 μ L/ウェル
 - ☐ 検体または標準溶液 25 μ L/ウェル
 - ↓ プレートをプレートシールで覆って室温で18-24時間攪拌（約100 rpm）
 - ↓ 洗浄 3 回
 - ☐ ビオチン標識抗オレキシン A 抗体 100 μ L/ウェル
 - ↓ プレートをプレートシールで覆って室温で1時間攪拌（約100 rpm）
 - ↓ TMB溶液を分取、遮光で室温に戻す（使用する1時間前に実施）。
 - ↓ 洗浄 3 回
 - ☐ ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液 100 μ L/ウェル
 - ↓ プレートをプレートシールで覆って室温で30分攪拌（約100 rpm）
 - ↓ 洗浄 4 回
 - ☐ TMB溶液 100 μ L/ウェル
 - ↓ 室温で遮光して30分間静置
 - ☐ 反応停止液 100 μ L/ウェル
 - ↓
- 450 nmの吸光度をプレートリーダーで測定

〔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

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

2307KA2