

LBIS™ Mouse C-peptide ELISA Kit

Please, read this instruction carefully before use.

1. Intended use

LBIS™ Mouse C-peptide ELISA Kit is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of mouse C-peptide. This is for research use only.

2. Introduction

Insulin is first synthesized as a single chain polypeptide, proinsulin, then three disulfide bonds are formed, and finally divided into insulin and C-peptide through enzymatic splitting. Mouse C-peptide 1 is a single chain peptide composed of 29 amino acids, while C-peptide 2 is composed of 31 residues. C-peptide is secreted together with insulin. The role of C-peptide has been considered to keep the best configuration to form three disulfide bonds, and has no biological activity, however, recent studies revealed that C-peptide can bind, probably, a G-protein-coupling specific receptor present on the surface of endothelial cells, kidney microtubule cells and fibroblasts, resulting in activation of calcium-dependent intracellular signaling, activation of Na⁺-K⁺-ATPase, and enhancement of NO synthesis. Administration of C-peptide to DM1 patients enhances blood circulation in the skeletal muscle and skin, and also minimizes kidney glomerular hyperfiltration, decreasing albumin excretion into urine, and also improves nervous function, indicating that C-peptide should be given together with insulin to DM1 patients. Important region to bind receptor has been reported to be C-terminal pentapeptide (27-31).

The biological half life of C-peptide is several times longer than that of insulin. Measurement of C-peptide is useful in estimation of pancreatic function for insulin synthesis and secretion. Urinary C-peptide concentration is well correlated to its blood level. C-peptide measurement is also useful in estimation of insulin secretion by cultured islet of Langerhans because very often insulin is added to the culture medium, and it is difficult to discriminate secreted insulin from added insulin. As FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's kit recognizes the common sequences between C-peptide 1 and 2, it can measure total amount of C-peptide.

3. Assay Principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS™ Mouse C-peptide ELISA Kit, standards or samples are incubated in monoclonal anti-C-peptide-coated wells to capture C-peptide. After 2 hours' incubation and washing, Biotin-conjugated Antibody Solution is added and incubated further for 2 hours' to bind with captured C-peptide. Then 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 C-peptide concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against standard C-peptide concentrations. C-peptide concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

4. Performance Characteristics

• Assay range

The assay range of the kit is 46.9 pg/mL - 3000 pg/mL.

The effective assay range by standard assay procedure (dilution rate : 5×) is 234.5 pg/mL - 15000 pg/mL.

• Specificity

The antibodies used in this kit are specific to mouse C-peptide. Cross-reactivity against rat C-peptide is 89% and human C-peptide is 85% when tested at 3000 pg/mL.

• Precision of assay

Within assay variation (2 samples, 8 replicates assay), Mean CV was within 10%.

• Reproducibility

Between assay variation (3 samples, 4 days, 4 replicates assay), Mean CV was within 10%.

• Recovery test

Standard C-peptide was added in 3 concentrations to 2 serum samples and were assayed.

The recoveries were 94% - 104%

• Dilution test

2 serum samples were serially diluted by 3 steps.

The dilution curves showed linearity with $R^2 = 1.0$.

5. Precautions

- For professional use only. Beginners are advised to use this kit under the guidance of experienced person.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Use clean laboratory glassware.
- 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%.

6. Reagents supplied

Components	Use Status	Amount
(A) Antibody-coated Plate	Use after washing.	96 wells/1 plate
(B) C-peptide 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.	100 μ L/1 bottle
(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Concentrated. Use after dilution.	100 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
Plate Seal	–	4 sheets

[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) C-peptide Standard (6000 μ g/mL)]

Standard solutions prepared above should be used as soon as possible, and should not be stored. The rest of original standard : store at 2°C - 10°C

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

If not opened, store at 2°C - 10°C. Once opened, we recommend using 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.

The rest of the undiluted solution : store at 2°C - 10°C

[(H) Stop Solution]

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

[(I) Wash Solution (10 \times)]

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

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

- Deionized water (or Distilled water). Test tubes for preparation of standard solution series.
- Glassware for dilution of Wash Solution (10×) (a graduated cylinder, a bottle)
- Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 10 μ L precisely, and another for 10 μ L - 50 μ L and 100 μ L - 300 μ L. Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipette plus which can dispense 50 μ L. 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 wash bottle with a jet nozzle. A 96 well-plate reader (450 nm \pm 10 nm, 620 nm : 600 nm - 650 nm) Software for data analysis.

8. Preparation of Samples

This kit is intended to measure C-peptide in mouse serum or plasma. The necessary sample volume for the standard procedure is 10 μ L.

Samples should be immediately assayed or stored below -35°C until assay. Defrosted samples should be mixed thoroughly for best results. Do not repeat freeze and thaw cycles of samples. It may cause improper 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 80 mg/dL with this kit.**

Sample's pH should be between 6.5 - 7.5. 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 (e.g. sample 10 μ L + Buffer 40 μ L). Turbid samples or those containing insoluble materials should be centrifuged before testing to remove any particulate matter.

Storage and stability

C-peptide in 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 - 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.

9. Preparation of Reagents

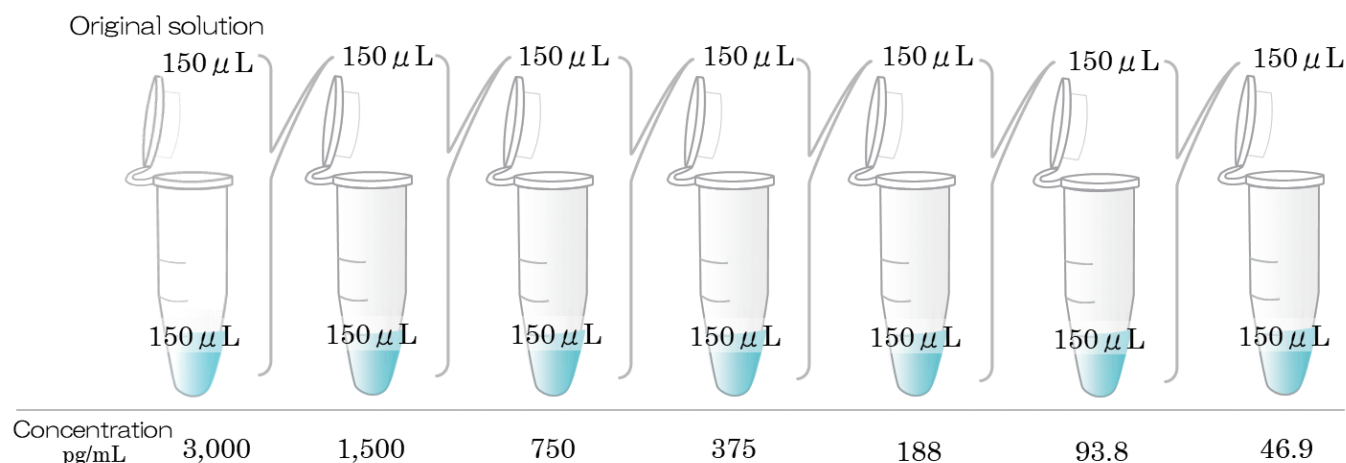
- ◆ Bring all reagents of the kit to room temperature (20°C - 25°C) before use.
- ◆ Prepare reagent solutions in appropriate volume for your assay. Do not store the diluted reagents.

[Concentrated reagents]

[(B) C-peptide Standard]

Make a serial dilution of master standard (6000 pg/mL) solution to prepare each standard solution.

Volume of standard solution	(C) Buffer	Concentration (pg/mL)
Original solution : 150 μ L	150 μ L	3000
3000 pg/mL solution : 150 μ L	150 μ L	1500
1500 pg/mL solution : 150 μ L	150 μ L	750
750 pg/mL solution : 150 μ L	150 μ L	375
375 pg/mL solution : 150 μ L	150 μ L	188
188 pg/mL solution : 150 μ L	150 μ L	93.8
93.8 pg/mL solution : 150 μ L	150 μ L	46.9
0 (Blank)	150 μ L	0



[(D) Biotin-conjugated Antibody Solution]

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

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 : 100**.

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 washing buffer (10×) and 900 mL of deionized water (or distilled water).

10. 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 3 times (*①), then strike the plate upside-down onto several sheets of paper towel to remove residual buffer in the wells.
- (2) Pipette 40 μ L of (C) Buffer and 10 μ L of samples to the designated sample wells.
- (3) Pipette 50 μ L of standard solution to the wells designated for standards.
- (4) Shake the plate gently on a plate shaker (*②).
- (5) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate for 2 hours at 20°C - 25°C.
- (6) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (7) Pipette 50 μ L of (D) Biotin-conjugated Antibody Solution to all wells, and shake as step (4).
- (8) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate the plate for 2 hours at 20°C - 25°C.
- (9) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (10) Pipette 50 μ L of (E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to all wells, and shake as step (4).
- (11) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at 20°C - 25°C.
- (12) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (13) Pipette 50 μ L of (F) TMB Solution to wells, and shake as step (4).
- (14) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at 20°C - 25°C.
- (15) Add 50 μ L of the (H) Stop Solution to all wells and shake as step (4).
- (16) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620* nm) immediately using a plate reader.

*Refer to 14. Summary of Assay Procedure for notes of *①, *② and *③.

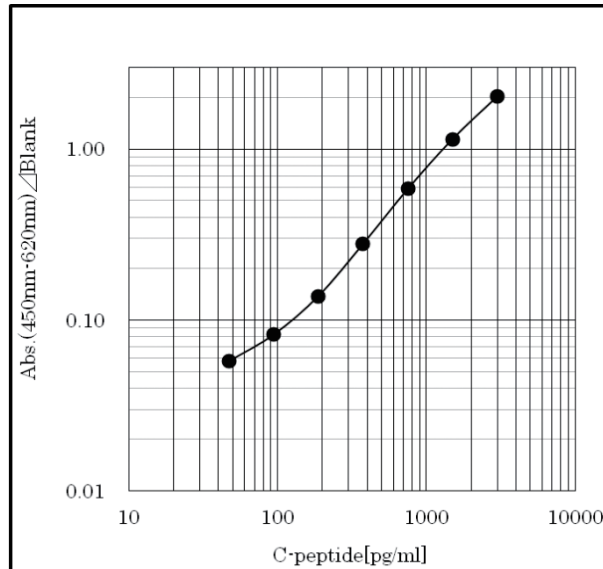
11. Technical Tips

- In manual operation, proficiency in pipetting technique is recommended.
- The reagents are prepared to give accurate results only when used in combination within the same box. Therefore, do not combine the reagents from kits with different lot numbers. Even if the lot number is the same, it is best not to mix the reagents with those that have been preserved for some period.
- 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.
- 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 the reaction from the pipetting of the reagent to the first well.
- Prepare a standard curve for each assay.
- Dilution of the assay sample must be carried out using the buffer solution 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.

12. Calculations

- (1) Prepare a standard curve by plotting standard concentration on X-axis and absorbance on Y-axis.
- (2) Using the standard curve, read the C-peptide 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 solution.

* We recommend the use of 3rd order regression curve for log-log plot, or 4 or 5 parameters method for log-normal plot in computer calculation.



Mouse C-peptide assay standard curve
Absorbance may change due to assay environment.

13. 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 (D) Biotin-conjugated Antibody Solution, (E) 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 chromogenic substrate reagent soon after taking out from a refrigerator might cause poor coloration owing to low temperature.
- Blank OD was higher than that of the lowest standard concentration (46.9 pg/mL).
Possible explanations : Improper or inadequate washing. (Change washing frequency from 3 times to 4-6 times at the constant stroke after the reaction with Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution.)
- High coefficient of variation (CV)
Possible explanation :
 - 1) Improper or inadequate washing.
 - 2) Improper mixing of standard or samples.
 - 3) Pipetting at irregular intervals.
- Q-1 : Can I divide the plate to use it for the other testing?
A-1 : Yes, cut off the clear seal on the plate with cutter along strip. Put the residual plate, which is still the seal on, in a refrigerator soon.
- Q-2 : I found there contains liquid in 96 well-plate when I opened the box. What is it?
A-2 : When we manufacture 96 well-plate, we insert preservation stabilizer in wells.

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

Standard C-peptide solution dilution example :

Concentration (pg/mL)	3000	1500	750	375	188	93.8	46.9	0
Std. solution (μL)	Orig.sol. 150	150*	150*	150*	150*	150*	150	0
Buffer (μL)	150	150	150	150	150	150	150	150

*One rank higher standard.

- Antibody-coated Plate
- ↓ Washing 3 times (*①)
- Diluted samples (e.g. (C) Buffer 40 μL + sample 10 μL) or Standards 50 μL
- ↓ Shaking (*②), Incubation for 2 hours at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- Dilute (D) Biotin-conjugated Antibody Solution to **1 : 100** with Buffer returned to 20°C - 25°C.
This should be prepared during incubation.
- ↓ Washing 3 times (*①) *⑥
- Biotin-conjugated Antibody Solution 50 μL
- ↓ Shaking (*②), Incubation for 2 hours at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
Dilute (E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to **1 : 100** with Buffer returned to 20°C - 25°C.
- This should be prepared during incubation.
- ↓ Washing 3 times (*①) *⑥
- Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution 50 μL
- ↓ Shaking (*②), Incubation for 30 minutes at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- ↓ Washing 3 times (*①) *⑥
- TMB Solution 50 μL
(After dispense, 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 dispense, the color turns to yellow depending on the concentration.)
- ↓ Shaking (*②) Immediately shake.
- Measurement of absorbance (450 nm Ref 620 nm (*④)) immediately.
(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 back ground tends to be high. If so, change washing frequency from 3 times to 4 - 6 times at the constant stroke after the reaction with Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution. Standard of plate-washing pressure : 5 mL/min - 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.

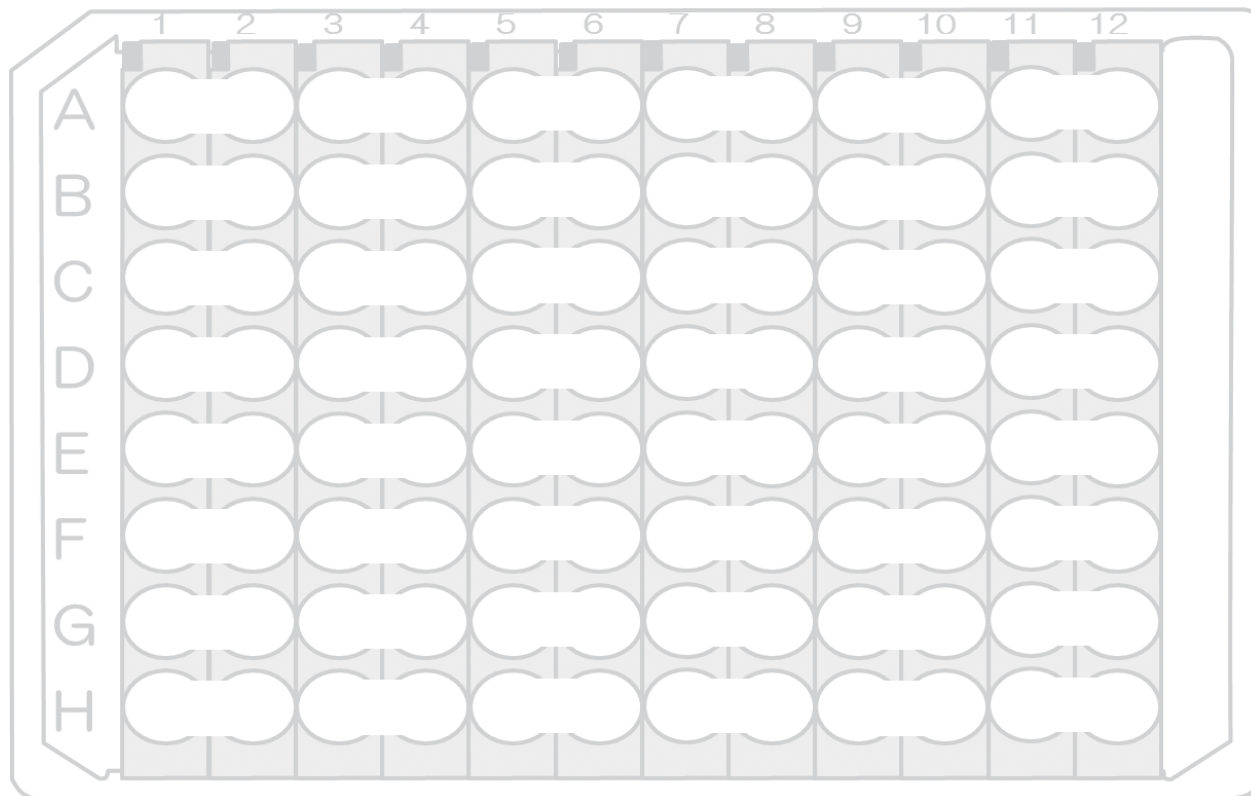
*④ 600 nm - 650 nm can be used as reference wavelength.

*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	3000 pg/mL	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
B	1500 pg/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
C	750 pg/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
D	375 pg/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
E	188 pg/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
F	93.8 pg/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
G	46.9 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



15. Storage and Expiration

The complete kit is stored at 2°C - 10°C. Opened reagents should be used as soon as possible to avoid loss in optimal assay performance caused by storage environment.

LBIS™ Mouse C-peptide ELISA Kit

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

[Expiration date] Indicated on the label.

[Package] For 96 tests

[Cat #] 299-90901

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

Fuggenstrasse 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 C-ペプチド ELISA キット

1. イントロダクション

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。インスリン部分のアミノ酸配列はマウス、ラット共通ですが、C-ペプチドの部分は多少違います。マウスC-ペプチド1はアミノ酸29個、2は31個の単鎖ペプチドです。C-ペプチドはプロインスリンから分離したあと、インスリンとともに分泌されます。

C-ペプチドは長い間生理作用がなく、インスリン生合成の過程においてA鎖とB鎖が正しい形で折りたたまれ、正しい組み合わせのS-S結合ができるようにする作用のほかには生理作用は特に無いと考えられていましたが、近年の研究の積み重ねにより様々な生理作用のあることが明らかになってきました。まずC-ペプチドは 10^{-9} M程度で内皮細胞、腎尿細管細胞や繊維芽細胞の表面の恐らくGタンパクにカップルした受容体に結合し、カルシウムイオン依存性の細胞内シグナルを活性化すること、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ を活性化し、内皮細胞のNO合成を促進すること、受容体との結合には立体的特異性があり、インスリン、プロインスリン、IGF-I、-II、NPYとの交差性がないことが示されています。またC-ペプチドを欠いているI型糖尿病患者にC-ペプチドを投与することにより、骨格筋と皮膚の血流が増強され、腎糸球体のhyperfiltrationを低下させ、尿中へのアルブミンの排泄を抑制し、神経機能を改善するが健常人には作用が現われないことが示されています。このことからI型糖尿病患者にはインスリンのみでなくC-ペプチドの同時投与が合併症の阻止に有用であることが示唆されます。

C-ペプチドのC末端部のペンタペプチド(27-31)が受容体との結合に重要で、この部分の欠如したDes(27-31)C-ペプチドはその作用を失うとされています。このペンタペプチドはC-ペプチドと受容体との結合を完全にreplaceすることができ、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ を活性化します。Des(27-31)C-ペプチドの存在量は新生仔ラットではC-ペプチドの約37%、成熟ラットでは8.5%を占めるという報告があります。C-ペプチドの血中における寿命はインスリンよりも数倍長いという特徴を持ちます。そこで、C-ペプチドの血中レベル測定は臨床的にはインスリン合成、分泌機能を観察するのに用いられます。また尿中に多量に排泄され、血中のレベルとよく相関することから、尿を検体として測定することもできます。また、インビトロで培養されたランゲルハンス島(膵島)からのインスリン分泌の指標としてC-ペプチド測定は有用です。なぜなら、培養液にはインスリンが添加されることが多いので、培養後培養液中のインスリンを測定すると、分泌されたインスリンと添加されたインスリンの区別がつかなくなってしまう、培養開始時の量を差し引かなければなりません。その場合、分泌されたインスリン量が少ないと測定誤差の影響が大きくなり正確な判定ができなくなります。この時、C-ペプチドを測定してやれば、インスリンと等モルで分泌されますから、分泌されたインスリンを正確に判定できるというわけです。

当社のキットはC-ペプチド1、2の共通部分を認識しますので、トータルのC-ペプチドが測定されます。

本キットはマウスC-ペプチド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5時間です。
- ・マウス血清または血漿中のC-ペプチドを測定します。
- ・微量な検体(標準操作法は $10\mu\text{L}$)で測定可能です。
- ・1キットは96ウェルです。
- ・全ての試薬は溶液タイプです。

2. 測定原理

本キットは標準品、希釈検体が抗C-ペプチド抗体固相化プレートウェル中でインキュベートされます。2時間のインキュベーションと洗浄後、ビオチン結合抗C-ペプチド抗体を加え捕捉されたC-ペプチドとともに2時間インキュベートします。洗浄後、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物を加え、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C-ペプチド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
46.9pg/mL ~ 3000pg/mLの範囲で測定できます
(5倍希釈時の実効測定範囲は234.5pg/mL ~ 15000pg/mL)。
- ・特異性

このELISA系で使用されている抗体はマウスC-ペプチドに対して特異的です。関連物質を本キットで測定しました。マウスC-ペプチド1、2を100%としますと、ラットC-ペプチドとは89%、ヒトC-ペプチドとは85%ですが、マウスインスリン、プロインスリンと反応しません(3000pg/mL時において)。

- ・精度試験（アッセイ内変動）（8重測定、2検体） 平均C.V.値は10%未満
- ・再現性試験（アッセイ間変動）（4重測定、3検体、4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C-ペプチドを添加し測定した結果、回収率は94.0%から104%
- ・希釈直線性
2血清検体を連続的に緩衝液で3段階希釈し測定した結果、直線回帰の R^2 は1

4. ご使用前にご確認頂きたい技術上のヒント及び注意事項

- ・ELISA法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温：20℃～25℃（実験台上またはインキュベータ内温度）を厳守して下さい。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勧めします。
- ・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。

5. 構成成分 C-ペプチド標準品

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) C-peptide Standard C-ペプチド標準品	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	100 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	100 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
Plate seal プレートシール	-	4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）の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℃～10℃で保存して下さい。

(B) C-ペプチド標準品（6000pg/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。

6. 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10μL～50μLを正確にピペッティングできるもの、及び100μL～300μL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

7. 検体の調製

本キットはマウス血清または血漿中のC-ペプチドを測定します。

- ・検体は定法にしたがって採取しすぐに測定するか、-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。
- ・pHが6.5～7.5の範囲であることを確認して下さい。
- ・採血時の麻酔は測定値に影響を与える場合がありますのでご注意下さい。エーテルは使用しないで下さい。
- ・採血の際にヒト用の採血管をご使用になるのは避けて下さい。血清分離促進剤等の添加剤が測定系に影響を与える可能性があります。
- ・溶血した検体や高脂質検体は異常値の発生原因となりますので避けて下さい。
※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（乳び）・溶血が高い場合は異常値発生の原因となる場合がありますので測定に使用しないで下さい。本キットの場合、溶血は80mg/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。
- ・検体の希釈（本測定法では5倍）は、あらかじめ試験管等で行い測定ウェルに分注しても構いません。

【検体の安定性と保存方法】

検体を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。また、検体の希釈は用時調製として下さい。

8. 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）。
- *5.で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で調製して下さい。
- *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) C-ペプチド標準品 (6000pg/mL)；標準曲線作成用

(B) C-ペプチド標準品 (6000pg/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。

標準溶液の容量	(C) 緩衝液	濃度 (pg/mL)
標準溶液原液 150 μ L	150 μ L	3000
3000pg/mL 溶液 150 μ L	150 μ L	1500
1500pg/mL 溶液 150 μ L	150 μ L	750
750pg/mL 溶液 150 μ L	150 μ L	375
375pg/mL 溶液 150 μ L	150 μ L	188
188pg/mL 溶液 150 μ L	150 μ L	93.8
93.8pg/mL 溶液 150 μ L	150 μ L	46.9
0 (Blank)	150 μ L	0

(D) ビオチン結合抗体溶液

100 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 **100 倍** に希釈して下さい。

(E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

100 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 **100 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)

9. 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、プレートが十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、3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) 検体測定ウェルに緩衝液を 40 μ L ずつ分注し、さらに検体を 10 μ L 添加します。
 - (3) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 50 μ L ずつ分注します。
 - (4) マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌 (*②) します。
 - (5) プレートシールを貼り (*③)、室温 (20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) で 2 時間静置します。
 - (6) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし、3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。
 - (7) 各ウェルに (D) ビオチン結合抗体溶液を 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。
 - (8) プレートシールを貼り (*③)、室温 (20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) で 2 時間静置します。
 - (9) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし 3 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。
 - (10) 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。
 - (11) プレートシールを貼り (*③)、室温 (20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) で 30 分間静置します。
 - (12) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし 3 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。
 - (13) 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。
 - (14) プレートシールを貼り (*③)、室温 (20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) で 30 分間静置します。
 - (15) 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。
 - (16) 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、12. 測定手順概要とチェックリストをご参照下さい。

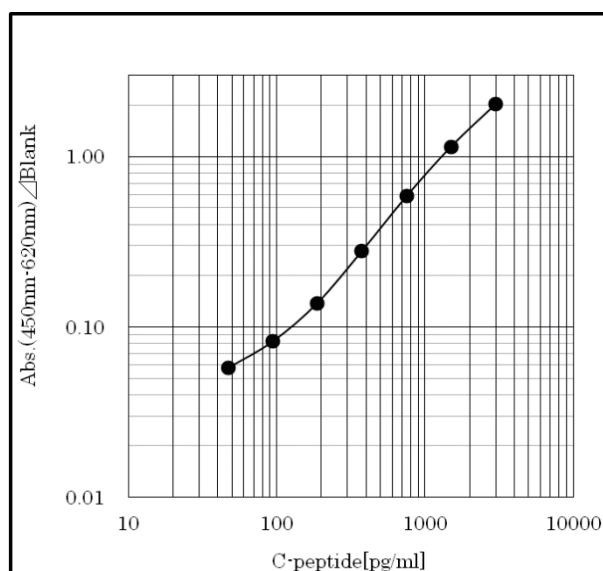
10. 計算

- (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。読み取った濃度に検体希釈率 (標準操作法では 5 倍) を乗じ測定値とします。

* 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。

下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

11. トラブルシューティングと Q&A

- すべてのウェルでの反応が弱い
原因として考えられること
 - 1) 標準品や検体の入れ忘れ。
 - 2) 発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（46.9pg/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
洗浄が不適當、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3回を同じ流速で4回～6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) 洗浄が不適當、不完全であった。
 - 2) 標準品や管理血清、または検体の攪拌が不充分であった（凍結検体の攪拌は充分に行ってください）。
 - 3) ピペッ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。

12. 測定手順概要とチェックリスト

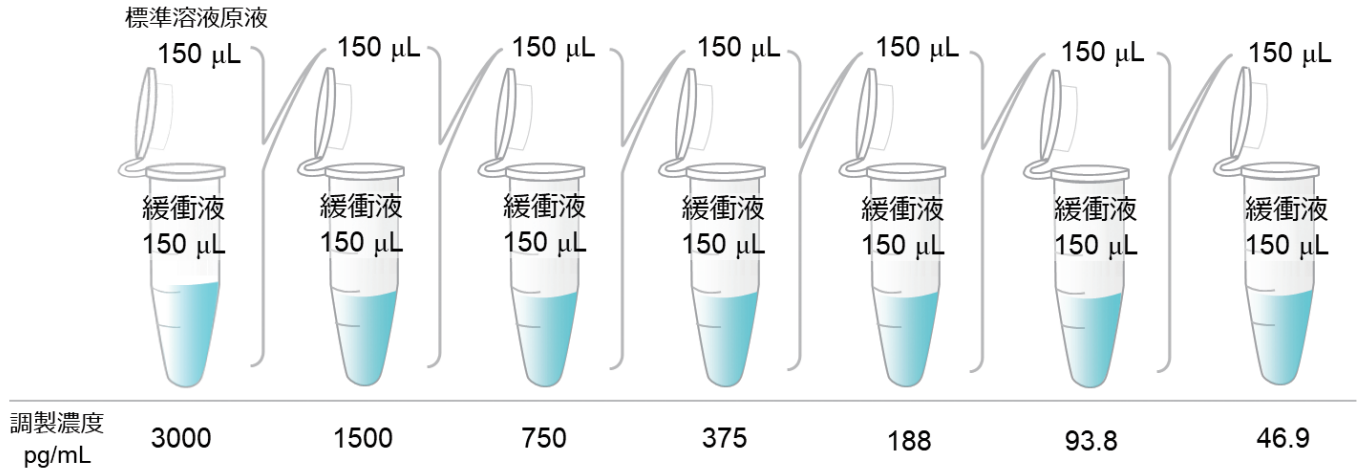
必ず取扱説明書を一読して検体条件、測定条件、測定方法を確認後測定操作を行って下さい。

抗体固相化プレート、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

洗浄液の希釈：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）：室温化された緩衝液で、希釈して下さい。



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 3 回（洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注） *①
- 希釈検体（例えば緩衝液 40 µL と検体 10 µL）または標準溶液 50 µL
- ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、2 時間反応、静置 *②*③
- (D) ビオチン結合抗体溶液の希釈。室温化された緩衝液で **100 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 3 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 50 µL
- ↓ 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。
室温化された緩衝液で、**100 倍** に希釈して下さい。希釈溶液の調製は第二反応中に行う。
- ↓ 洗浄 3 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 µL
- ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、30 分間反応、静置 *②*③
- ↓ 洗浄 3 回（洗浄液除去後、直ちに TMB 溶液分注） *①
- TMB 溶液 50 µL
分注後、濃度により青色に変色 **TMB が室温化されていることを確認**
- ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、30 分間反応、静置 *②*③
- 反応停止液 50 µL
分注後、濃度により黄褐色に変色 **強酸性につき取扱注意**
- ↓ 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。3 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後の乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300 µL / ウェルです。万一、最小標準溶液濃度（46.9pg/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 3 回を同じ流速で 4 回～6 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。

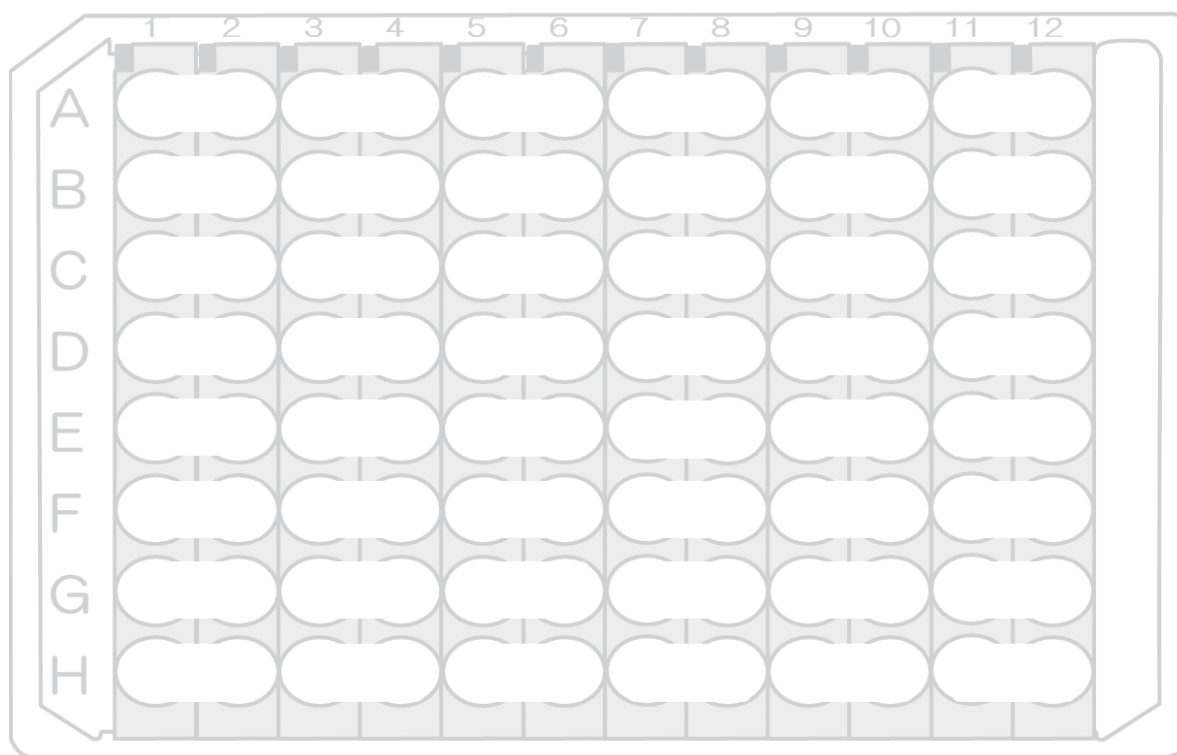
(*②) 攪拌の目安は 600rpm ~ 1200rpm-10 秒間、3 回。

(*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	3000pg/mL	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	1500pg/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	750pg/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	375pg/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	188pg/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	93.8pg/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	46.9pg/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



13. 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™ マウス C-ペプチド ELISA キット

【和光コード】 299-90901

【英語表記】 LBIS™ Mouse C-peptide ELISA Kit

【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