

LBIS™ Mouse Insulin ELISA Kit (High Sensitivity)

Please, read this instruction carefully before use.

1. Intended use

LBIS™ Mouse Insulin ELISA Kit (High Sensitivity) is a highly sensitive sandwich ELISA system for quantitative measurement of mouse insulin. This kit is intended for research use only.

2. 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 animal.

3. Assay Principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS™ Mouse Insulin ELISA Kit (High Sensitivity), biotinylated anti-insulin antibody, and standard or sample are incubated in monoclonal anti-insulin coated wells to capture insulin bound with biotinylated anti-insulin antibody. After 2 hours' incubation and washing, HRP (horse radish peroxidase)-conjugated streptavidin is added, and incubated for 30 minutes. After washing, HRP-conjugated streptavidin remaining in wells are reacted with a TMB Solution for 30 minutes, and reaction is stopped by addition of acidic solution, and absorbance of yellow product is measured spectrophotometrically at 450 nm. The absorbance is proportional to insulin concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against standard insulin concentrations. Insulin concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

4. Performance Characteristics

• Assay range

The assay range of the kit is 39 pg/mL - 2500 pg/mL.

If some samples show absorbance more than that of 2500 pg/mL standard, please repeat the assay after proper dilution of samples.

• Specificity

The antibodies used in this kit are specific to insulin. Cross-reactivity of the kit is shown below.

Substances	Cross-reactivity	Remarks
Mouse C-peptide	—	At 2.5 ng/mL
Mouse proinsulin	+	At 2.5 ng/mL
Rat insulin	+	At 2.5 ng/mL
Human insulin	+	At 2.5 ng/mL

- Precision of assay
Within assay variation (3 samples, 5 replicates assay) Mean CV was within 10%.
- Reproducibility
Between assay variation (3 samples, 3 days, assayed in triplicates) Mean CV was within 10%.
- Recovery test
Standard insulin was added in 3 concentrations to 2 serum samples and were assayed.
The recoveries were 95.8% - 109%.
- Dilution test
2 serum samples were serially diluted by 5 steps.
The dilution curves showed excellent linearity with $R^2 = 0.9994$ and 0.9991 .
- Correlation between U-type and ordinary type (TMB) : $R = 0.9983$.

5. Reference Assay Data

Serum insulin levels of fasted mice.

Mean assay value : 104 pg/mL, SD : 18.2 pg/mL

Mouse strain: BALB/c, 6 w males, starvation : 48 hours, n = 8

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

6. 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.
- Use clean laboratory glassware.
- Avoid contact with the acidic Stop Solution and TMB Solution, containing hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine. Wear gloves and eye and clothing protection when handling these reagents.
- Be careful not to allow the reagent solutions of the kit to touch the skin, eyes and mucus membranes. Especially be careful for the Stop Solution because it is sulfuric acid. The Stop Solution and the substrate solution may cause skin/eyes irritation. In case of contact with these wash skin/eyes thoroughly with water and seek medical attention, when necessary.
- Do not drink, eat or smoke in the areas where assays are carried out.
- In treating assay samples of animal origin, be careful for possible biohazards.
- This kit contains components of animal origin. These materials should be handled as potentially infectious.
- The materials must not be pipetted by mouth.
- Unused samples and used tips should be rinsed in 1% formalin, 2% glutaraldehyde, or more than 0.1% sodium hypochlorite solution for more than 1 hour, or be treated by an autoclave before disposal.
- Dispose consumable materials and unused contents in accordance with applicable regional/national regulatory requirements.
- In order to avoid dryness of wells, contamination of foreign substances and evaporation of dispensed reagents, never forget to cover the well plate with a Plate Seal supplied, during incubation.
- ELISA can be easily affected by your laboratory environment. Room temperature should be at 20°C - 25°C strictly. Avoid airstream velocity over 0.4 m/sec. (including wind from air conditioner), and humidity less than 30%.

7. Reagents supplied

Components	Use Status	Amount
(A) Antibody-coated Plate	Use after washing.	96 wells/1 plate
(B) Insulin Standard	Concentrated. Use after dilution.	500 μ L/1 bottle
(C) Buffer	Ready for use.	60 mL/1 bottle
(D) Biotin-conjugated Antibody Solution	Concentrated. Use after dilution.	10 μ L/1 bottle
(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Concentrated. Use after dilution.	20 μ L/1 bottle
(F) TMB Solution	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(H) Stop Solution	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(I) Wash Solution (10 $\times$)	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle
(J) Plate Seal	—	3 sheets

(D) Biotin-conjugated Antibody Solution, and (E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution : Vials contain more than volumes shown in the list. You can easily take out 10 μ L and 20 μ L, respectively, from vials.

[Storage and Stability]

[(A) Antibody-coated Plate]

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

[(B) Insulin Standard (5 ng/mL)]

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

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

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

[(D) Biotin-conjugated Antibody Solution] & [(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution]

Unused working solution (already diluted) should be disposed.

[(H) Stop Solution]

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

[(I) Wash Solution (10×)]

The rest of undiluted buffer : Stored tightly closed at 2°C - 10°C. Dispose any unused diluted buffer.

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

☐ Deionized water (or Distilled water). ☐ Test tubes for preparation of standard solution series. ☐ Glassware for dilution of Wash Solution (10×) (a graduated cylinder, a bottle). ☐ Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 5 µL precisely, and another for 45 µL and 100 µL. ☐ Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipipette plus which can dispense 50 µL. ☐ Paper towel to remove washing buffer remaining in wells. ☐ A vortex-type mixer. ☐ A shaker for 96 well-plate (600 rpm - 1200 rpm). ☐ An automatic washer for 96 well-plate (if available), or a washing bottle with a jet nozzle. ☐ A 96 well-plate reader (450 nm ± 10 nm, 620 nm : 600 nm - 650 nm). ☐ Software for data analysis.

9. Preparation of Samples

This kit is intended to measure insulin in mouse serum, plasma (preferably obtained with heparin), culture medium and tissue/cell extracts. The necessary sample volume for the standard procedure is 5 µL. Samples should be immediately assayed or stored below -35°C for several days. Defrosted samples should be mixed thoroughly for best results.

Hemolytic and hyperlipemic serum samples are not suitable.

*** To avoid influence of blood (high lipid or hemolysis, etc.), if your original samples have heavy chyle or hemolysis, do not use them for assay. Abnormal value might be obtained with hemolysis above 40 mg/dL with this kit.**

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 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 samples will be inactivated if stored at 2°C - 10°C. If it is necessary to store sample in refrigerator (2°C - 10°C), add aprotinin at final concentration of 100 KIU/mL - 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.

10. Preparation of Reagents

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

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

[Concentrated reagents]

[(B) Insulin Standard (5 ng/mL)]

Make a serial dilution of master standard (5 ng/mL) solution to prepare each standard solution (39 pg/mL - 2500 pg/mL).

*** Unit reduction for µIU/mL is 26 IU/mg. (Refer to 2. Introduction.)**

Volume of standard solution	(C) Buffer	Concentration (pg/mL)	Concentration (µIU/mL)
Original solution : 100 µL	100 µL	2500	65
2500 pg/mL solution : 100 µL	100 µL	1250	32.5
1250 pg/mL solution : 100 µL	100 µL	625	16.3
625 pg/mL solution : 100 µL	100 µL	313	8.13
313 pg/mL solution : 100 µL	100 µL	156	4.06
156 pg/mL solution : 100 µL	100 µL	78	2.03
78 pg/mL solution : 100 µL	100 µL	39	1.02
0 (Blank)	100 µL	0	0

[(D) Biotin-conjugated Antibody Solution]

Prepare working solution by dilution of (D) with the (C) Buffer to **1 : 4000**.

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

[(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution]

Prepare working solution by dilution of (E) with the (C) Buffer to **1 : 500**.

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

[(I) Wash Solution (10×)]

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

11. Assay Procedure

Remove the cover sheet of the Antibody-coated Plate after bringing up to room temperature.

- (1) Wash the (A) Antibody-coated Plate 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 45 μ L of (D) Biotin-conjugated Antibody Solution to all wells. Shake the plate gently on a plate shaker (*②).
- (3) Pipette 5 μ L of sample to the designated sample wells.
- (4) Pipette 5 μ L of standard solution to the wells designated for standards.
- (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 20°C - 25°C.
- (7) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (8) Pipette 50 μ L of (E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to all wells, and shake as step (5).
- (9) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at 20°C - 25°C.
- (10) Discard the reaction mixture, and then wash the plate as step (1).
- (11) Pipette 50 μ L of (F) TMB Solution to wells, and shake as step (5).
- (12) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at 20°C - 25°C.
- (13) Add 50 μ L of the Stop Solution to all wells and shake as step (5).
- (14) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620 nm) immediately using a plate reader.

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

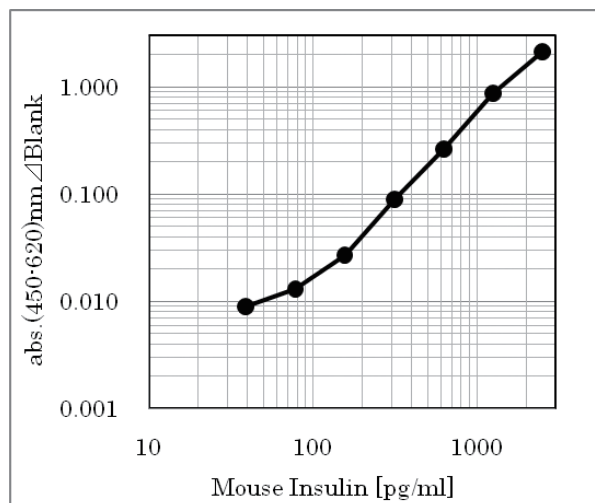
12. Technical Tips

- 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 kit 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 - 10°C.
- Time reaction from the pipetting of the reagent to the first well.
- Dilution of the assay sample must be carried out using the Buffer provided in the kit.
- The TMB Solution should be almost clear pale yellow before use. It turns blue during reaction, and gives yellowish color after addition of Stop Solution. Greenish color means incomplete mixing.
- To avoid denaturation of the coated antibody, do not let the plate go dry.
- As the Antibody-coated Plate is module type of 8 wells $\times$ 12 strips, each strip can be separated by cutting the cover sheet with a knife and used independently.
- When ELISA has to be done under the airstream velocity over 0.4 m/sec. and the humidity less than 30%, seal the well plate with a Plate Seal and place the well plate in an incubator or a styrofoam box in each step of incubation.

13. Calculations

- (1) Prepare a standard curve using semi-logarithmic or two-way logarithmic section paper by plotting absorbance* (Y-axis) against insulin concentration (pg/mL) on X-axis. * Absorbance at 450 nm minus absorbance at 620 nm.
- (2) Using the standard curve, read the insulin concentration of a sample at its absorbance*, and multiply the assay value by dilution factor if the sample has been diluted. Though the assay range is wide enough, in case the absorbance of some samples is higher than that of the highest standard, please repeat the assay after proper dilution of samples with the Buffer.

*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.



Mouse Insulin assay standard curve (an example)
Absorbance may change due to assay environment.

14. Trouble Shooting

- Low absorbance in all wells

Possible explanations :

- 1) The standard or samples might not be added.
- 2) Reagents necessary for coloration such as Biotin-conjugated Antibody Solution, Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution, or TMB Solution might not be added.
- 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of Biotin-conjugated Antibody Solution or Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution.
- 4) Contamination of peroxidase enzyme inhibitor(s).
- 5) Influence of the temperature under which the kits had been stored.
- 6) Excessive hard washing of the well plate.
- 7) Addition of TMB Solution soon after taking out from a refrigerator might cause poor coloration owing to low temperature.

- Intense coloration in all wells including blank

Possible explanations:

- 1) Improper or inadequate washing. (Change washing frequency from 4 times to 5 - 8 times at the constant stroke after the reaction with Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution.)
- 2) Overdeveloping. Incubation time with TMB Solution should be decreased before addition of Stop Solution.
- 3) Too high incubation temperature. Adjust the temperature to 20°C - 25°C.

- High coefficient of variation (CV)

Possible explanations:

- 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.

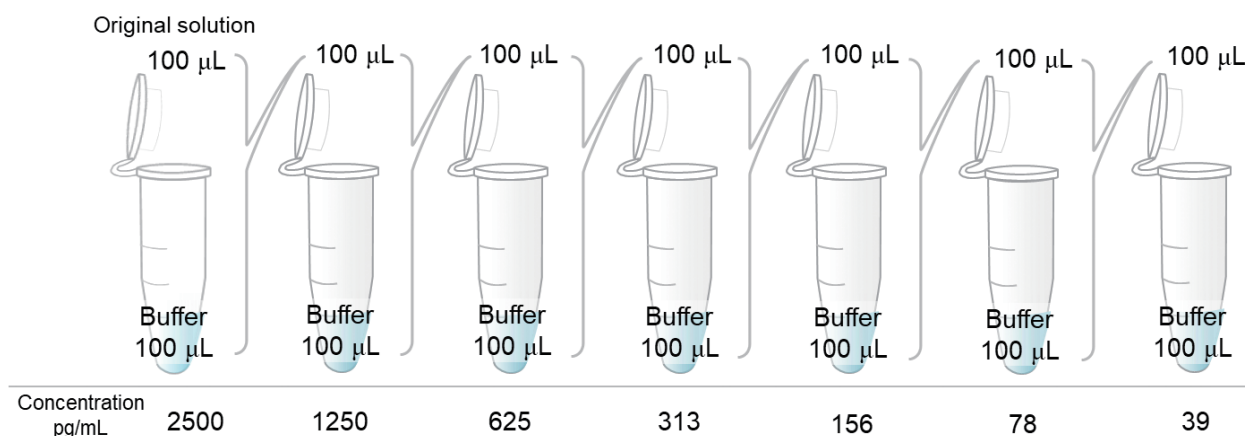
15. Summary of Assay Procedure ☐ : Use as a check box

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

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

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

☐ Insulin Standard dilution example :



☐ (D) Biotin-conjugated Antibody Solution : Dilute to **4000 times** by using (C) Buffer and use.

- ☐ Antibody-coated Plate
- ☐ ↓ Washing 4 times (*①) *⑤
- ☐ Biotin-conjugated Antibody Solution 45 µL
- ☐ ↓ Shaking (*②)
- ☐ Samples/Standards 5 µL
- ☐ ↓ Shaking (*②), Incubation for 2 hours at 20°C - 25°C. (Standing (*③))

(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

☐ Dilute to **500 times** by using (C) Buffer and use.

(Dilute reagents during the first reaction.)

- ☐ ↓ Washing 4 times (*①) *⑤
- ☐ Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution 50 µL
- ☐ ↓ Shaking (*②), Incubation for 30 minutes at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- ☐ ↓ Washing 4 times (*①) *⑤
- ☐ TMB Solution 50 µL
(After dispensing, the color turns to blue depending on the concentration.)
- ☐ ↓ Shaking (*②), Incubation for 30 minutes at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- ☐ Stop Solution 50 µL
(After dispensing, the color turns to yellow depending on the concentration.)
- ☐ ↓ Shaking (*②) (Immediately shake.)
- ☐ Measurement of absorbance (450 nm, Ref 620 nm) immediately *④
(Ref. wave cancels the dirt in the back of plate.)

*① After dispensing wash buffer to wells, lightly shake the plate on your palm for 10 seconds and remove the buffer. Guideline of washing volume : 300 µL/well for an automatic washer and for a pipette if the washing buffer is added by pipette. In case of washing by using 8 channel pipette, sometimes the background tends to be high. If so, change washing frequency from 4 times to 5 - 8 times at the constant stroke after the reaction with Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution. Standard of plate-washing pressure : 5 - 25 mL/min. (Adjust it depending on the nozzle's diameter.)

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

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

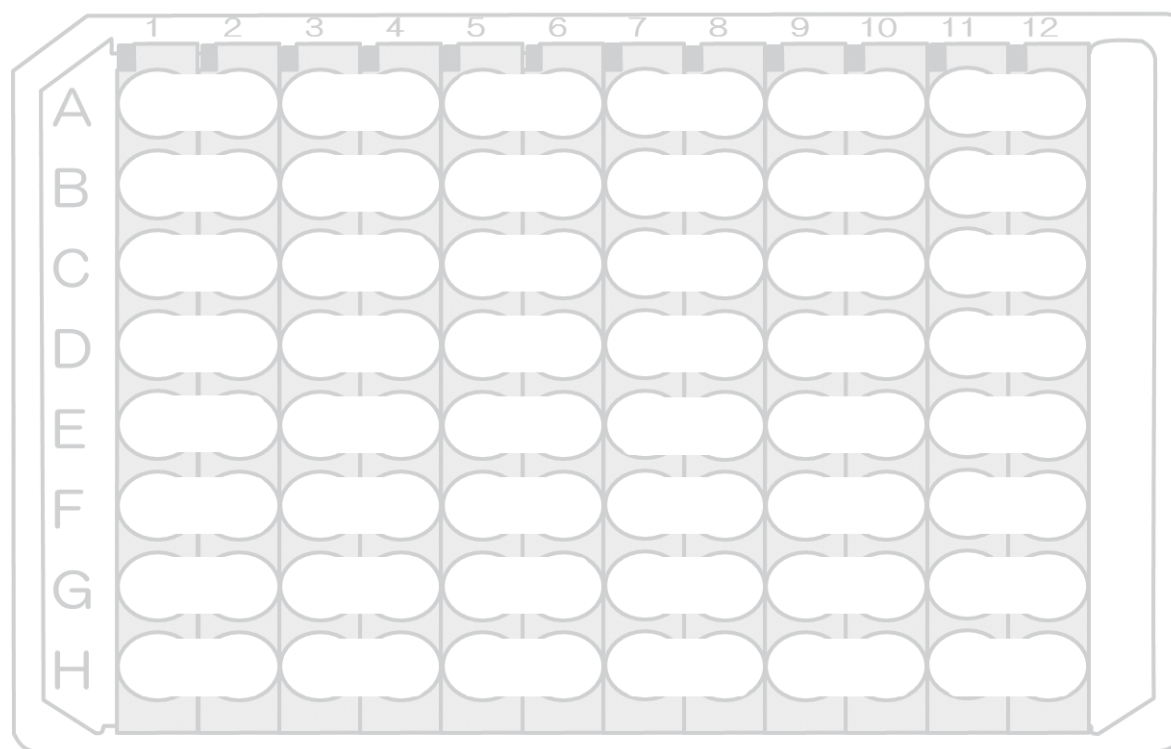
*④ 600 nm - 650 nm can be used as reference wavelength.

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

Worksheet Example

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	2500 pg/mL	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
B	1250 pg/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
C	625 pg/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
D	313 pg/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
E	156 pg/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
F	78 pg/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
G	39 pg/mL	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39
H	0 (Blank)	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32	Sample 40

Assay Worksheet



16. Storage and Expiration

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

LBIS™ Mouse Insulin ELISA Kit (High Sensitivity)

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

[Expiration date] Indicated on the label

[Package] For 96 tests

[Cat #] 296-89801

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://flwk.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 : + 49-2131-311-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

レビス™ マウスインスリン ELISA キット (高感度)

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-B19 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 (0.038mg/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。

本キットはマウス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。本キットは研究のみにご使用下さい。

◆製品の特長

- ・全反応時間は 3 時間です。
- ・マウス血清または血漿（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 μL）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

本キットはビオチン結合抗体溶液、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。洗浄後、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を加え、捕捉されたインスリンとともに 30 分インキュベートします。再度の洗浄後、ウェルに残ったペルオキシダーゼを TMB 溶液と反応させます。反応は酸性の溶液の添加で停止され、反応の結果生じた黄色の産物が 450nm（副波長 620nm）で比色測定されます。吸光度はインスリン濃度にほぼ比例します。標準品濃度に対して吸光度をプロットし標準曲線を作成し、この標準曲線から未知検体中の濃度が決定されます。

3. キットの性能

- ・測定範囲
マウスインスリンを 39pg/mL ～ 2500pg/mL の範囲で測定できます。
- ・特異性
関連物質を本キットで測定した結果は次表のとおりです。
※交差性は、2.5ng/mL 濃度時のデータです。+：交差有り／－：交差無し

検体名	交差性	検体名	交差性
マウス C-ペプチド	－	ラット インスリン	+
マウス プロインスリン	+	ヒト インスリン	+

- ・精度試験（アッセイ内変動）（5 重測定、3 検体） 平均 C.V. 値は 10% 未満
- ・再現性試験（アッセイ間変動）（3 重測定、3 検体、3 日間） 平均 C.V. 値は 10% 未満
- ・添加回収試験
2 血清検体に異なる 3 濃度のインスリンを添加し測定した結果、回収率は 95.8% から 109%
- ・希釈直線性
2 血清検体を連続的に希釈用緩衝液で 5 段階希釈し測定した結果、直線回帰の R² は 0.9991 と 0.9994

4. 参考値

マウスインスリン測定値：平均 104pg/mL、標準偏差 18.2pg/mL

亜種：BALB/c、雄、6 週齢、48 時間絶食、8 匹、血清

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

5. ご使用前にご確認頂きたい技術上のヒント及び注意事項

- ・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 100KIU/mL ～ 500KIU/mL のアプロチニンを添加して保管することをお薦めします。また、長期に保管する場合は、 -35°C 以下での凍結保管を推奨します。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。(KIU：kallikrein inhibitor unit)
- ・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°C ～ 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（エアコンの風も含む）： 0.4m/sec 以上、湿度 30% 未満の環境下での測定は避けて下さい。やむを得ず、測定操作を風速： 0.4m/sec 以上、湿度 30% 未満の環境下で実施する場合には、各ステップの静置反応時、プレートシールをすることに加え、下記のような方法をご検討下さい。
例）インキュベータ内、発泡スチロール製箱内で静置反応させる等。測定室の環境条件により対策方法が異なる場合がありますので、詳細はお問い合わせ下さい。
- ・各ステップでの静置反応時には、ウェルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートシールを貼って下さい。
- ・検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけて下さい。1 ウェル / 1 チップのご使用をお薦めします。
- ・TMB 溶液は 96 ウェルプレートに使用するまでは薄い黄色澄明です。光を避けて保存して下さい。
- ・反応停止液は使用するまでは無色です。
- ・本キットは ELISA 法の研修を修了した方、または指導者の方でのご使用下さい。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下さい。
- ・準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけて下さい。
- ・試薬類を皮膚に付けないで下さい。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受けて下さい。
- ・本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないで下さい。
- ・試薬類は口でピペッティングしないで下さい。
- ・ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。
- ・検体は感染の危険性があるものとして充分注意して取り扱って下さい。本キットは動物由来の成分を含んでいます。
- ・使用済みの検体、使用した消耗品等は 1% ホルマリン、2% グルタルアルデヒドまたは 0.1% 以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。使用した消耗品や未使用の薬品類は所属施設の規定並びに各地域の法令に従って廃棄して下さい。

6. 構成品

構 成 品	状 態	容 量
(A) Antibody-coated Plate 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12) / 1 枚
(B) Insulin Standard インスリン標準品	希釈後使用	500 μL / 1 本
(C) Buffer 緩衝液	そのまま使用	60mL / 1 本
(D) Biotin-conjugated Antibody Solution ビオチン結合抗体溶液	希釈後使用	10 μL / 1 本
(E) 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	20 μL / 1 本
(F) TMB Solution TMB 溶液	そのまま使用	12mL / 1 本
(H) Stop Solution 反応停止液	そのまま使用	12mL / 1 本
(I) Wash Solution (10×) 洗浄液 (10×)	希釈後使用	100mL / 1 本
(J) Plate Seal プレートシール	—	3 枚

【試薬の安定性と保存方法】

(A) 抗体固相化プレート

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

(B) インスリン標準品 (5ng/mL)

キットを分割して使用する際は使用する直前に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

(C) 緩衝液及び (F) TMB 溶液

一部の溶液を使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。

(D) ビオチン結合抗体溶液及び (E) 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。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(H) 反応停止液

使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。

(I) 洗浄液 (10×)

洗浄液 (10×) を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

7. キット以外に必要な器具 ☐チェックリスト

☐精製水 (蒸留水) ☐標準溶液希釈用試験管 ☐洗浄液希釈用ガラス器具 (メスシリンダー・ビーカー・瓶) ☐チップ交換型ピペット (使い捨てチップで5μLを正確にピペッティングできるもの、及び4μL～100μLを正確にピペッティングできるもの) ☐連続分注ピペット (例 Eppendorf の multipette plus)、50μLを連続分注できるもの ☐ペーパータオル等の吸水性のあるもの (洗浄後にプレートに残った液を取り除く) ☐攪拌器 (Vortex タイプ) ☐マイクロプレート振とう器 (約600rpm～1200rpm) ☐96 ウェルプレート用洗浄機 (あれば好ましい) または噴射ビン ☐96 ウェルプレートリーダー (450nm ± 10nm、620nm : 600nm～650nm) ☐データ計算用ソフトウェア

8. 検体の調製

本キットはマウス血清または血漿 (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。

・検体は採取後すぐに測定するか、-35℃以下で凍結保存して下さい。凍結した検体は測定する直前に解凍し十分に攪拌して下さい。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。正しい結果が得られない原因になります。

・溶血した検体や高脂質検体は使わないで下さい。

※血液成分の影響 (高脂質・溶血等) を抑制する為に原検体中の脂質 (乳ビ)・溶血が高い場合は異常値発生の原因となる場合がありますので測定に使用しないで下さい。本キットの場合、溶血は40mg/dL以上で影響が現れます。

・濁り及び不溶物のある検体は遠心分離等で除去後測定に用いて下さい。

・妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、異なる2ポイント以上の希釈率で希釈直線性を確認して下さい。

・検体を希釈する場合は、あらかじめ試験管等を用いて緩衝液で希釈し測定ウェルに分注して下さい。

【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100KIU/mL～500KIU/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下さい。(KIU : kallikrein inhibitor unit)

9. 試薬の調製

※キットの試薬は使用前に必ず室温 (20℃～25℃) に戻して下さい (2時間位が目安です)。

※6.で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で調製して下さい。

※測定に必要な分だけ試薬を調製して下さい (ご不明な際にはお問い合わせ下さい)。

【濃縮された試薬類】

(B) インスリン標準品 (5ng/mL) : 標準曲線作成用

(B) インスリン標準品 (5ng/mL) (原液) と (C) 緩衝液を使って標準溶液を調製して下さい。

下記は一例です。※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) 緩衝液	濃度 (pg/mL)	濃度 (μIU/mL ※)
標準溶液原液 100 μL	100 μL	2500	65
2500pg/mL 溶液 100 μL	100 μL	1250	32.5
1250pg/mL 溶液 100 μL	100 μL	625	16.3
625pg/mL 溶液 100 μL	100 μL	313	8.13
313pg/mL 溶液 100 μL	100 μL	156	4.06
156pg/mL 溶液 100 μL	100 μL	78	2.03
78pg/mL 溶液 100 μL	100 μL	39	1.02
0 (Blank)	100 μL	0	0

(D) ビオチン結合抗体溶液

10 μ L を充分分取できる量をご提供しています。

濃縮液を (C) 緩衝液で **4000 倍** に希釈して下さい (2 段階希釈をお勧めします)。

(E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

20 μ L を充分分取できる量をご提供しています。濃縮液を (C) 緩衝液で **500 倍** に希釈して下さい。

(I) 洗浄液 (10 $\times$)

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

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

10. 測定操作法

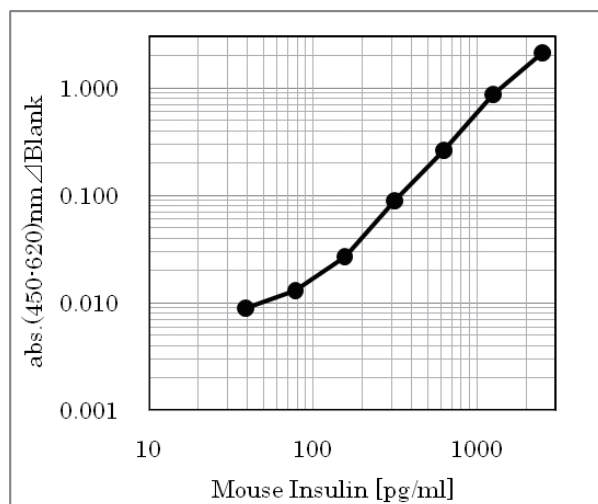
洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意して下さい。

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

- (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 (D) ビオチン結合抗体溶液を 45 μ L ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌 (*②) します。
 - (3) 検体測定ウェルに検体を 5 μ L 添加します。
 - (4) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 5 μ L 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 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) 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、(E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を 50 μ L ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌 (*②) します。
 - (9) プレートシールを貼り、室温 (20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) で 30 分間静置 (*③) します。
 - (10) 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。
 - (11) 各ウェルに (F) TMB 溶液を 50 μ L ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌 (*②) します。
 - (12) プレートシールを貼り、室温 (20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) で 30 分間静置 (*③) します。
 - (13) 各ウェルに (H) 反応停止液を 50 μ L ずつ分注し、発色反応を停止します。
 - (14) 攪拌 (*②) 後、直ちにマイクロプレート用分光光度計で 450nm (副波長 620nm) での吸光度を測定します。副波長は 600nm ~ 650nm の範囲で使用できます。
- (*①)、(*②)、(*③) は 13. 測定手順概要とチェックリストをご参照下さい。

11. 計算

- (1) 測定毎に標準曲線を作成します。両対数を使用し X 軸を標準溶液濃度 (pg/mL)、Y 軸を吸光度の標準曲線グラフを作成して下さい。
 - (2) 標準曲線より、検体の吸光度に対応する濃度 (pg/mL) を読み取ります。
- * 検体の吸光度が標準曲線吸光度より外れた場合は (C) 緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施して下さい。
- * 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。



上のグラフは標準曲線例です (吸光度は、測定環境により変動します)。

* プレートリーダーは SUNRISE RAINBOW (TECAN) を使用

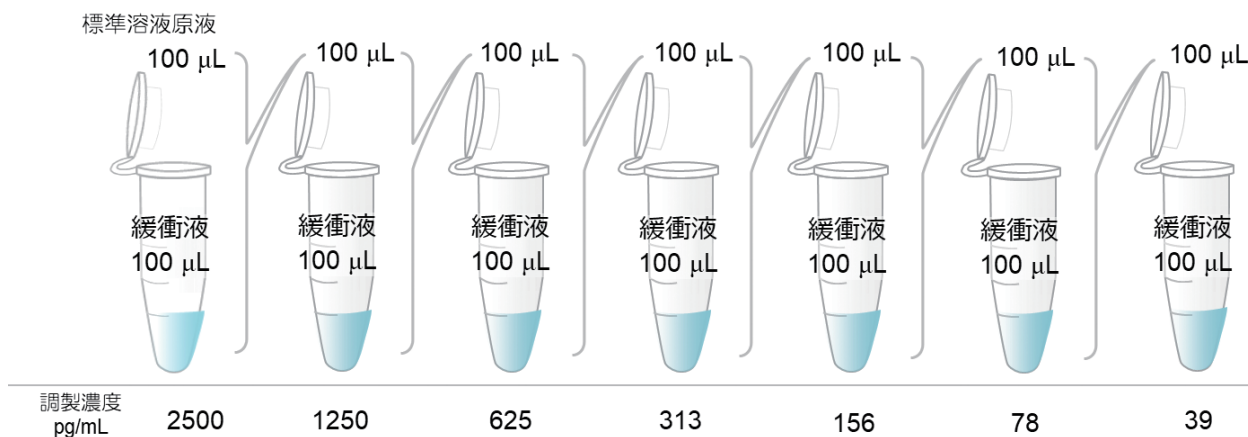
12. トラブルシューティングと Q&A

- すべてのウェルでの反応が弱い
原因として考えられること
 - 1) 標準品や検体の入れ忘れ。
 - 2) 発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
 - 3) 発色に関連する試薬溶液の取り違いや希釈調製不良。
 - 4) 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) プレーートの過剰な洗浄。
 - 7) TMB 溶液の温度が低かった。
- 最小標準溶液濃度（39pg/mL）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。
原因として考えられること
洗浄が不適当、不完全であった。
（ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5 回～8 回に増やして下さい。）
- 変動係数（CV）が大きい
原因として考えられること
 - 1) 洗浄が不適当、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下さい）。
 - 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下さい。使用しないプレートはシールを貼った状態で冷蔵庫に保管して下さい。
- Q-2：プレートを取り出したらウェルの中に液体が入っていましたが何ですか？
A-2：出荷時には保存安定液が充填してあります。

13. 測定手順概要とチェックリスト

必ず取扱説明書を一読して検体条件、測定条件、測定方法を確認後測定操作を行って下さい。

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



- ☐ (D) ビオチン結合抗体溶液の希釈
室温化された（C）緩衝液で **4000 倍**に希釈して下さい。2 段階希釈をお薦めします。

各操作注意事項並びに関連情報

- ☐ 抗体固相化プレート
- ☐ ↓ 洗浄 4 回（洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注）

*①
- ☐ ビオチン結合抗体溶液

45 μ L
- ☐ ↓ 攪拌

*②
- ☐ 検体またはインスリン標準品

5 μ L
- ☐ ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、2 時間反応、静置

*②*③
- ☐ (E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液の希釈。室温化された (C) 緩衝液で、**500 倍**に希釈して下さい。
希釈溶液の調製は第一反応中に行う。
- ☐ ↓ 洗浄 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ストレプトアビジン溶液

50 μ L
- ☐ ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、30 分間反応、静置

*②*③
- ☐ ↓ 洗浄 4 回（洗浄液除去後、直ちに TMB 溶液分注）

*①
- ☐ TMB 溶液

TMB が室温化されていることを確認

50 μ L

分注後、濃度により青色に変色
- ☐ ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、30 分間反応、静置

*②*③
- ☐ 反応停止液

強酸性につき取扱注意

50 μ L

分注後、濃度により黄褐色に変色
- ☐ ↓ 攪拌（直ちに攪拌）

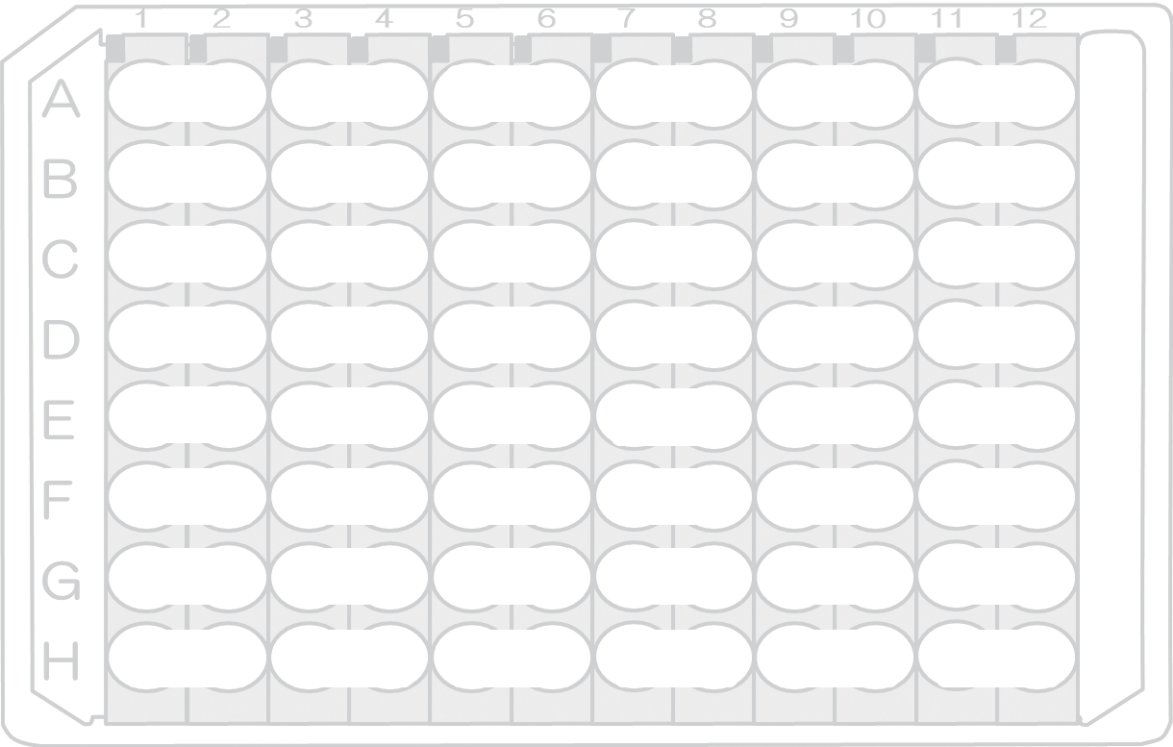
*②
- ☐ 直ちに吸光度測定（主波長 450nm、副波長 620nm：600nm～650nm）
副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします

- (※①) 洗浄液をウェルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。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 μ L/ウェルです。万一、最小標準溶液濃度（39pg/mL）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる場合は解決方法の 1 つとして、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5 回～8 回に増やして下さい。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5mL/分～25mL/分（ノズルの径により異なります）です。第一反応後の初回の洗浄のみウェル間のコンタミに注意して下さい。
- (※②) 攪拌の目安は 600rpm～1200rpm 10 秒間、3 回。
- (※③) 攪拌終了後プレートシールを貼り静置して下さい。
プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

ワークシート（例）

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	2500pg/mL	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	1250pg/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	625pg/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	313pg/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	156pg/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	78pg/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	39pg/mL	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
H	0 (Blank)	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40

ワークシート



14. キットの保存と使用期限

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

【測定名】	
【所属】	
【測定者】	【測定日】
【ロット番号】	【使用期限】
【備考】	

【製品名】	レビス TM マウスインスリン ELISA キット（高感度）
【和光コード】	296-89801
【英語表記】	LBIS TM Mouse Insulin ELISA Kit（High Sensitivity）
【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