

Oxytocin ELISA Kit Wako

[1. Introduction]

This item is an ELISA kit designed for the quantitative detection and measurement of oxytocin in biological fluids such as saliva, urine, serum and plasma. The kit can be measured by a simple pretreatment, and does not require purification using a C18 column and organic solvent, which was conventionally performed as a pretreatment method. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Oxytocin is called as a love or happy hormone consisting of 9 amino acids. It also has stress relief, learning ability improvement, anxiolytic, and anti-fear effects, and is expected to have therapeutic effects on mental illness (autism, depression, etc.).

[2. Assay Principle]

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

[3. Kit Performance]

Calibration curve range	4.00 ~ 12,500 pg/mL
Analyte	Oxytocin
Sample	Human saliva/urine/serum/plasma Mouse serum/plasma Rat serum/plasma
Sample amount required	50 μ L (n = 1, minimum volume) 200 μ L (n = 2, recommended volume) ※ 1
Assay time	Approx. 2.5 hours
Detection method	Luminescent detection ※ 2

※ 1 A sample volume of 200 μ L is recommended for duplicate measurements. The volume of 200 μ L is necessary to separate the supernatant without disturbing the "gel-containing pellet" generated after adding Pretreatment Solution 2 and centrifugation. (In theory, if the gel is not disturbed, sample volumes less than 200 μ L can be used.)

※ 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

— 1/20 —

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. Used specimens and consumables should be soaked in 1% formaldehyde, 2% glutaraldehyde or sodium hypochlorite solution (>0.1%) for at least one hour, or autoclaved and disposed of. Used consumables and unused chemicals should be disposed of in accordance with the regulations of the facility and local laws.
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

Item	State	Amount
Antibody-coated Plate	Use after washing	96 wells (8 × 12) / 1 plate
Oxytocin Standard	Use after preparation	100 μ L / 1 vial
Buffer	Ready-to-use	60 mL / 1 vial
Biotin-conjugated Oxytocin	Lyophilized / Use after reconstitution	1 vial
Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Use after dilution	100 μ L / 1 vial
Luminescent Reagent 1	Ready-to-use	6 mL / 1 vial
Luminescent Reagent 2	Ready-to-use	6 mL / 1 vial
Wash Solution (10 ×)	Use after preparation	100 mL / 1 vial
Sample Buffer 1	Ready-to-use	5 mL / 1 vial
Sample Buffer 2	Ready-to-use	12 mL / 1 vial
Plate Seal	Ready-to-use	4 sheets
Manual	—	1 copy

5-2. Handling of Unused Reagents

When using the kit in divided portions, refer to the following

— 2/20 —

for the stability and storage of unused reagents. If unopened, they remain stable through the expiration date.

- (1) Antibody-coated Plate
The 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) Oxytocin Standard
Store unused portion at 2-10°C.
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 Oxytocin
Store unused portion at 2-10°C.
After reconstitution, store at 2-10°C and use within 2 weeks.
Do not store Biotin-conjugated Oxytocin 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.
Discard any remaining diluted solutions.
- (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.
Discard the unused portions of diluted Wash Solutions.
- (8) Sample Buffer 1/Sample Buffer 2
When storing the Sample Buffer 1/Sample Buffer 2, 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 200 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. 600 to 800 rpm)
- Automatic washer for 96-well plate (if available) or washing

bottle

- Microplate reader for 96-well plates (for absorbance measurement)
- 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.
- 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.
- Sample dilution
• Please dilute the sample before the following preparation process.
• Use the Buffer provided in the kit or 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 Sample Buffer 1 to sample in the table below. Shake it and incubate 5 minutes. Shake it again and incubate 5 minutes.
- (2) Add Sample Buffer 2 which gel is mixed evenly to sample in the table below. Shake it and incubate 5 minutes. Shake it again and incubate 5 minutes.
- (3) After shake it, centrifuge (5,000-6,000 g, 10 minutes, 4°C) and use the supernatant as a sample for measurement. Don't suck the gel in the buffer when collecting it.

	saliva/urine/serum/plasma		
Sample volume	50 µL	100 µL	200 µL
Sample Buffer 1	5 µL	10 µL	20 µL
Sample Buffer 2	25 µL	50 µL	100 µL
Dilution factor	1.35		

[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

Before starting the procedure, Prepare a oxytocin standard stock solution (100 ng/mL) with the Buffer supplied with the

kit pre-equilibrated to room temperature.

Examples :

Concentration of the standard solution (pg/mL)	Volume of the standard solution	Volume of Buffer
12,500	Standard stock solution : 30 μ L	210 μ L
2,500	12,500 pg/mL solution : 50 μ L	200 μ L
500	2,500 pg/mL solution : 50 μ L	200 μ L
100	500 pg/mL solution : 50 μ L	200 μ L
20.0	100 pg/mL solution : 50 μ L	200 μ L
4.00	20.0 pg/mL solution : 50 μ L	200 μ L
0 (B ₀)	–	200 μ L

8-2. Biotin-conjugated Oxytocin

Before starting the procedure, dissolve the lyophilized product in 100 μ 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 2 weeks.

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 (vol./vol.) 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) through (5) below should be completed within 10-15 minutes.

(2) Dispense 50 μ L of Biotin-conjugated Oxytocin 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 μ L of standard solution into the wells designated for standards.

(5) Dispense 50 μ L of pretreated-samples (ref : 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 with shaking 500 rpm by microplate shaker.

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 μ L of diluted Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to each well.

(10) Agitate the plate on 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 μ 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 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.

[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/B₀ (%) value on the Y-axis.
- (2) Read the concentration (pg/mL) corresponding to the B/B₀ (%) of the diluted sample.
- (3) Multiply the read concentration by the sample dilution factor to obtain the measured concentration.

[Note]

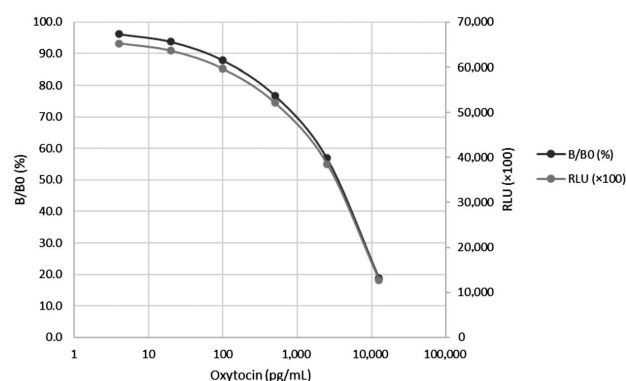
- Luminescence intensity varies depending on the manufacturer and model of the plate reader.
- For calculations using computer software, we recommend the use of a cubic polynomial, and 4 or 5 parameters.
- The oxytocin concentration using this kit is determined with reference to the WHO International Standard (Oxytocin 4th International Standard ; NIBSC code : 76/575).

Examples :

Oxytocin (pg/mL)	RLU ($\times 100$)	B/B ₀ (%)
12,500	12,764	18.8
2,500	38,585	56.9
500	52,102	76.8
100	59,618	87.9
20.0	63,615	93.8
4.00	65,255	96.2
0 (B ₀)	67,820	100.0

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

[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 \times) : Dilute 10-fold with purified water pre-equilibrated to room temperature.
- Preparation of standard solutions (example) : Prepare the standard solution (100 ng/mL) with the Buffer supplied with the kit pre-equilibrated to room temperature. The following is an example.

Dilution example	Concentration (pg/mL)	12,500	2,500	500	100	20.0	4.00	0
	Standard (μL)	stock solution	30	50*	50*	50*	50*	50*
Buffer (μL)		210	200	200	200	200	200	200

* : Standard solution at 1 step higher concentration

- *Preparation of Biotin-conjugated Oxytocin : 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].

- Antibody-coated Plate**
- ↓ Wash 4 times (*1).
- Diluted biotin-conjugated oxytocin solution 50 μL /well**
- ↓ Agitate using a microplate shaker
*Lightly agitation (for about 2 to 3 seconds once)
- Standard solution or sample after preparation 50 μL /well**
- ↓ Agitate using a microplate shaker (*2), room temperature (20-25°C) (*3)
- ↓ cover with a plate seal.
- ↓ Agitate using a microplate shaker for 2 hours (500 rpm)
*Preparation of peroxidase-conjugated streptavidin solution (dilute 100-folds with Buffer equilibrated to room temperature)
- ↓ Washing 4 times (*1).
- Peroxidase-conjugated streptavidin solution 100 μL /well**
- ↓ Agitate using a microplate shaker (*2)
- ↓ incubate at room temperature (20-25°C) for 30 minutes (*3)
*Preparation of the luminescent reagent (mix Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 in 1 : 1 (vol./vol.))
- ↓ Washing 4 times (*1).
- Luminescent reagent 100 μL /well**
- ↓ Agitate at room temperature (20-25°C) for 1 minute
- Measurement of luminescence intensity (to be measured between 10 and 20 minutes)**

- (*1) 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.

[Storage]

Store at 2°C to 10°C

[Expiration date]

Indicated on the label

[Package size]

For 96 assays

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://fwk.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 : + 49-2131-3111100
<http://www.wako-chemicals.de>

オキシトシン ELISA キットワコー

[1. はじめに]

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

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

[2. 測定原理]

測定プレートの各ウェルには抗オキシトシン抗体が固相化されています。このウェルに標準溶液または検体とビオチン結合オキシトシン溶液を入れて反応させます。さらにペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを反応させます。最後にウェル中のペルオキシダーゼ活性を測定することにより、検体中のオキシトシンの濃度を求めることができます。

[3. キット性能]

検量線範囲	4.00 ~ 12,500pg/mL
測定対象	オキシトシン
測定対象検体	ヒト唾液、血清、血漿、尿 マウス血清、血漿 ラット血清、血漿
必要検体量	200 μ L (n=2で測定可能な量) ※1
測定時間	約2.5時間
検出法	発光系 ※2

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

※2 測定には発光プレートリーダーが必要です。

[4. 使用上の注意]

1. キットの試薬は使用前に必ず室温（20～25℃）に戻して下さい（約2時間程度）。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. 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。

9. 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。

10. ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。

11. 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ため、必ずプレートシールを貼って下さい。

12. 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

構成	状態	容量
Antibody-coated Plate/ 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12)/1枚
Oxytocin Standard/ オキシトシン標準品	調製後使用	100 μ L/1本
Buffer/ 緩衝液	そのまま使用	60mL/1本
Biotin-conjugated Oxytocin/ ビオチン結合オキシトシン	凍結乾燥品・溶解後 使用	1本
Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution/ ペルオキシダーゼ結合ス トレプトアビジン溶液	希釈後使用	100 μ L/1本
Luminescent Reagent 1/ 発光試薬 1	そのまま使用	6mL/1本
Luminescent Reagent 2/ 発光試薬 2	そのまま使用	6mL/1本
Wash Solution (10×)/ 洗浄液 (10×)	調製後使用	100mL/1本
Sample Buffer 1/ 検体前処理液 1	そのまま使用	5mL/1本
Sample Buffer 2/ 検体前処理液 2	そのまま使用	12mL/1本
Plate Seal/ プレートシール	そのまま使用	4枚
取扱説明書	—	1部

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。
未開封の場合、有効期限安定性を保ちます。

(1) 抗体固相化プレート

未使用の抗体固相化ストリップはジップシールバックに戻し、そのまま2～10℃で保存して下さい。

- (2) オキシトシン標準品
未使用の場合、2～10℃で保存して下さい。
※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℃で保存して下さい。
- (4) ビオチン結合オキシトシン
未使用の場合、2～10℃で保存して下さい。
溶解後は、2～10℃で保存し、2週間以内に使用して下さい。
緩衝液で100倍に希釈調製したビオチン結合オキシトシン溶液は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℃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及び発光試薬2
キットを分割して使用する際は冷蔵庫より取り出し調製をして下さい。残りの発光試薬は室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。
- (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℃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) 検体前処理液1、検体前処理液2
蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。

[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 (メスシリンダー・ビーカー)
- チップ交換型ピペット (使い捨てチップで10μLを正確にピペティングできるもの、及び200～500μLを正確にピペティングできるもの)
- 連続分注ピペット、100μL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600～800rpm)
- 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. 検体調製方法]

7-1. 検体調製前の推奨・注意事項

●検体採取時

100KIU/mL アプロチニン、1/750量 (v/v) Proclin950の添加を推奨します。

●検体保管時

- 検体に100KIU/mL アプロチニン、1/750量 (v/v) Proclin950を添加後-80℃以下で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十分に攪拌して下さい。

●検体希釈時

- 検体の希釈は、下記調製処理を行う前に行って下さい。
- 希釈用溶媒には生理食塩水もしくはキット添付のBuffer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。
- (2) その後、室温化しゲルが均一になるように懸濁した検体前処理液2を添加し攪拌後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。
- (3) 攪拌後、遠心処理 (5,000g～6,000g、10分、4℃) 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	唾液 / 血清 / 血漿 / 尿検体		
検体量	50 μL	100 μL	200 μL
検体前処理液1	5 μL	10 μL	20 μL
検体前処理液2	25 μL	50 μL	100 μL
希釈率	1.35		

[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℃) に戻して下さい (2時間程度)。

8-1. 標準溶液

操作を始める前にオキシトシン標準品原液 (100ng/mL) を室温化されたキット添付緩衝液で調製して下さい。

下記は一例です。

濃度 (pg/mL)	標準溶液の容量	緩衝液
12,500	標準品原液 : 30 μL	210 μL
2,500	12,500pg/mL 溶液 : 50 μL	200 μL
500	2,500pg/mL 溶液 : 50 μL	200 μL
100	500pg/mL 溶液 : 50 μL	200 μL
20.0	100pg/mL 溶液 : 50 μL	200 μL
4.00	20.0pg/mL 溶液 : 50 μL	200 μL
0 (B ₀)	-	200 μL

8-2. ビオチン結合オキシトシン

操作を始める前に凍結乾燥品を精製水100μL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℃で2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ジン溶液
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ジン溶液の反応中）に冷蔵庫より必要量を取り出し、1:1 (vol./vol.)で混合して下さい。

使用するまで遮光しておいて下さい。

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、蓋をしっかりと閉め、2~10℃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ウェル全てを使用する場合)

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ウェル全てを使用する場合)

○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、マルチチャン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オキシトシン溶液を50μL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い程度程度の軽い攪拌(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50μL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を50μL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℃)でマイクロプレート振とう器を用いて2時間攪拌(500rpm)します。

※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ジン溶液を100μL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℃)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) 各ウェルに調製した室温化させた発光試薬を100μL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300μL/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軸を標準溶液濃度(pg/mL)、Y軸をB/B₀(%)の標準曲線を作成します。

(2) 希釈検体のB/B₀(%)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釈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勧めします。

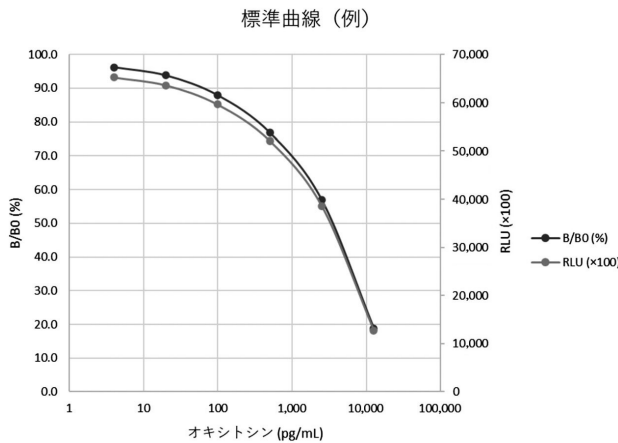
・本キットのオキシトシン濃度は、WHO世界標準品(OXYTOCIN 4th International Standard NIBSC code: 76/575)を用いて、値付けを行っております。

計算例

オキシトシン濃度 (pg/mL)	RLU (×100)	B/B ₀ (%)
12,500	12,764	18.8
2,500	38,585	56.9
500	52,102	76.8
100	59,618	87.9
20.0	63,615	93.8
4.00	65,255	96.2
0 (B ₀)	67,820	100.0

B/B₀ (%) = (各標準溶液また検体の発光強度 (RLU) / 0 濃度標準品 (B₀) の発光強度 (RLU)) × 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、試薬類を十分に室温 (20 ~ 25℃) に戻して下さい (約 2 時間)。
- 洗浄液 (10 ×) の調製：室温化された精製水で、10 倍に希釈して下さい。
- 標準溶液の調製 (例)：オキシトシン標準品原液 (100ng/mL) を室温化されたキット添付緩衝液で調製して下さい。下記は一例です。

調製例	濃度 (pg/mL)	12,500	2,500	500	100	20.0	4.00	0
標準溶液 (μL)	原液	30	50*	50*	50*	50*	50*	-
緩衝液 (μL)		210	200	200	200	200	200	200

* : ひとつ高濃度の標準溶液

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

* 【7. 検体調製方法】に従って、検体を調製して下さい。

抗体固相化プレート

- ↓ 洗浄 4 回 (*①)

希釈調製したビオチン結合オキシトシン溶液 50 μL/ ウェル

↓ 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/ ウェル

- ↓ マイクロプレート振とう機で攪拌 (*②)
- 室温 (20 ~ 25℃) (*③)

- ↓ プレートシールを貼り、マイクロプレート振とう機で 2 時間攪拌 (500rpm)

* ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液の調製 (室温化した緩衝液で 100 倍希釈して下さい)

- ↓ 洗浄 4 回 (*①)

調製したペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

100 μL/ ウェル

- ↓ マイクロプレート振とう機で攪拌 (*②)

- ↓ 30 分室温 (20 ~ 25℃) で反応させる

- ↓ 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/ ウェル

- ↓ マイクロプレート振とう機で 1 分間 軽く攪拌、室温 (20 ~ 25℃)

発光強度測定 (10 分 ~ 20 分の間に測定)

(*①) 洗浄毎に洗浄液をウェルに分注後、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て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。

【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

大阪府中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741