

FUJIFILM

Wako

For Research Use Only

GLP-1 ELISA Kit *Wako*,
High Sensitive

Code No.299-75501

Please read these instructions carefully before use.

Table of Contents

1. Intended use.....	3
2. Storage and expiration.....	3
3. Principle of the assay.....	3
4. Precautions.....	3
5. Reagents supplied.....	4
6. Equipment or materials required but not supplied.....	4
7. Preparation of reagents.....	4
8. Technical tips.....	6
9. Preparation of samples.....	6
10. Assay procedure.....	6
11. Calculations.....	7
12. Performance characteristics.....	7
13. Troubleshooting.....	8
14. Summary of assay procedures and a check list.....	9
15. Assay worksheet.....	10

1. Intended use

GLP-1 ELISA Kit *Wako*, High Sensitive, is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of mouse/rat GLP-1. For research use only. Not for human or animal therapeutic or diagnostic use.

2. Storage and expiration

Store the kit at 2-10°C (do not freeze). The kit is stable at 2-10°C until the expiration date shown on the label on the box. Once opened, the reagents should be used as soon as possible to avoid lower optimal assay performance caused by storage environment.

3. Principle of the assay

Standards of known GLP-1 content or samples are incubated in monoclonal anti GLP-1 antibody-coated wells to capture GLP-1. After 2 hours incubation, the wells are washed and biotin-labeled anti GLP-1 antibody is added. The wells are incubated further for 1 hour to bind with captured GLP-1. After washing, HRP (horse radish peroxidase)-labeled avidin is added and the wells are incubated for 30 minutes. After washing, HRP-complex remaining in wells is reacted with a chromogenic substrate (TMB). The reaction is stopped by addition of an acidic solution and absorbance of yellow product is measured spectrophotometrically at 450 nm (reference wavelength, 620 nm). The absorbance is proportional to the GLP-1 concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against standard GLP-1 concentrations. GLP-1 concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

4. Precautions

- For professional use only. Beginners are advised to use this kit under the guidance of an experienced person.
- Wear gloves and laboratory coats, and use clean laboratory glassware when handling the assay materials.
- Be careful not to allow the reagent solutions of the kit to touch the skin, eyes and mucus membranes. 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 human or animal origin, be careful for possible biohazards. This kit contains components of animal origin. These materials should be handled as potentially infectious.
- Used samples and 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 autoclaving before disposal. Dispose consumable materials and unused contents in accordance with applicable regional/national regulatory requirements.
- The materials must not be pipetted by mouth.
- Do not mix the reagents from various lots.
- In order to avoid dryness of wells, contamination of foreign substances and evaporation of dispensed reagents during incubation, never forget to cover the well plate with a plate seal supplied.
- ELISA can be easily affected by the laboratory environment. Room temperature should be strictly maintained at 20-25°C. Avoid airstream velocity over 0.4 m/sec including wind from an air conditioner, and humidity less than 30%.

5. Reagents supplied

Code No.	Components	State	Amount
296-75511	Antibody-coated Plate	Use after washing	96 (8×12) wells/1 plate
293-75521	GLP-1 Standard	Lyophilized Use after reconstitution	1 bottle
290-75531	Buffer Solution	Ready for use	60 ml/1 bottle
297-75541	Biotinylated Anti GLP-1 Antibody Solution	Concentrated Use after dilution	100 µl/1 vial
294-75551	Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Concentrated Use after dilution	100 µl/1 vial
291-75561	TMB Solution	Ready for use	12 ml/1 bottle
298-75571	Stop Solution	Ready for use	12 ml/1 bottle
295-75581	Wash Solution (x10)	Concentrated Use after dilution	100 ml/1 bottle
292-75591	Plate Seal	—	4 sheets
-	Instruction Manual	—	1 copy

6. Equipment or materials required but not supplied Use as a check box

- Purified water (distilled water).
- Test tubes for preparation of standard solution series.
- Glassware for dilution of Wash Solution (a graduated cylinder and a bottle)
- Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 50 µl precisely, and another for 100-500 µl.
- Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipipette plus which can dispense 50 µl.
- Paper towel to remove washing buffer remaining in wells.
- A vortex-type mixer.
- A shaker for 96 well-plate (600-1,200 rpm).
- An automatic washer for 96 well-plate (if available), or a washing bottle with a jet nozzle.
- A 96 well-plate reader (450 nm ±10 nm, 620 nm (600-650 nm)).
- Software for data analysis, if available.

7. Preparation of reagents

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

[Concentrated reagents]

●GLP-1 Standard

Reconstitute the standard with the volume of purified water* stated in a separate sheet (GLP-1 standard solution, 300 pM), and then mix with the Buffer in the kit to prepare standard solutions as shown below. *Because the volume of purified water to be added differs depending on the lot, see the specified volume in the annex.

Volume of standard solution	Buffer Solution	Concentration (pM)	Concentration (pg/ml)
GLP-1 standard solution (300 pM); 50 µl	450 µl	30	100
30 pM solution: 120 µl	120 µl	15	50
15 pM solution: 120 µl	120 µl	7.5	25
7.5 pM solution: 120 µl	120 µl	3.75	12.5
3.75 pM solution: 120 µl	120 µl	1.88	6.2
1.88 pM solution: 120 µl	120 µl	0.94	3.1
0 pM (Blank)	120 µl	0.0	0.0

●Biotinylated Anti GLP-1 Antibody Solution

Prepare working solution by dilution of **Biotinylated Anti GLP-1 Antibody Solution** with the **Buffer Solution** to 1:100.

●Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

Prepare working solution by dilution of **Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution** with the **Buffer Solution** to 1:100.

●Wash Solution (x10)

Dilute 1 volume of the **Wash Solution (x10)** to 10 volume with purified water (or deionized water) to prepare washing buffer.

Example: 100 ml of the concentrated Wash Solution (x10) and 900 ml of purified water (or deionized water) in case all wells of a 96-well plate are used.

[Storage and stability]

●Antibody-coated Plate

Put the unused strips with seals back in a plastic bag with zip-seal which is originally used for a well-plate container and store at 2-10°C. The strips will be stable until the expiration date, but note that the reagents in the kit need to be used as soon as possible.

●GLP-1 Standard

When dividing and using the kit, do not return the GLP-1 standard solution(300pM) to room temperature, immediately close the lid tightly and store at 2-10 °C. It remains stable until the expiration date. Please use each diluted standard solution immediately, don't keep it.

●Buffer Solution and TMB Solution

If not opened, store at 2-10 °C. It remains stable until the expiration date. Once opened, use them as soon as possible to avoid influence by environmental conditions.

●Biotinylated Anti GLP-1 Antibody Solution and Peroxidase-conjugated Sreptavidin Solution

The rest Biotinylated Anti GLP-1 Antibody Solution or Peroxidase-conjugated Sreptavidin Solution is stored at 2-10°C in a container with the stopper closed tightly. It remains stable until the expiration date. Residual working solution, which is already diluted, should be disposed.

●Stop Solution (1 N H₂SO₄)

In case the rest of Stop Solution is kept, close the stopper tightly and store at 2-10 °C. It remains

stable until the expiration date.

● Wash Solution (x10)

In case the rest of Wash Solution is kept, close the stopper tightly and store at 2-10°C. It remains stable until the expiration date. Dispose any unused diluted Wash Solution.

8. Technical tips

- Be careful to avoid any contamination of assay samples and reagents. The use of disposal pipette tips, and 1 tip for 1 well are recommended.
- The **TMB Solution** should be almost colorless or clear pale blue before use. Protect it from the light.
- The **Stop Solution** should be almost colorless before use.

9. Preparation of samples

- Samples should be immediately assayed. If assay samples have to be stored for a longer period, snap-freeze the samples and keep them below –35°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Thaw the frozen samples and mix them thoroughly before use. Dilute samples immediately before the assay.
- When a serum separating medium is used, check previously if it works.
- Hemolyzed or hyperlipidemic serum samples are not suitable.
- Turbid samples or those containing insoluble materials should be centrifuged before testing to remove any particular matter.
- If presence of an interfering substance is suspected, examine with a dilution test at more than 2 points.
- Before starting the assay, dilute samples 5x in test tubes (PP or PE). Multiply the assay value by this dilution rate (5x) in calculation.

■ Worksheet example

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	30 pM	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
B	15 pM	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
C	7.5 pM	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
D	3.75 pM	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
E	1.88 pM	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
F	0.94 pM	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
G	0 pM	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39
H	Positive control	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32	Sample 40

10. Assay procedure

- All reagents should be brought to room temperature before use.
 - Allow the 96-well plate to reach room temperature. Remove the cover sheet of the plate.
- (1) Wash the **Antibody-coated Plate** by filling the wells with washing buffer and discard. Repeat the wash and discard steps 3 times (*①), then turn the plate upside-down onto several layers of paper towels to remove residual buffer in the wells.
 - (2) Pipette 50 µl of standard solution to the wells designated for standards.
 - (3) Pipette 50 µl of diluted sample to the designated sample wells (5x dilution is recommended).

- (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 20-25°C.
- (6) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (7) Pipette 50 µl of Biotinylated Anti GLP-1 Antibody Solution to all wells, and shake as step (4).
- (8) Stick a plate seal (*③) on the plate and incubate the plate for 1 hour at 20-25°C.
- (9) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (10) Pipette 50µl of Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to all wells, and shake the plate as step (4).
- (11) Stick a plate seal (*③) on the plate and incubate for 30 minutes.
- (12) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (13) Pipette 50 µl of 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 20-25°C.
- (15) Add 50 µl of Stop Solution to all wells and shake the plate as step (4).
- (16) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620 nm) within 30 minutes using a plate reader.

*Refer to the page 10 for notes of *①, *② and *③.

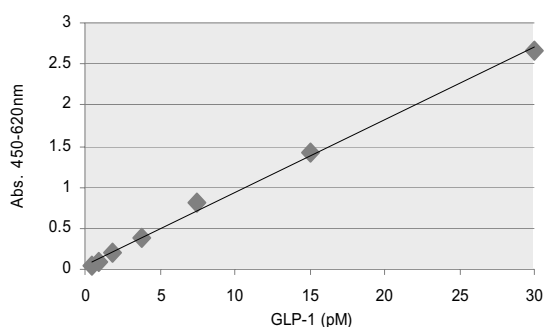
11. Calculations

- (1) Prepare a standard curve using paper by plotting readings of absorbance* (Y-axis) against values of GLP-1 concentration (pM) on X-axis.

*Absorbance at 450 nm minus absorbance at 620 nm.

- (2) Using the standard curve, read the GLP-1 concentration of a sample at its absorbance*, and multiply the assay value by dilution factor if the sample is diluted.

- In case the absorbance of a sample is higher than that of the highest standard, repeat the assay after proper dilution of samples with Buffer Solution.
- The use of a 3rd order regression curve for log-log plot or 4 or 5 parameters method for log-normal plot in computer calculation is recommended.



This standard curve is for the purpose of illustration only. The readings of absorbance may change due to the assay environment.

12. Performance characteristics

- Assay range

The assay range of the kit is 0.94 ~ 30 pM (for 5x dilution of sample, 4.7 ~ 150 pM).

If some samples show absorbance more than that of 30 pM standard, repeat the assay after proper dilution of samples.

- Precision of assay

Within assay variation (2 samples, 5 replicates assay) mean CV is less than 10 %.

- Reproducibility

Between assay variation (3 samples, 3 replicates assay within 4 days) mean CV is less than 10 %.

- Dilution test

Two plasma samples were serially diluted by 3 steps and assay was performed.

The dilution curves showed excellent linearity, $R^2 = 0.999$.

13. Troubleshooting

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

- The absorbance of blank is higher than that of the lowest standard concentration (0.94 pM).

Possible explanations:

Improper or inadequate washing.

- High coefficient of variation (CV)

Possible explanation:

- 1) Improper or inadequate washing.
- 2) Improper mixing of standards, positive controls or samples. (Frozen sample should be agitated sufficiently.)
- 3) Pipetting at irregular intervals.

- Q-1: The plate can be divided to use 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 immediately.

- Q-2: What is the liquid in 96 well-plates found when the box is opened?

A-2: When 96 well-plates are manufactured, a preservation stabilizer is added to the wells.

- Q-3: When samples are thawed, a cloud-like substance appeared. Does this influence the assay?

A-3: It may lower the assay results or be out of the detection limit. When adding aprotinin and heparin together, fibrin may appear in samples. Raise the heparin concentration or use EDTA-2Na.

14. Summary of assay procedure and a check list : Use as a check box

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

- Bring the well-plate and all reagents to 20-25°C. It will take about 2 hours
- Wash Solution must be diluted 10 times by purified water of room temperature (20-25°C) to prepare washing buffer.
- Make GLP-1 standard solution : Add the volume of purified water stated in a separate sheet, shake and dissolve it completely (GLP-1 standard solution, 300 pM).
- Preparation of diluted GLP-1 standard solution:

Concentration (pM)	30	15	7.5	3.75	1.88	0.94	0
GLP-1 standard solution (300 pM) (μl)	50	120*	120*	120*	120*	120*	0
Buffer solution (μl)	450	120	120	120	120	120	120

*One rank higher standard.

		Precautions & related info
<input type="checkbox"/>	Antibody -coated Plate	
<input type="checkbox"/>	↓Wash 3 times (*①).	After removal of washing buffer, dispense the next reagent immediately.
<input type="checkbox"/>	Diluted Samples/Standards 50 μl	
<input type="checkbox"/>	↓Shake (*②) , incubate (leave to stand still (*③)) for 2 hours at 20-25°C.	
<input type="checkbox"/>	Dilute Biotinylated Anti GLP-1 Antibody Solution 100 times by using Buffer Solution	Dilute reagents during the first reaction.
<input type="checkbox"/>	↓Wash 3 times (*①).	After removal of washing buffer, dispense the next reagent immediately.
<input type="checkbox"/>	Biotinylated Anti GLP-1 Antibody Solution 50 μl	
<input type="checkbox"/>	↓Shake (*②), incubate (leave to stand still (*③)) for 1 hour at 20-25°C.	
<input type="checkbox"/>	Dilute Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution 100 times by using Buffer Solution.	Dilute reagents during the second reaction.
<input type="checkbox"/>	↓Wash 3 times (*①).	After removal of washing buffer, dispense the next reagent immediately.
<input type="checkbox"/>	Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution 50 μl	
<input type="checkbox"/>	↓Shake (*②), incubate (leave to stand still (*③)) for 30 minutes at 20-25°C.	
<input type="checkbox"/>	↓Wash 3 times (*①).	After removal of washing buffer, dispense the next reagent immediately.
<input type="checkbox"/>	TMB Solution 50 μl	
<input type="checkbox"/>	↓Shake (*②), incubate (leave to stand still (*③)) for 30 minutes at 20-25°C.	
<input type="checkbox"/>	Stop Solution 50 μl	
<input type="checkbox"/>	↓Shake (*②).	Shake the plate immediately
<input type="checkbox"/>	Measurement of absorbance (450 nm, Ref 620 nm)	

- *①After dispensing washing buffer to wells, shake the plate lightly on the palm for 10 sec and remove the washing buffer. Guideline of washing volume: 300 μ l/well washing buffer is added by pipette. In case of using an 8 channel pipette, the back ground sometimes tends to be high. In such a case, increase washing frequency from 3 times to 4-6 times at the constant stroke after the reaction with HRP-conjugated Streptavidin. Recommended flow rate for a plate washer: 5-25ml/min.
- *②Guideline of shaking: 600-1,200 rpm for 10 seconds x 3 times.
- *③The plate should be sealed during the reaction. Peel off the protective paper from the seal and stick the seal on the plate. Do not reuse the plate seal.

15. Assay worksheet

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

[Storage condition] Store the kit at 2-10°C (do not freeze).

[Term of validity] 6 months from production (expiration date is indicated on the container).

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://www.wako-chem.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 : +49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

研究用試薬

GLP-1 ELISA キットワコー、高感度品

コード No. 299-75501

目次

1. 使用目的	13
2. キットの保存と使用期限	13
3. 測定原理	13
4. 注意事項	13
5. 構成品	13
6. 添付されていないが必要な器具	14
7. 試薬の調製	14
8. 技術上のヒント	15
9. 検体の調製	15
10. 測定操作法	15
11. 計算	16
12. キットの性能	16
13. トラブルシューティングと Q&A	16
14. 測定手順概要とチェックリスト	18
15. ワークシート	19

1. 使用目的

本キットはマウス、ラット GLP-1(Glucagon Like Peptide-1)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。

2. キットの保存と使用期限

キットは 2~10°Cで保存して下さい(凍結厳禁)。この保存条件下でキットは製造月から 6 ヶ月(外箱のラベルに記載)までは安定です。有効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。

3. 測定原理

本キットは標準品、希釈検体を抗 GLP-1 抗体固相化マイクロプレートウエル中でインキュベートします。2 時間のインキュベーションと洗浄後、ビオチン結合抗 GLP-1 抗体を加え 1 時間インキュベートします。再度の洗浄後、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物を加え、捕捉された GLP-1 とともに 30 分インキュベートします。洗浄後、ウエ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 450nm(副波長 620nm)で比色測定されます。吸光度は GLP-1 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することで標準曲線が作られ、この標準曲線を使って未知検体中の濃度が決定されます。

4. 注意事項

- 本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の方でご使用下さい。
 用手法操作で測定する際にはピペ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。
- 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。
- 試薬類は口でピペ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。
- 各ステップでの静置反応時には、ウエルの乾燥、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。
- 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°C(実験台上またはインキュベータ内温度)を厳守して下さい。また、エアコンなどによる風のある環境下での測定(風速 0.4m/秒以上)や、低湿度環境下での測定(湿度 30%未満)は避けて下さい。

5. 構成品

	構 成 品	状 態	容 量
296-75511	抗体固相化 96 ウエルプレート	洗浄後使用	96 wells(8×12)/1 枚
293-75521	GLP-1 標準品	溶解希釈後	1 本
290-75531	緩衝液	そのまま使用	60mL/1 本
297-75541	ビオチン結合抗 GLP-1 抗体	希釈後使用	100μL/1 本
294-75551	ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	希釈後使用	100μL/1 本
291-75561	発色液(TMB)	そのまま使用	12mL/1 本
298-75571	反応停止液(1N H ₂ SO ₄) ※取扱注意	そのまま使用	12mL/1 本
295-75581	濃縮洗浄液(×10)	希釈後使用	100mL/1 本
292-75591	プレートシール		4 枚
取扱説明書			1 部

6. 添付されていないが必要な器具 □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 を正確にピペティングできるもの、及び 100~500 μ L を正確にピペティングできるもの) □連続分注ピペット、50 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 600~1,200 rpm)
□96 ウエルプレート用洗浄機(あれば好ましい)または噴射ピン □96 ウエルプレートリーダー(450 \pm 10 nm、620nm:600~650nm) □データ計算用ソフトウェア

7. 試薬の調製

- * キットの試薬は使用前に必ず室温(20~25 $^{\circ}$ C)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。

【濃縮された試薬類】

【GLP-1 標準品】

GLP-1 標準品に別紙記載量の精製水を添加して緩やかに攪拌して完全に溶解し、標準液(300pM)に調整します。標準液(300pM)を下記表のように緩衝液で希釈して、0、0.94、1.88、3.75、7.5、15、30pMの標準液を作製します。

標準溶液の容量	緩衝液	濃度(pM)	濃度(pg/mL)
標準液(300pM) 50 μ L	450 μ L	30	100
標準液(30 pM) 120 μ L	120 μ L	15	50
15 pM 溶液 120 μ L	120 μ L	7.5	25
7.5 pM 溶液 120 μ L	120 μ L	3.75	12.5
3.75 pM 溶液 120 μ L	120 μ L	1.88	6.2
1.88 pM 溶液 120 μ L	120 μ L	0.94	3.1
0 pM(Blank)	120 μ L	0.0	0.0

【ビオチン結合抗 GLP-1 抗体】

100 μ L を充分分取できる量をご提供しています。緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。

【ペルオキシダーゼ・アビジン結合物】

100 μ L を充分分取できる量をご提供しています。緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。

【濃縮洗浄液($\times 10$)】

濃縮洗浄液($\times 10$)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 の濃縮洗浄液($\times 10$)+900mL の精製水(蒸留水)(96 ウエル全てを使用する場合)

【試薬の安定性と保存方法】

■抗体固相化 96 ウエルプレート

未使用(冷蔵状態を保った状態でシールを剥がしていない)抗体固相化ストリップは同梱のジップシールパックに戻し、そのまま 2~10 $^{\circ}$ C で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

■GLP-1 標準品

キットを分割して使用する際は、溶解した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 $^{\circ}$ C で保存して下さい。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、保存はしないで下さい。

■緩衝液 及び ■発色液(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、2~10 $^{\circ}$ C で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

■ビオチン結合抗 GLP-1 抗体 及び ■ペルオキシダーゼ・アビジン結合物

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 $^{\circ}$ C で保存して下さい。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下さい。

■反応停止液(1N H₂SO₄)

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。有効期限内安定性を保ちます。

■濃縮洗浄液(×10)

濃縮洗浄液(×10)を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。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下さい。

8.技術上のヒント

- 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 ウエル／1 チップのご使用をお薦めします。
- 発色液は 96 ウエルプレートに使用するまではほぼ無色または薄い青色澄明です。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。

9.検体の調製

- 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。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。また、検体の希釈は用時調製として下さい。
- 血清分離促進剤等を使用する際は事前確認をして下さい。
- 溶血した検体や高脂質検体は使わないで下さい。
- 濁り及び不溶物のある検体は遠心分離等で除去後測定に用いて下さい。
- 妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、異なる2ポイント以上の希釈率で希釈直線性を確認して下さい。
- 検体を希釈する場合は、あらかじめ試験管(PP、PE)等を用いて緩衝液で希釈し測定ウエルに分注して下さい。標準操作法では5倍希釈です。

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	30 pM	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	15 pM	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	7.5 pM	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	3.75 pM	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	1.88 pM	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	0.94 pM	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	0 pM	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
H	ポジコン	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40

10.測定操作法

洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意して下さい。

抗体固相化プレートのシールは、プレートが十分に室温に戻ってから剥がして下さい。

- (1) 保護液を捨て、あらかじめ調製した洗浄液を各ウエルに満たし、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エルに残った液を取り除きます。
- (2) 標準品測定ウエルに各濃度の標準溶液を50μLずつ分注します。
- (3) 検体測定ウエルに緩衝液で希釈した希釈検体を50μLずつ分注します(標準操作法は5倍希釈です)。
- (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(20～25℃)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エルに満たし、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エルに残った液を取り除きます。
- (7) 各ウエルにビオチン結合抗 GLP-1 抗体を 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(20~25 $^{\circ}$ C)で 1 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エルに満たし 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エルに残った液を取り除きます。
- (10) 各ウエルにペルオキシダーゼ・アビジン結合物を 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(20~25 $^{\circ}$ 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エルに満たし 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エルに残った液を取り除きます。
- (13) 各ウエルに発色液を 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(20~25 $^{\circ}$ C)で 30 分間静置します。
- (15) 各ウエルに反応停止液を 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 600~650nm の範囲で使用できます。
- (*①)、(*②)、(*③) 測定手順概要をご参照下さい。

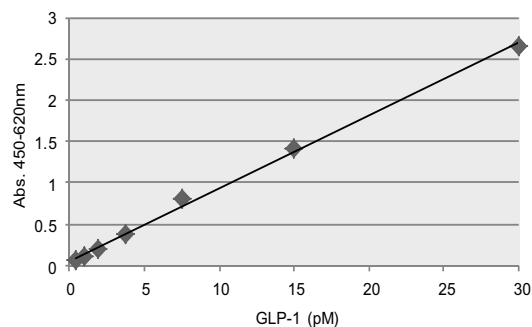
11. 計算

(1) 測定毎に標準曲線を作製します。X 軸が標準溶液濃度(μ M)、Y 軸が吸光度の標準曲線グラフを作製して下さい。

(2) 標準曲線より、希釈検体の吸光度に対応する濃度(μ M)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。

* 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致します。



12. キットの性能

● 測定範囲

0.94~30 pM の範囲で測定できます。(標準操作法 5 倍希釈: 4.7~150pM)

● 精度試験(アッセイ内変動)(5 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)(3 重測定、3 検体、4 日間) 平均 C.V.値は 10%未満

● 希釈直線性

2 血漿検体を連続的に希釈用緩衝液で 4 段階希釈し測定した。直線回帰の R^2 は 0.999 でした。

13. トラブルシューティングと Q&A

● すべてのウエルでの反応が弱い

可能な解釈

- 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) 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(0.94pM)の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。

可能な解釈・・・ 洗浄が不適當、不完全であった。

- 変動係数(CV)が大きい

可能な解釈

- 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 : プレートを取出したらウエ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。

- Q-3 : 検体を融かしたらモヤモヤした不溶解物がありました。測定に影響がありますか？

A-3 : 影響が出る可能性があります。測定値が低く出たり、測定下限以下になる場合があります。特にアプロチニンを添加し抗凝固剤としてヘパリンを使用した場合、フィブリンの析出が起こる可能性があります。ヘパリンの使用濃度を濃くして頂くか、EDTA-2Na のご使用をご検討下さい。

14. 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、測定方法の確認後、測定操作を行って下さい。

- ウェルプレート、試薬類を十分に室温(20~25℃)に戻して下さい。室温化には2時間位必要です。
- 濃縮洗浄液の希釈 : 室温化された精製水で、**10倍**に希釈して下さい。
- 標準液の作製 : GLP-1 標準品に別紙記載量の精製水を添加し、完全に溶解して標準液(300pM)を作製します。さらに緩衝液(300pM)を緩衝液で希釈して、0、0.94、1.88、3.75、7.5、15、30pMの標準液を作製します。

濃度(pM)	30	15	7.5	3.75	1.88	0.94	0
標準液(300pM)(μ L)	原液: 50	120*	120*	120*	120*	120*	0
緩衝液(μ L)	450	120	120	120	120	120	120

*: ひとつ高濃度の標準溶液

		各操作注意事項
<input type="checkbox"/>	抗体固相化 96 ウェルプレート	
<input type="checkbox"/>	↓ 洗浄 3 回 (*①)	洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
<input type="checkbox"/>	希釈検体または標準 GLP-1 溶液 50μL	
<input type="checkbox"/>	↓ 攪拌 (*②)、室温(20~25℃)、2 時間反応、静置 (*③)	
<input type="checkbox"/>	ビオチン結合抗 GLP-1 抗体の希釈 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
<input type="checkbox"/>	↓ 洗浄 3 回 (*①)	洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
<input type="checkbox"/>	ビオチン結合抗 GLP-1 抗体 50μL	
<input type="checkbox"/>	↓ 攪拌 (*②)、室温(20~25℃)、1 時間反応、静置 (*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 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
<input type="checkbox"/>	↓ 洗浄 3 回 (*③)	洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
<input type="checkbox"/>	ペルオキシダーゼ・アビジン結合物 50μL	
<input type="checkbox"/>	↓ 攪拌 (*②)、室温(20~25℃)、30 分間反応、静置 (*③)	
<input type="checkbox"/>	↓ 洗浄 3 回 (*①)	洗浄液除去後、直ちに発色液分注
<input type="checkbox"/>	発色液(TMB) TMB が室温化されていることを確認 50μL	分注後、濃度により青色に呈色
<input type="checkbox"/>	↓ 攪拌 (*②)、室温(20~25℃)、30 分間反応、静置 (*③)	
<input type="checkbox"/>	反応停止液(1N H₂SO₄) 強酸性につき取扱注意 50μL	分注後、濃度により黄褐色に変色
<input type="checkbox"/>	↓ 攪拌 (*②)	直ちに攪拌
<input type="checkbox"/>	吸光度測定(主波長 450nm、副波長 620nm:600~650nm)	副波長はプレート表面の汚れ等をキャンセルします

(*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。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 μ L/ウェルです。万一、最小標準溶液濃度(0.94 pM)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物と反応後の洗浄回数 3 回を同じ流速で 4

～6回を増やして下さい。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は5～25mL/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エル間のコンタミに注意して下さい。

(*②) 攪拌の目安は600～1,200 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。

15.ワークシート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

【測定名】 _____

【所属】 _____

【測定者】 _____ 【測定日】 _____

【キットロット番号】 _____ 【有効期限】 _____

【備考】 _____

製造発売元

富士フィルム 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

1902KA2