

[LBIS Dog Insulin ELISA Kit]

Cat # 633-01451

Please, read this instruction carefully before use.

This kit is manufactured by FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation. Use only the current version of Instruction Manual enclosed with the kit!

1. Intended use

LBIS Dog Insulin ELISA Kit is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of dog insulin. This kit is intended for research use only.

2. Storage and expiration

When the complete kit is stored at 2 °C - 8 °C (Do not freeze), the kit is stable until the expiration date shown on the label on the container. Opened reagents should be used as soon as possible to avoid loss in optimal assay performance caused by storage environment.

3. 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 animals.

4. Assay principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS Dog Insulin ELISA Kit, 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 chromogen (TMB) 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.

5. 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.

LBIS Dog Insulin ELISA Kit

- Use clean laboratory glassware.
- Avoid contact with the acidic stop solution and chromogen (TMB) 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.
- 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.
- The materials must not be pipetted by mouth.
- 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	State	Amount
(A) Anti-Insulin coated plate	Use after washing	96 wells/1 plate
(B) Standard Dog Insulin solution (240 ng/mL)	Concentrated. Use after dilution	25 µL/1 vial
(C) Buffer solution	Ready for use.	60 mL/1 bottle
(D) Biotinylated anti-insulin antibody	Concentrated. Use after dilution.	10 µL/1 vial
(E) HRP-conjugated streptavidin	Concentrated. Use after dilution.	20 µL/1 vial
(F) Chromogen (TMB)	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(H) Stop solution Be careful!	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(I) Wash stock solution (10×)	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle
Plate seal	—	3 sheets
Instruction Manual	—	1 copy

7. Equipments and 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 stock solution (10×) (a graduated cylinder, a bottle).
- Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 10 µL precisely, and another for 100 µL - 200 µL. Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipette plus which can dispense 100 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 wash bottle with a jet nozzle. A 96 well-plate reader (450 nm ±10 nm, 620 nm: 600 nm - 650 nm) Software for data analysis.

8. 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) Standard Dog Insulin solution (240 ng/mL)]

Make a serial dilution of master standard (240 ng/mL) solution to prepare each standard solution.

*Unit reduction for $\mu\text{IU/mL}$ is 26 IU/mg. (Refer to 3. Introduction.)

Volume of standard solution	(C) Buffer solution	Concentration (ng/mL)	Concentration ($\mu\text{IU/mL}$)
Original solution: 10 μL	190 μL	12	312
12 ng/mL solution: 100 μL	100 μL	6.0	156
6.0 ng/mL solution: 100 μL	100 μL	3.0	78
3.0 ng/mL solution: 100 μL	100 μL	1.5	39
1.5 ng/mL solution: 100 μL	100 μL	0.75	19.5
0.75 ng/mL solution: 100 μL	100 μL	0.375	9.75
0.375 ng/mL solution: 100 μL	100 μL	0.188	4.88
0 (Blank)	100 μL	0	0

[(D) Biotinylated anti-insulin antibody]

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

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

[(E) HRP-conjugated streptavidin]

Prepare working solution by dilution of (E) with the (C) Buffer solution to **1:2000**.

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

[(I) Wash stock solution (10 \times)]

Dilute 1 volume of the concentrated Wash stock solution (10 \times) to **10 volume** with deionized water (or distilled water) to prepare working solution. Example: 100 mL of concentrated washing buffer (10 \times) and 900 mL of deionized water (or distilled water).

【Storage and stability】

[(A) Anti-Insulin 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 - 8 °C. The strip will be stable until expiration date.

[(B) Standard Dog Insulin solution (240 ng/mL)]

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

[(C) Buffer solution] & [(F) Chromogen (TMB)]

If not opened, store at 2 °C - 8 °C. It maintains stability until expiration date. Once opened, we recommend using them as soon as possible to avoid influence by environmental condition.

[(D) Biotinylated anti-insulin antibody] & [(E) HRP-conjugated streptavidin]

Unused working solution (already diluted) should be disposed.

[(H) Stop solution]

Close the stopper tightly and store at 2 °C - 8 °C. It maintains stability until expiration date.

[(I) Wash stock solution (10 \times)]

The rest of undiluted buffer: if stored tightly closed at 2 °C - 8 °C, it is stable until expiration date.

Dispose any unused diluted buffer.

9. 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 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.
- Optimally, the reagent solutions of the kit should be used immediately after reconstitution. Otherwise, store them in a dark place at 2 °C - 8 °C.
- Time the reaction from the pipetting of the reagent to the first well.
- Dilution of the assay sample must be carried out using the buffer solution provided in the kit.
- The chromogen (TMB) should be almost clear pale blue 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 %,
 - Do not use the kit.

LBIS Dog Insulin ELISA Kit

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.

10. Preparation of samples

This kit is intended to measure insulin in dog serum, plasma (preferably obtained with heparin), culture medium and tissue/cell extracts. The necessary sample volume for the standard procedure is 10 μ L. 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 solution 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 in samples will be inactivated if stored at $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$. If it is necessary to store sample in refrigerator ($2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$), 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.

11. Assay procedure

Remove the cover sheet of the anti-Insulin-coated plate after bringing back to room temperature.

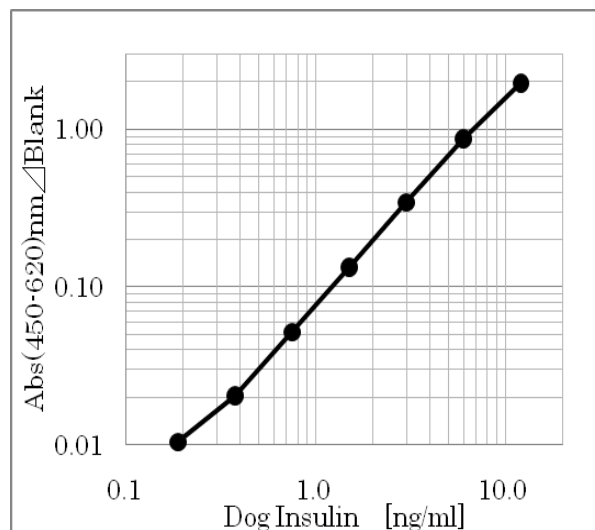
- (1) Wash the anti-Insulin-coated plate (A) by filling the wells with 300 μ L of washing buffer and discard 4 times (*②), then strike the plate upside-down onto several layers of paper towels to remove residual buffer remaining in the wells.
- (2) Pipette 100 μ L of biotinylated anti-insulin antibody to all wells. Shake the plate gently on a plate shaker(*③).
- (3) Pipette 10 μ L of sample to the wells designated for samples.
- (4) Pipette 10 μ L of standard solution to the wells designated for standards.
- (5) Shake the plate gently on a plate shaker (*③).
- (6) Stick a plate seal (*④) on the plate and incubate for 2 hours at $20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$.
- (7) Discard the reaction mixture, and then wash the plate as step (1).
- (8) Pipette 100 μ L of HRP-conjugated streptavidin to all wells, and shake as step (5).
- (9) Stick a plate seal (*④) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at $20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$.
- (10) Discard the reaction mixture, and then wash the plate as step (1).
- (11) Pipette 100 μ L of substrate chromogen reagent to wells, and shake as step (5).
- (12) Stick a plate seal (*④) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at $20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$.
- (13) Add 100 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 the page 6-7 for notes of *②, *③ and *④.

12. Calculations

- (1) Prepare a standard curve using semi-logarithmic or two-way logarithmic section paper by plotting absorbance* (Y-axis) against insulin concentration (ng/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 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.



Dog insulin assay standard curve (an example)
Absorbance may change due to assay environment.

* Physiological or pathological situation of animals should be judged comprehensively taking other examination results into consideration.

13. Performance characteristics

● Assay range

The assay range of the kit is 0.188 ng/mL - 12 ng/mL.

● Specificity

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

Substances	Cross-reactivity
Dog Insulin	100 %
Dog C-peptide	—
Mouse insulin	85 %
Rat Insulin	83 %
Human Insulin	155 %

*Cross-reactivity at Conc. 12 ng/mL.

● Precision of assay

Within assay variation (3 samples, 8 replicates assay) Mean CV was within 10 %.

● Reproducibility

Between assay variation (4 samples, 5 days, assayed in duplicates) Mean CV was within 10 %

● Recovery test

Standard insulin was added in 4 concentrations to 2 serum samples and were assayed.

The recoveries were 89.7 % - 104 %

● Dilution test

Two serum samples were serially diluted by 3 points.

The dilution curves showed excellent linearity with $R^2 = 0.9994 - 0.9999$.

14. Reference assay data

Dog insulin assay data

Mean assay value: 617 pg/mL, SD: 186 pg/mL.

Dog strains: Beagle, males, 1w - 6 w, fed at 16:00 - 17:00

Number of animals: 10 Serum samples were collected in the morning.

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

15. 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 biotinylated anti-insulin antibody, HRP-conjugated streptavidin, or chromogen (TMB) might not be added.
- 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of biotinylated anti-insulin antibody or HRP-conjugated streptavidin.
- 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 chromogen (TMB) soon after taking out from a refrigerator might cause poor coloration owing to low temperature.

● The OD of blank is higher than that of the lowest standard concentration (0.188 ng/mL)

Possible explanations:

Improper or inadequate washing. (Change washing repetition from 4 times to 5-8 times after the reaction with HRP-conjugated streptavidin.)

● High coefficient of variation (CV)

Possible explanation:

- 1) Improper or inadequate washing.
- 2) Improper mixing of standard or samples.
- 3) Pipetting at irregular intervals.

LBIS Dog Insulin ELISA Kit

●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.

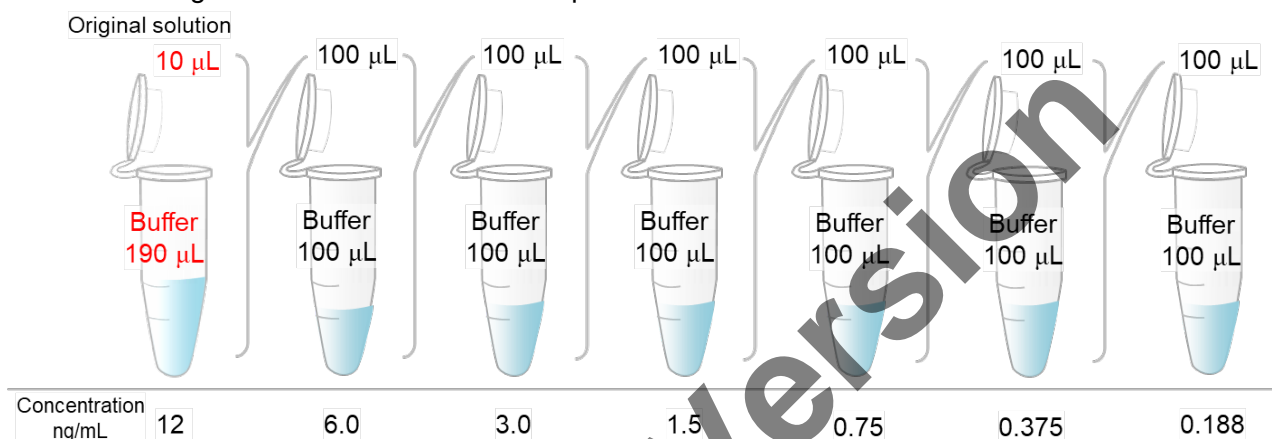
Summary of assay procedure : Use as a check box

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

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

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

Standard Dog Insulin solution dilution example:



Biotinylated anti-insulin antibody(D) : Dilute to **4000 times** by using (C) Buffer solution and use.

Anti-Insulin coated plate

↓Washing 4 times(*②)

Biotinylated anti-insulin antibody

↓Shaking(*③)

Samples/Standards

↓Shaking(*③), Incubation for 2 hours at 20 °C - 25 °C. (Standing(*④))

HRP-conjugated streptavidin(E)

Dilute to **2000 times** by using (C) Buffer solution and use.

(Dilute reagents during the first reaction. 2-step dilution is recommended.)

↓Washing 4 times(*②)

HRP-conjugated streptavidin

↓Shaking(*③), Incubation for 30 minutes at 20 °C - 25 °C . (Standing(*④))

↓Washing 4 times(*②)

Chromogen (TMB)

(After dispense, the color turns to blue depending on the concentration.)

↓Shaking(*③), Incubation for 30 minutes at 20 °C - 25 °C . (Standing(*④))

Stop solution

(After dispense, the color turns to yellow depending on the concentration.)

↓Shaking(*③) (Immediately shake.)

Measurement of absorbance (450 nm, Ref 620 nm) immediately

(Ref. wave cancels the dirt in the back of plate.)

*② 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 4 times to 5-8 times at the constant stroke after the

LBIS Dog Insulin ELISA Kit

reaction with HRP conjugated streptavidin.

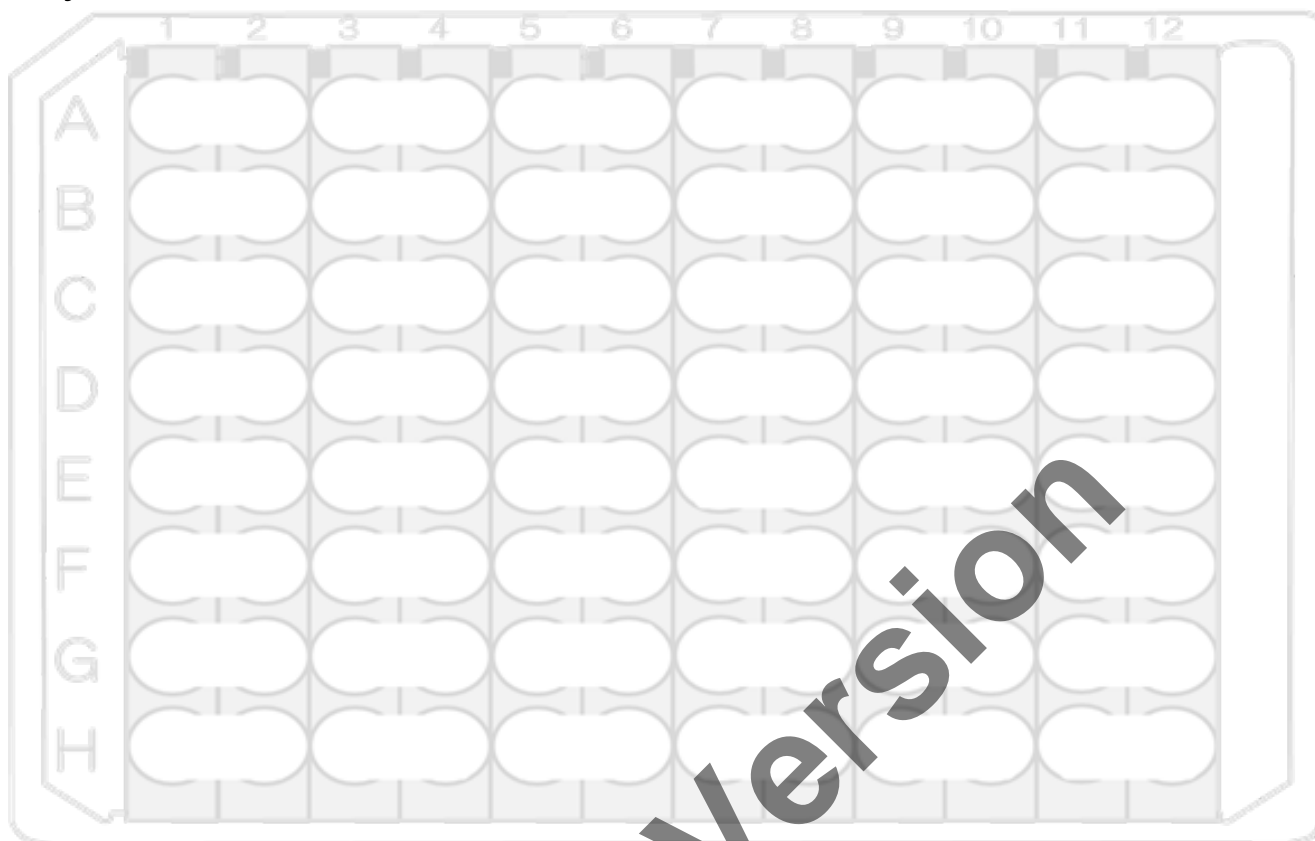
Standard of plate-washing pressure: 5 mL/min - 25 mL/min. (Adjust it depending on the nozzle's diameter.)

- *③ Guideline of shaking: 600 rpm - 1200 rpm for 10 seconds ×3 times.
- *④ 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.
- *⑤ 600 nm - 650 nm can be used as reference wavelength.
- *⑥ 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	12 ng/mL	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
B	6.0 ng/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
C	3.0 ng/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
D	1.5 ng/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
E	0.75 ng/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
F	0.375 ng/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
G	0.188 ng/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



LBIS Dog Insulin ELISA Kit

[Storage condition] Store the kit at 2 °C - 8 °C (Do not freeze).

[Term of validity] Expiration date is indicated on the container.

[Cat #] 633-01451

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

<https://www.fujifilm.com/ffwk/en>

研究用試薬

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書に従って測定を実施してください。本キットを初めてご使用になられる場合は後述の「◆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」をご確認の上ご使用ください。

『 レビス® インスリンキット (イヌ用) 』 取扱説明書

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-B-19 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 (0.038 mg/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。

本キットはイヌ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ください。

◆製品の特長

- 全反応時間は 3 時間です。
- イヌ血清または血漿 (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 10 μ L) で測定可能です。
- 1 キットは 96 ウェルです。
- 標準品はイヌ由来のもので、
- 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インスリン抗体、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・アビジン結合物を加え、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発色液 (TMB) 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 450 nm (副波長 620 nm) 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. キットの保存と使用期限

キットは 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C で保存してください (凍結厳禁)。この保存条件下でキットは外箱のラベルに記載された有効期限内安定です。有効期限の過ぎた試薬は使用しないでください。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。

4. 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 10 μ L を正確にピペッティングできるもの、及び 100 μ L ~ 200 μ L 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)、100 μ L 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 rpm ~ 1200 rpm)
- 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 (450 \pm 10 nm、620 nm : 600 nm ~ 650 nm)
- データ計算用ソフトウェア

5. 構成品

構成品	状態	容量
(A) Anti-Insulin coated plate 抗体固相化 96 ウェルプレート	洗浄後使用	96 wells(8×12)/1 枚
(B) Standard Dog Insulin solution (240 ng/mL) 標準インスリン溶液 (イヌ) (240 ng/mL)	希釈後使用	25 µL/1 本
(C) Buffer solution 緩衝液	そのまま使用	60 mL/1 本
(D) Biotinylated anti-insulin antibody ビオチン結合抗インスリン抗体	希釈後使用	10 µL/1 本
(E) HRP-conjugated streptavidin ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	希釈後使用	20 µL/1 本
(F) Chromogen (TMB) 発色液(TMB)	そのまま使用	12 mL/1 本
(H) Stop solution 反応停止液	Be careful! 取扱注意	そのまま使用 12 mL/1 本
(I) Wash stock solution (10×) 濃縮洗浄液(10×)	希釈後使用	100 mL/1 本
Plate seal プレートシール		3 枚
Instruction Manual 取扱説明書		1 部

6. 試薬の調製

- * キットの試薬は使用前に必ず室温(20 °C~25 °C)に戻してください (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ください。
- * 測定に必要な分だけ試薬を調製してください (ご不明な際にはお問い合わせください)。

【濃縮された試薬類】

[(B) Standard Dog Insulin solution (240 ng/mL)] ; 標準曲線作成用

(B) Standard Dog Insulin solution (240 ng/mL) (原液) と(C) Buffer solution を使って標準溶液を調製してください。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) Buffer solution	濃度(ng/mL)	濃度(µIU/mL※)
標準溶液原液 10 µL	190 µL	12	312
12 ng/mL 溶液 100 µL	100 µL	6.0	156
6.0 ng/mL 溶液 100 µL	100 µL	3.0	78
3.0 ng/mL 溶液 100 µL	100 µL	1.5	39
1.5 ng/mL 溶液 100 µL	100 µL	0.75	19.5
0.75 ng/mL 溶液 100 µL	100 µL	0.375	9.75
0.375 ng/mL 溶液 100 µL	100 µL	0.188	4.88
0 (Blank)	100 µL	0	0

[(D) Biotinylated anti-insulin antibody]

10 µL を充分分取できる量をご提供しています。

濃縮液を(C) Buffer solution で **4000 倍** に希釈してください (2 段階希釈をお勧めします)。

[(E) HRP-conjugated streptavidin]

20 µL を充分分取できる量をご提供しています。

濃縮液を(C) Buffer solution で **2000 倍** に希釈してください (2 段階希釈をお勧めします)。

[(I) Wash stock solution (10×)]

濃縮洗浄液(10×)を室温化された精製水 (蒸留水) で **10 倍** に希釈してください。

例: 100 mL の濃縮洗浄液(10×)+900 mL の精製水 (蒸留水) (96 ウェル全てを使用する場合)

【試薬の安定性と保存方法】

(A) Anti-Insulin coated plate

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℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(B) Standard Dog Insulin solution (240 ng/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℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないでください。

(C) Buffer solution 及び (F) Chromogen (TMB)

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℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(D) Biotinylated anti-insulin antibody 及び (E) HRP-conjugated streptavidin

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℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄してください。

(H) Stop solution

使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(I) Wash stock solution (10×)

濃縮洗浄液(10×)を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄してください。

7. 検体の調製

本キットはイヌ血清または血漿（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ください。凍結した検体は測定する直前に解凍し十分に攪拌してください。繰り返しの凍結融解は避けてください。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ください。
※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ください。本キットの場合、溶血は 40 mg/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ください。
- 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ください。
- 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ください。

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

8. 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ください。

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ください。

- (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) 各ウェルにビオチン結合抗インスリン抗体を 100 µL 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 10 µL 添加します。
- (4) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 10 µL 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℃～25℃)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) 各ウェルにペルオキシダーゼ・アビジン結合物を 100 µL 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℃～25℃)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) 各ウェルに発色液を 100 µL 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℃～25℃)で 30 分間静置(*③)します。
- (13) 各ウェルに反応停止液を 100 µL 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 450 nm (副波長 620 nm) での吸光度を測定します。副波長は 600 nm~650 nm の範囲で使用できます。

(*①)、(*②)、(*③)測定手順概要 (14、15 ページ) をご参照ください。

9.計算

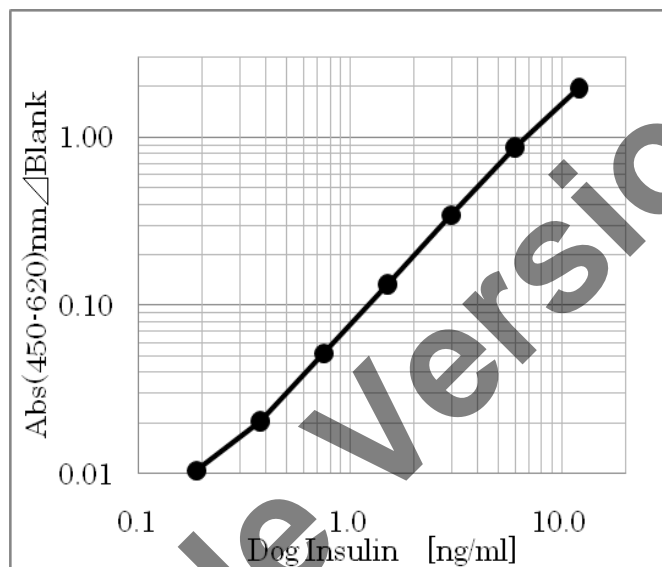
(1)測定毎に標準曲線を作成します。両対数を使用し X 軸を標準溶液濃度(ng/mL)、Y 軸を吸光度の標準曲線グラフを作成してください。

(2)標準曲線より、検体の吸光度に対応する濃度(ng/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) Buffer solution にて適当倍率に調製し再度測定を実施してください。

* 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

10.キットの性能

●測定範囲

イヌインスリンを 0.188 ng/mL~12 ng/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、12 ng/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
イヌ C-ペプチド	-	ラット インスリン	83 %
マウス インスリン	85 %	ヒト インスリン	155 %

●精度試験 (アッセイ内変動) (8 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) (2 重測定、4 検体、5 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 4 濃度のインスリンを添加し測定した結果、回収率は 89.7 %から 104 %

●希釈直線性

3 血清検体を連続的に希釈用緩衝液で 3 段階希釈し測定した結果、直線回帰の R² は 0.9994 から 0.9999

11.参考値

イヌインスリン測定値 : 平均 617 pg/mL、標準偏差 186 pg/mL

亜種 : ビーグル犬、雄、1 歳~8 歳、採血時間 : 午前、給餌 : 16:00~17:00、10 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ください。

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

LBIS Dog Insulin ELISA Kit

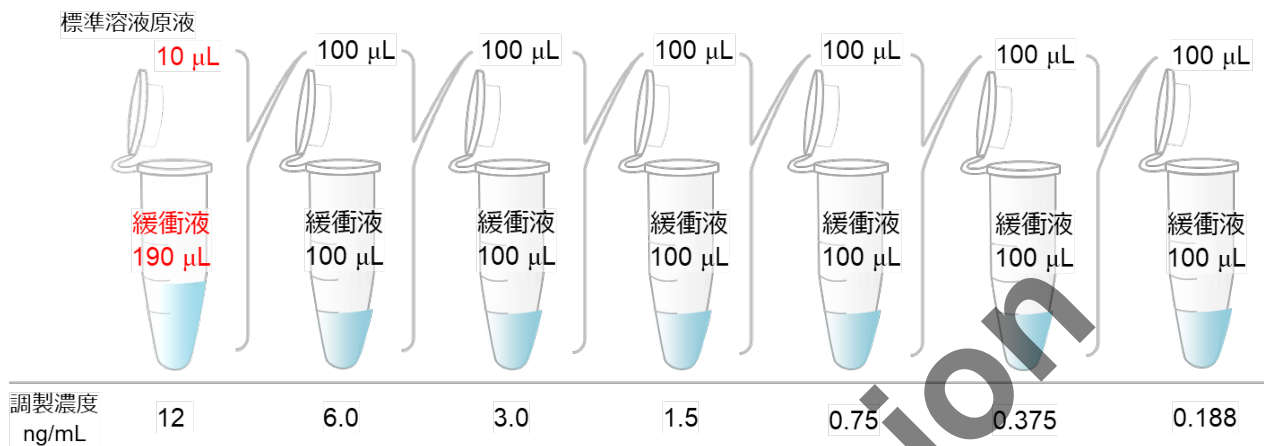
- 1)標準品や検体の入れ忘れ。
 - 2)発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
 - 3)発色に関連する試薬溶液の取り違いや希釈調製不良。
 - 4)ペルオキシダーゼ酵素阻害剤の混入。
 - 5)キット保管温度の影響（凍結した場合）。
 - 6)プレートの過剰な洗浄。
 - 7)発色液の温度が低かった。
- 最小標準溶液濃度(0.188 ng/mL)の OD 値よりブランク OD 値が高くなる
原因として考えられること
洗浄が不適當、不完全であった。
(ペルオキシダーゼ・アビジン結合物と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5 回~8 回に増やしてください。)
 - 変動係数(CV)が大きい
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ください。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ください。
 - 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。

Example Version

【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ください。

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



- ビオチン結合抗インスリン抗体の希釈
室温化された緩衝液で**4000倍**に希釈してください。2段階希釈をお勧めします。

各操作注意事項並びに関連情報

<input type="checkbox"/> 抗体固相化 96 ウェルプレート		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> ビオチン結合抗インスリン抗体	100 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌		* ②
<input type="checkbox"/> 検体 または 標準インスリン溶液	10 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、2時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> ペルオキシダーゼ・アビジン結合物の希釈。室温化された緩衝液で、 2000倍 に希釈してください。希釈溶液の調製は第一反応中に行う。2段階希釈をお勧めします。		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	100 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、30分間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 4 回		* ①
<input type="checkbox"/> 発色液(TMB) 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 100 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、30分間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> 反応停止液 分注後、濃度により黄褐色に変色	強酸性につき取扱注意 100 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌 (直ちに攪拌)		* ②
<input type="checkbox"/> 直ちに吸光度測定 (主波長 450 nm、副波長 620 nm:600 nm～650 nm) 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 µL/ウェルです。万一、最小標準溶液濃度(0.188 ng/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・アビジン結合物と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5 回～8 回に増やしてください。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5 mL/分～25 mL/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ください。

(* ②) 攪拌の目安は 600 rpm～1200 rpm-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ください。

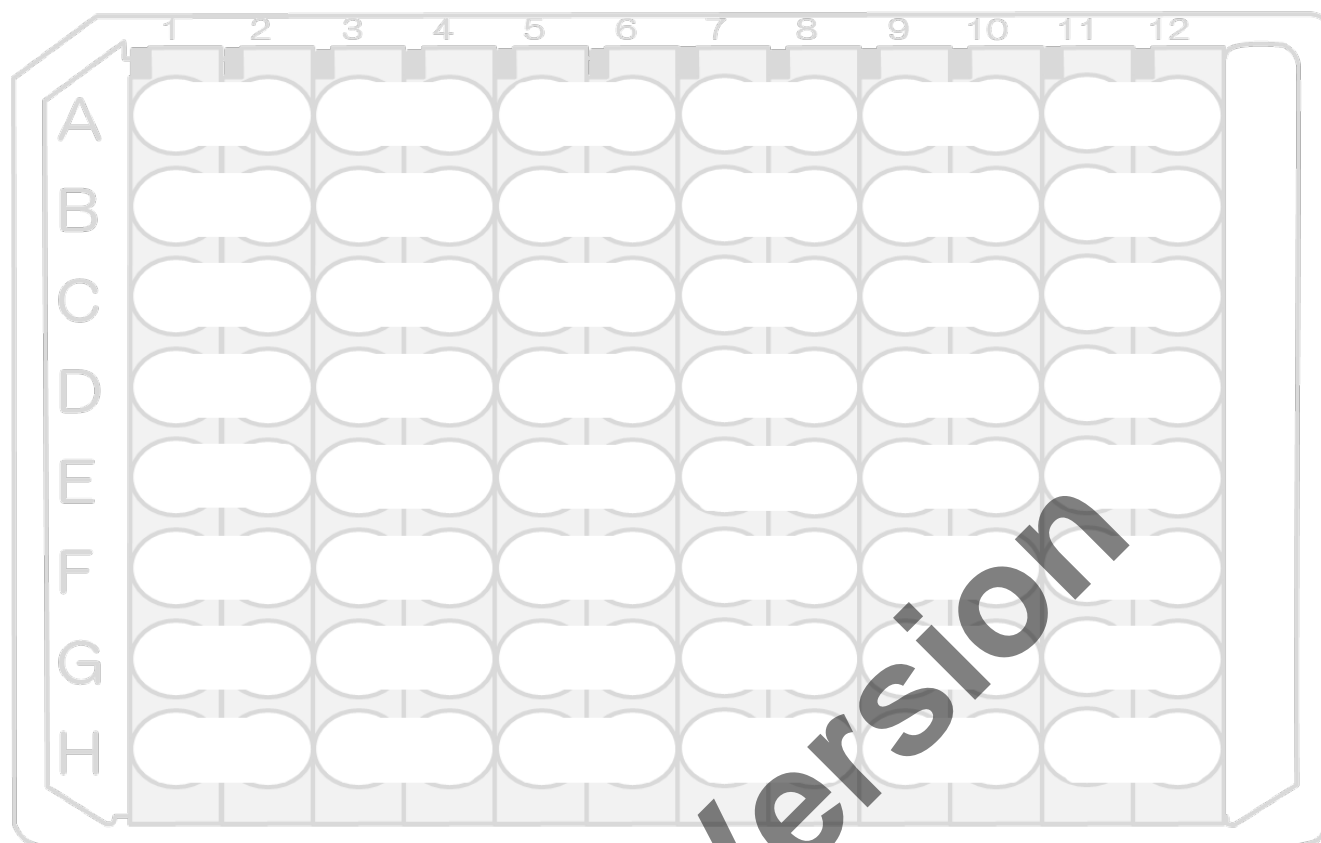
プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けてください。一度使用したプレートシールは再使用しないでください。

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	12 ng/mL	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	6.0 ng/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	3.0 ng/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	1.5 ng/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	0.75 ng/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	0.375 ng/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	0.188 ng/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

◆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 100 KIU/mL~500 KIU/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ください。(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℃~25℃(実験台上またはインキュベータ内温度)を厳守してください。また、風速(エアコンの風も含む): 0.4 m/sec 以上、湿度 30%未満の環境下での測定は避けてください。やむを得ず、測定操作を風速: 0.4 m/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ください。
- 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ください。
- 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ください。
- 検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけてください。1 ウェル/1 チップのご使用をお勧めします。
- 発色液は 96 ウェルプレートに使用するまでは薄い青色澄明です。光を避けて保存してください。
- 反応停止液は使用するまでは無色です。
- 本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の方のご使用ください。的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ください。
- 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ください。
- 試薬類を皮膚に付けないでください。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ください。
- 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ください。
- 試薬類は口でピペッティングしないでください。
- ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないでください。
- 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ください。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%グルター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 時間以上浸けてください。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄してください。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ください。



【測定名】

【所属】

【測定者】

【測定日】

【ロット番号】

【有効期限】

【備考】

【製品名】

レビス® インスリンキット（イヌ用）

【和光コード】

633-01451

【英語表記】

LBIS Dog Insulin ELISA Kit

【お問い合わせ先】

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

Fax : 06-6201-5964

<https://www.fujifilm.com/ffwk/ja>