

Mouse/Rat Total Insulin CLEIA Kit - IBL

96 Well

ご使用の際はこの添付文書をよく読んでから使用してください。

全般的な注意

本キットは、研究用試薬です。診断等に用いることはできません。

形状 構造等 (キットの構成)

1-1 ストレプトアビジンプレート (Streptavidin 固相)	96Well x 1
1-2 Biotin 化抗体 (Anti-Insulin 26B2m Mouse IgG A.P.)	6mL x 1
2 標識抗体濃縮液 (50 倍濃度) (ALP 標識 Anti-Insulin13G4m Mouse IgG Fab' A.P.)	0.15mL x 1
3 標準物質 (Recombinant Human Insulin)	1mL x 1
4 希釈用緩衝液	30mL x 1
5 抗体用溶解液	30mL x 1
6 濃縮洗浄液	100mL x 1
7 化学発光基質液	6mL x 1
8 プレートシール	x 1

測定対象

マウスの血清およびEDTA 血漿
ラットの血清およびEDTA 血漿

測定原理

本製品は、サンドイッチ法によるCLEIA (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay)キットです。Streptavidin が固相されたプレートにBiotin化抗体を加え補足抗体を固定化します。洗浄後検体および標準物質を加え1次反応をおこない、その後、アルカリフォスファターゼ標識された抗体を加え2次反応をおこないます。反応後過剰の2 次抗体を洗浄除去した後、発光基質により発光させ、化学発光強度を測定します。

操作上の注意

- 1 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。
- 2 検体は希釈用緩衝液で希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定することをおすすめします。
- 4 測定に当たってはその都度検量線を作成してください。
- 5 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 6 試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し変化のないことを確かめてください。
- 7 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 8 洗浄操作を規定回数おこなった後に、プレートをペーパータオルの上でたたいて、完全に水分を切ってください。この時ペーパータオルがウェルの中に入らないよう注意してください。
- 9 使用しないウェルはプレートシールで保護して操作してください。未使用ウェルは後日使用することができます。
- 10 化学発光強度測定は基質液添加後 20~30 分の間におこなってください。

用法および用量 (操作方法)

- 1 **必要な器具 器材**

化学発光プレートリーダー	マイクロピペットおよびチップ
希釈用テストチューブ	メスシリンダーおよびビーカー
精製水	冷蔵庫
ペーパータオル	採取用容器 (清潔な試験管など)
プレートシェーカー	
- 2 **準備**
 - (1) 濃縮洗浄液の希釈方法
濃縮洗浄液を精製水で20倍希釈してください。これを洗浄液とします。必要量を調整してください。
 - (2) Biotin 化抗体の希釈方法
Biotin 化抗体バイアル瓶に抗体用溶解液を6mL 加えて完全に溶解します。これを Biotin 化抗体溶液とします。Biotin 化抗体溶液は凍結保存することができます。凍結融解の繰り返しはできません。
 - (3) 標識抗体濃縮液の希釈方法
標識抗体濃縮液を別に用意した採取用容器にて、抗体用溶解液で50倍希釈してください。これを標識抗体とします。
 - (4) 標準物質の希釈方法
標準物質バイアル瓶に精製水を1.0mL 加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は30,000 pg/mL となります。

希釈用テストチューブに希釈用緩衝液 200μL と 30,000 pg/mL の標準物質溶液を 100μL 加え混和し 10,000 pg/mL に調整します。その溶液を順次3倍連続希釈をおこない 30,000 pg/mL~41.15 pg/mL まで7点を希釈標準品とします。標準物質は溶解後-20°C以下の冷蔵庫で保存できます。凍結融解の繰り返しはできません。

バイアル瓶	30,000	pg/mL	(5,025 pmol/L)
Tube-1	10,000	pg/mL	(1,675 pmol/L)
Tube-2	3,333.33	pg/mL	(558 pmol/L)
Tube-3	1,111.11	pg/mL	(186 pmol/L)
Tube-5	370.37	pg/mL	(62 pmol/L)
Tube-5	123.46	pg/mL	(21 pmol/L)
Tube-6	41.15	pg/mL	(7 pmol/L)

3 測定操作方法 (測定操作一覧 参照)

- (1) Biotin 化抗体溶液の添加
Biotin 化抗体溶液 50 μL をそれぞれのウェルに入れます。
 - (2) プレートカバーをして固定化反応
 - (3) 洗浄 (操作上の注意 8 参照)
ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。
 - (4) 希釈用緩衝液の添加(※)
全てのウェルに希釈用緩衝液 45μL を添加します。
 - (5) 検体、希釈標準品の添加(※)
検体 5μL および希釈標準品各 5μL をそれぞれのウェルに入れ、プレートシェーカーで3分程度振盪させます。
- ※プレートシェーカーを使用しない場合、希釈標準品、検体ともにあらかじめ希釈用緩衝液で10倍希釈したもの50μLをウェルに添加してください。
- (6) プレートカバーをして第1反応
 - (7) 洗浄 (操作上の注意 8 参照)
ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。
 - (8) 標識抗体の添加
標識抗体を50μL 添加します。
 - (9) プレートカバーをして第2反応
 - (10) 洗浄 (操作上の注意 8 参照)
ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。
 - (11) 基質液の添加
基質液を50μL 添加します。
 - (12) 遮光して発光反応
 - (13) 化学発光強度測定

測定操作一覧

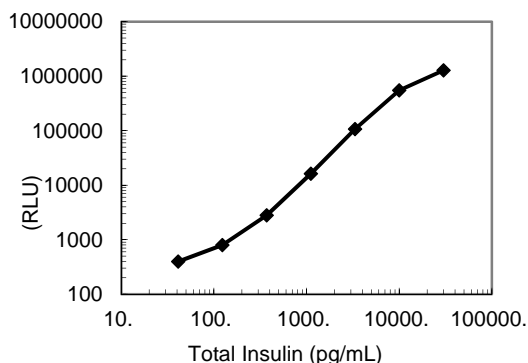
	検体	標準
Biotin 化抗体	50μL	
固相	室温 60分間以上反応	
洗浄	4回 (洗浄液 350μL 以上) (操作上の注意 8 参照)	
希釈用緩衝液	45μL	
試料	検体 5μL	希釈標準品 5μL
第1反応	プレートカバーをしてプレートシェーカーで3分程度振盪後、2-8°C一晩反応。	
洗浄	5回 (洗浄液 350μL 以上) (操作上の注意 8 参照)	
標識抗体	50μL	
第2反応	室温 120分間反応	
洗浄	5回 (洗浄液 350μL 以上) (操作上の注意 8 参照)	
基質液	50μL	
発光反応	遮光常温 20分間反応	
測定	化学発光強度(RLU)	

測定結果の算出方法

- 1 グラフのX 軸に標準物質濃度を、Y 軸にその発光強度をプロットします。各プロットに適当な回帰曲線を当てはめ(解析ソフトを用いる場合はSpline Curveを推奨します)、検量線を作成します。
- 2 検体の発光強度を検量線に当てはめ、濃度を読みとります。示される値が検体中濃度となります。

測定値と検量線作成例

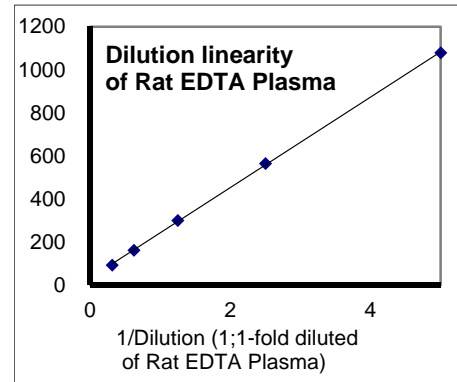
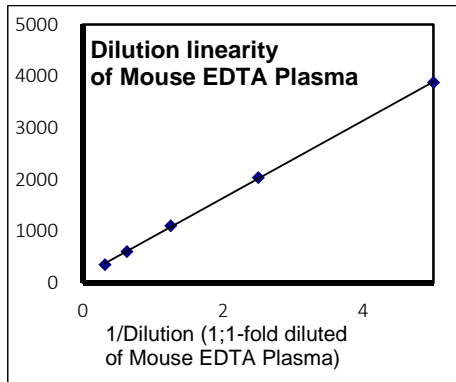
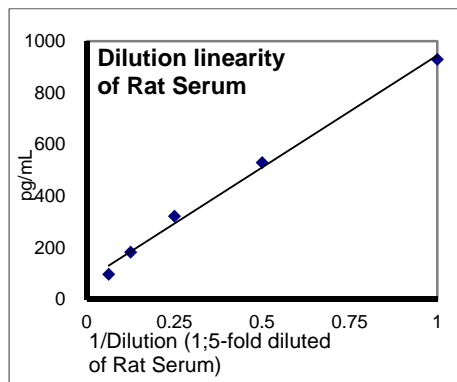
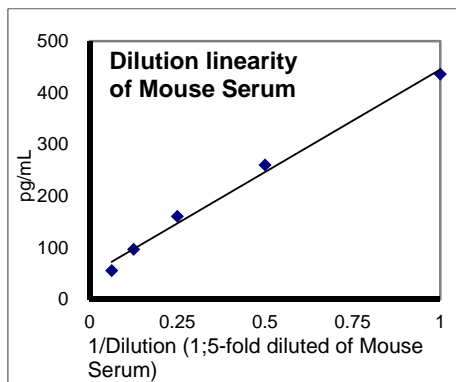
標準品濃度 (pg/mL)	化学発光強度
30000.	1,280,182
10000.	549,100
3333.33	107,316
1111.11	16,205
370.37	2,793
123.46	797
41.15	396
0	286



※使用機器 : Synergy HTX (Bio Tek instruments)

性能
1 測定範囲

41.15 ~ 30,000 pg/mL (7 ~ 5,025 pmol/L)

2 希釈直線性

3 添加回収

検体	添加量 (pg/mL)	理論値 (pg/mL)	測定値 (pg/mL)	%
Mouse Serum	15000.	15446.62	13614.58	88.1
	5000.	5446.62	4643.08	85.2
	1666.67	2113.28	1761.46	83.4
Rat Serum	15000.	17038.98	16460.82	96.6
	5000.	7038.98	6006.41	85.3
	1666.67	3705.65	3492.06	94.2
Mouse EDTA-Plasma	10000.	11108.48	11802.92	106.3
	3333.33	4441.81	4125.73	92.9
	1111.11	2219.59	2011.43	90.6
Rat EDTA-Plasma	10000.	10688.04	11139.53	104.2
	3333.33	4021.37	3599.36	89.5
	1111.11	1799.15	1441.83	80.1

4 同時再現性

測定値(pg/mL)	SD(pg/mL)	CV (%)	n
5979.09	154.87	2.6	24
669.30	14.12	2.1	24
57.75	7.47	12.9	24

5 測定間再現性

測定値(pg/mL)	SD(pg/mL)	CV (%)	n
5734.27	301.73	5.3	6
655.45	31.87	4.9	6
69.79	6.69	9.6	6

6 妨害物質の影響

溶血ヘモグロビン 200mg/dL
 遊離ビリルビン 200mg/dL
 抱合型ビリルビン 240mg/dL
 乳ビ 14100 (ホルマジン濁度) まで測定値に影響ありません。

使用上または取り扱い上の注意
1 取り扱い上(危険防止)の注意

- (1) 構成試薬には動物血液成分を含む物があります。取り扱いに注意し使用後は手洗いなどをおこなってください。

2 使用上の注意

- (1) 標準物質は、凍結乾燥品です。開封は、十分注意しゆっくりとおこなってください。
- (2) 保存は、2~8℃としてください。
- (3) 希釈用緩衝液および濃縮洗浄液は、まれに析出を認める場合がありますが、性能に問題はありません。
- (4) ロットが異なる製品の構成試薬や他のキットの構成試薬を混ぜたり、交換したりして使用しないでください。
- (5) 期限切れの試薬は、使用しないでください。

3 廃棄上の注意

使用後の抗体プレートや試薬は多量の水で洗い流してから廃棄してください。

貯蔵方法 有効期間

2~8℃ 保存
 使用期限は外箱に記載

包装単位および製品番号

96 Well
 製品番号 27707

問合せ先

株式会社 免疫生物研究所
 〒375-0005 群馬県藤岡市中 1091-1
 電話 : 0274-22-2889
 FAX : 0274-23-6055