

(109 × 210mm Size)

FUJIFILM

Wako

Code No. 292-80001

Glucagon ELISA Kit *Wako* (Sandwich method)

[Introduction]

Glucagon is a peptide hormone comprising 29 amino acids and secreted from α cells in the islets of Langerhans. Physiologically, it acts on liver to degrade glycogen to glucose and increase blood glucose level. Together with insulin, it plays an important role in maintaining blood glucose level.

This kit uses sandwich ELISA with a monoclonal antibody that recognizes N-terminal and a monoclonal antibody that recognizes C-terminal of glucagon. The assay with this kit shows little cross-reactivity, if any, to glucagon-related peptides such as glicentin, oxyntomodulin, GLP-1 or GLP-2.

[Performance]

Principle of the assay	Sandwich method
Dynamic range	2.2~143.6 pmol/L (7.8 ~ 500 pg/mL)
Specimen	Serum (human, rat, mouse), Plasma (human, rat, mouse), Cell culture medium
Sample volume	10 μ L
Measuring time	Approximately 20 hours
Intra-assay CV	< 5%
Inter-assay CV	< 10%

[Kit contents]

1) Antibody-coated 96-well Plate	1 plate
2) Glucagon Standard	0.287 pmol (1 vial)
3) HRP conjugated Anti Glucagon Antibody Solution	12 mL (1 bottle)
4) TMB Solution	12 mL (1 bottle)
5) Stop Solution	12 mL (1 bottle)
6) Buffer	12 mL (1 bottle)
7) Wash Solution (20 ×)	50 mL (1 bottle)
8) Plate Seal	2 sheets

[Principle of the assay]

The plate (96 wells) is coated with anti-glucagon mouse monoclonal antibody that specifically recognizes C-terminal of mouse glucagon. Standard solutions or samples are added to the wells of the plate. Simultaneously, HRP conjugated anti-glucagon monoclonal antibody that specifically recognizes N-terminal of mouse glucagon is added to form a sandwich complex. By measuring HRP activity in this complex, glucagon in the sample can be measured specifically.

[Apparatuses and equipment to be used]

- Micropipette and tip (10~1,000 μ L) (8-or 12-channel multichannel pipettes are recommended)
- Microplate reader (equipment that can measure the absorbance up to 3.0 at 450 nm)
- Glass test tubes

- Microplate washer (continuous dispenser, needle dispenser, and aspirator or vacuum pump are recommended for manual method)
- Graduated cylinder (1,000 mL)
- Distilled water or deionized water

[Methods for preparation of reagents]

Standard solutions

Add 1 mL of Buffer to a vial of Glucagon Standard, allow to stand for approximately 5 minutes and stir well to dissolve the content, which yields 287 pmol/L standard solution. Pipette 0.2 mL of the standard solution reconstituted and dilute with 0.2 mL of Buffer, which yields a 143.6 pmol/L ([1]) standard solution. Repeat the dilution procedure to prepare a series of 71.8 ([2]), 35.9 ([3]), 17.9 ([4]), 9.0 ([5]), 4.5 ([6]) and 2.2 pmol/L ([7]) standard solutions. Buffer itself is used as 0 pg/mL ([8]) standard solution.

Wash solution

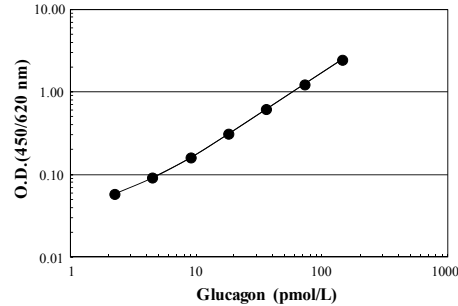
Dilute 50 mL of the Wash Solution (20 ×) with 950 mL of distilled water.

The other reagents are ready-to-use.

[Measurement procedure]

1. Bring kit contents to room temperature (20~30 °C) to come to equilibrium.
2. Dispense 350 μ L/well of wash solution to each well, discard the solution by sucking with the aspirator or turning over the plate, and remove the solution completely by lightly patting against paper towel. Repeat the procedure two more times to wash the plate 3 times in total.
3. Dispense 10 μ L each of standard solutions [0 ([8]), 2.2 ([7]), 4.5 ([6]), 9.0 ([5]), 17.9 ([4]), 35.9 ([3]), 71.8 ([2]), 143.6 pmol/L ([1])] or sample to each well, and add 100 μ L of HRP conjugated Anti-Glucagon Antibody Solution.
4. Cover the plate with a Plate Seal, and allow to stand at 4 °C for 18 to 20 hours.
5. Pipette necessary amount of TMB Solution 1 hour before use, and bring it to room temperature in a dark place.
6. Remove the solution from each well, and repeat washing operation 6 times in total, in a manner similar to step 2.
7. Add 100 μ L of TMB Solution to each of the wells, and leave in a dark place to react for 30 minutes at room temperature.
8. Add 100 μ L of Stop Solution to each of the wells.
9. Determine the absorbance at 450 nm/620 nm using an absorption spectrometer for microplate.
10. Prepare a standard curve from the measured values of the absorbance at the respective concentrations of glucagon standard solutions using a commercially available software and 5 (or 4)-parameter regression equation and determine the concentration of glucagon in the sample. When a logarithmic graph paper is used, plot the concentration of the standard solution to x-axis and the absorbance of the standard solution at each concentration to y-axis. Apply the absorbance of the sample to the standard curve and measure the concentration of glucagon.

Example of calibration curve



[Notes on use]

1. For serum sample, coagulate and centrifuge the sample, and use the supernatant for assay. For plasma sample, EDTA-2Na additive blood collection tube is recommended for collection (final concentration : 1 mg/mL blood). To add aprotinin, add it to make final concentration of 500 KIU/mL blood. (For preparation of serum, separate and collect the serum before adding aprotinin). To add DPP-4 inhibitor, add it to make concentration of 0.01 mL/mL blood. Alternatively, BD™ P800 Blood Collection Tubes for preservation of plasma GLP-1, GIP, Glucagon, Ghrelin (Becton Dickinson) can be used. If the samples are tested later, they should be divided into test tubes in small amount appropriately and frozen at -80°C . Avoid repeated freezing and thawing of samples.
2. Prepare the reagents just before use as a rule. Especially, standard solution should be used immediately after preparation. If the kit is used in divided times, use some containers (such as a vial or test tube) for storage of the reference standard after dissolution. The reference standard after dissolution is stable for 1 month of frozen storage at -80°C .
3. During storage of concentrated wash solution, precipitates may be observed. The precipitates are dissolved when the solution is diluted and prepared.
4. Pipetting operations may affect the precision of the assay, so that pipette solutions precisely into each well. In addition, to dispense sample to wells, use new tip for each sample to avoid cross contamination. To dilute the standard solution, use new tip for each dilution step.
5. When the sample concentration exceeds 143.6 pmol/L, it needs to be diluted with Buffer to a proper concentration for the assay.
6. Perform all the measurement in duplicate.
7. Determine the optical absorbance as soon as possible after stop of enzyme-substrate reaction.
8. Color of enzyme substrate may be influenced a little by reaction temperature, time, and agitating of the plate. Always prepare a standard curve for each run of assay.
9. Take care not to expose each reagent to intense light during storage and assay.
10. Do not use kit from different lot for measurement by this assay.
11. Before use, bring the enzyme substrate solution to room temperature in a dark place.
12. Rarely, a small amount of floating substance may be observed in HRP conjugated Anti-Glucagon Antibody Solution, but this causes no problem to the assay performance. After bringing it to room temperature, stir lightly before use.

[Measurement example]

■ Recovery test

	Not addition	Glucagon(2.9 pmol/L)		Glucagon(14.4 pmol/L)		Glucagon(57.4 pmol/L)	
	Measured value (pmol/L)	Measured value (pmol/L)	Recovery	Measured value (pmol/L)	Recovery	Measured value (pmol/L)	Recovery
Human Serum [1]	10.80	14.05	102.8%	25.67	102.0%	68.39	100.2%
Human Serum [2]	4.31	6.89	95.9%	18.62	99.8%	57.71	93.5%
Human Plasma [1]	12.51	16.04	104.3%	26.89	100.1%	68.83	98.4%
Human Plasma [2]	10.97	14.21	102.7%	23.95	94.6%	62.38	91.2%
Mouse Serum [1]	8.11	10.92	99.4%	20.48	91.2%	53.75	82.0%
Mouse Serum [2]	5.60	8.17	96.4%	18.10	90.7%	54.54	86.5%
Mouse Plasma [1]	18.24	21.82	103.4%	31.64	97.1%	65.06	86.0%
Mouse Plasma [2]	6.55	9.13	96.9%	18.71	89.5%	54.69	85.5%
Rat Serum [1]	6.46	8.86	94.9%	20.08	96.5%	56.71	88.8%
Rat Serum [2]	5.46	8.12	97.5%	19.57	98.8%	50.75	80.7%
Rat Plasma [1]	18.73	22.10	102.3%	34.36	103.8%	69.72	91.6%
Rat Plasma [2]	13.25	16.32	101.2%	27.61	100.0%	69.51	98.4%

■ Dilution test

	×1	×2		×4		×8	
	Measured value (pmol/L)	Measured value (pmol/L)	Recovery	Measured value (pmol/L)	Recovery	Measured value (pmol/L)	Recovery
Human Serum [1]	11.51	5.66	98.4%	2.68	93.2%	-	-
Human Serum [2]	12.14	6.23	102.6%	2.91	95.9%	-	-
Human Plasma [1]	15.94	8.19	102.7%	4.11	103.1%	-	-
Human Plasma [2]	14.93	7.35	98.5%	3.63	97.2%	-	-
Mouse Serum [1]	8.60	5.01	116.5%	2.39	111.1%	0.90	83.9%
Mouse Serum [2]	6.46	3.48	107.7%	1.53	94.7%	-	-
Mouse Plasma [1]	8.38	4.22	100.9%	1.85	88.1%	-	-
Mouse Plasma [2]	14.70	8.38	113.9%	4.22	114.8%	1.83	99.3%
Rat Serum [1]	10.26	6.00	116.9%	2.79	108.6%	1.30	101.3%
Rat Serum [2]	10.37	5.89	113.6%	2.78	107.3%	1.20	92.8%
Rat Plasma [1]	24.69	12.26	99.3%	5.97	96.7%	2.88	93.2%
Rat Plasma [2]	17.37	9.12	104.9%	4.34	100.0%	2.11	97.0%

[Cross-reactivity]

Related peptide	Cross-reactivity (%)
Glicentin (1-69) (Human)	0.68
Glicentin (1-69) (Rat)	0.96
Glicentin (1-69) (Mouse)	0.97
Oxyntomodulin (Human, Rat, Mouse)	0.64
Mini-glucagon	not detected
GLP-1 (7-36) NH ₂ (Human, Rat, Mouse)	not detected
GLP-1 (9-36) NH ₂ (Human, Rat, Mouse)	not detected
GLP-2 (Human)	not detected
GLP-2 (Rat)	not detected
GLP-2 (Mouse)	not detected
GIP (Human)	not detected
GIP (Rat)	not detected
GIP (Mouse)	not detected

[Outline of operation]

- Fully return plates and reagents to room temperature (20~30 °C).
- Dilution of Wash Solution (20 ×) : Add distilled water to dilute the concentrated solution 20 folds.
- Preparation of standard solution : Add 1 mL of Buffer to a vial of Glucagon Standard, allow to stand for approximately 5 minutes and stir well to dissolve the content, which yields 287 pmol/L standard solution. Pipette 0.2 mL of the standard solution reconstituted and dilute with 0.2 mL of Buffer, which yields a 143.6 pmol/L ([1]) standard solution. Continue the dilution procedure in a manner below, to prepare a series of 71.8 ([2]), 35.9 ([3]), 17.9 ([4]), 9.0 ([5]), 4.5 ([6]) and 2.2 pmol/L ([7]) standard solutions. Buffer itself is used as 0 pg/mL ([8]) standard solution.

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]
Concentration (pmol/L)	143.6	71.8	35.9	17.9	9.0	4.5	2.2	0
Standard solution (mL)*	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
Buffer (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

* Standard solution at concentration 1 step higher

- Antibody-coated 96-well plate
 - ↓ Wash 3 times
- Sample or standard solution 10 μL/well
 - ↓
- HRP conjugated Anti-Glucagon Antibody Solution 100 μL/well
 - ↓ Cover the plate with a Plate Seal, and allow to stand at 4 °C for 18 to 20 hours.
 - ↓ Wash 6 times
- TMB Solution 100 μL/well
 - ↓ Pipette TMB Solution and bring it to room temperature in a dark place (1 hour before use)
 - ↓ Allow to stand for 30 minutes at room temperature in a dark place
- Stop Solution 100 μL/well
 - ↓ Determine the absorbance at 450 nm/620 nm on a plate reader.

[Storage condition]

Store at 2°C~10°C in a dark place.

[Expiration date]

Indicated on the label

[Packaging]

96 times

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>

グルカゴン ELISA キットワコー (サンドイッチ法)

〔はじめに〕

グルカゴンは、膵ランゲルハンス島の α 細胞から分泌される29アミノ酸からなるペプチドホルモンです。グルカゴンの主な生理作用は、肝臓に作用しグリコーゲンをグルコースへ分解し血糖値を上昇させ、インスリンとともに血糖値を一定に保つ作用をする重要なホルモンです。

本キットは、グルカゴンのN末端認識モノクローナル抗体とC末端認識モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAで、グリセンチン、オキシントモジュリン、GLP-1、GLP-2などのグルカゴン関連ペプチドとの交差反応性をほとんど認めません。

〔キット性能〕

測定原理	サンドイッチ法
検量線範囲	2.2~143.6 pmol/L (7.8~500 pg/mL)
測定対象検体	血清 (ヒト、ラット、マウス)、血漿 (ヒト、ラット、マウス)、培養液
必要検体量	10 μ L
測定時間	約20時間
同時再現性	CV < 5%
日差再現性	CV < 10%

〔キット内容〕

1) Antibody-coated 96-well Plate/抗体固相化96ウエルプレート	1 プレート
2) Glucagon Standard/グルカゴン標準品	0.287 pmol \times 1 本
3) HRP conjugated Anti Glucagon Antibody Solution/ HRP 標識抗グルカゴン抗体溶液	12 mL \times 1 本
4) TMB Solution/TMB 溶液	12 mL \times 1 本
5) Stop Solution/反応停止液	12 mL \times 1 本
6) Buffer/緩衝液	12 mL \times 1 本
7) Wash Solution (20 \times) /濃縮洗浄液 (20 \times)	50 mL \times 1 本
8) Plate Seal/プレートシール	2 枚

〔測定原理〕

測定プレート (96ウエル) の各ウエルにはマウス抗グルカゴンC末端特異的モノクローナル抗体が固定化されています。この各ウエルに標準液または検体を入れ、同時にHRP標識化マウス抗グルカゴンN末端特異的抗体を反応させ、サンドイッチ複合体を形成させます。最後にこの複合体中のHRP活性を測定することにより、検体中のグルカゴンを特異的に測定することができます。

〔使用器具および装置〕

- マイクロピペットおよびチップ (10~1,000 μ L) (8連または12連のマルチチャンネルピペット推奨)
- マイクロプレートリーダー (測定波長450 nmで吸光度3.0まで測定できる装置)

- ガラス製の試験管
- マイクロプレート洗浄装置（用手法の場合は連続分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプ推奨）
- メスシリンダー（1,000 mL）
- 蒸留水または脱イオン水

〔試薬類の調製法〕

○ 標準液

標準品の容器に緩衝液を1 mL加えて約5分静置後、内容物をよく攪拌し溶解させ、287 pmol/Lの標準液を調製します。この標準液から0.2 mLをとり、これを緩衝液0.2 mLで希釈し、143.6 pmol/L (①)の標準液を調製します。以下同様の希釈操作を繰り返し、71.8 (②)、35.9 (③)、17.9 (④)、9.0 (⑤)、4.5 (⑥)、2.2 pmol/L (⑦)の各標準液を調製します。0 pg/mL (⑧)の標準液は緩衝液をそのまま使用します。

○ 洗浄液

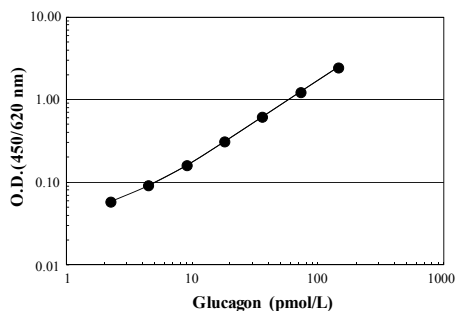
濃縮洗浄液50 mL（全量）を950 mLの蒸留水にて希釈して使用します。

○ その他の試薬はそのまま使用します。

〔測定操作〕

1. キットの部材を室温（20～30℃）において、室温平衡します。
2. 各ウェルに、洗浄液350 μ Lを分注し、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして完全に液を除きます。この操作をさらに2回繰り返し、合計3回の洗浄操作を行います。
3. 各ウェルに標準溶液[0 (⑧)、2.2 (⑦)、4.5 (⑥)、9.0 (⑤)、17.9 (④)、35.9 (③)、71.8 (②)、143.6 pmol/L (①)]または検体10 μ Lを加え、ついでHRP標識抗グルカゴン抗体溶液100 μ Lを加えます。
4. 測定プレートをプレートシールでシールし、4℃で18～20時間静置します。
5. 必要量のTMB溶液を使用する約1時間前に分取し、遮光状態で室温に戻します。
6. 各ウェル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計6回行います。
7. 各ウェルにTMB溶液100 μ Lを加え、遮光状態で静置し、室温で30分間反応させます。
8. 各ウェルに反応停止液100 μ Lを添加します。
9. マイクロプレート用吸光度計で450 nm/620 nmの吸光度を測定します。
10. 市販のソフトウェアを用いて、5 (or 4)-Parameterの回帰式を使用し、グルカゴン標準液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、検体のグルカゴン濃度を求めます。両対数方眼紙を用いる場合は、横軸に標準液の濃度を、縦軸に標準液各濃度の吸光度をプロットして標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、グルカゴンの濃度を読み取ります。

検量線例



〔使用上の注意〕

1. 血清の場合は、凝固後、遠心分離し上清を採取してください。血漿の場合は、EDTA-2Na添加採血管（血液に対して最終濃度 1 mg/mL）で採取してください。なお、アプロチニンを添加する場合は、血液に対して最終濃度 500 KIU/mLを加えてください。（ただし、血清を調製する場合は、血清を分離採取した後添加してください。）また、DPP-4 inhibitorを添加する場合は、血液に対して 0.01 mL/mLを加えてください。真空採血管には、BD™ P800 GLP-1, GIP, Glucagon, Ghrelin 保存用真空採血管（日本ベクトン・ディッキンソン）も使用できます。直ちに測定できない場合は適宜小分けして、 -80°C で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。
2. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品は調製後、直ちに使用してください。なお、キットを分割使用する場合、調製後の標準品は適宜小分けして、 -80°C で凍結保存してください（約 1 ヶ月は安定です）。
3. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。
4. 各ウエルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行ってください。また検体をウエルに注入する場合は、検体ごとに新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。標準液を希釈するときは、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。
5. 143.6 pmol/Lを超える高値検体の場合は、検体を本キット添付の緩衝液にて希釈して測定してください。
6. 測定はすべて 2 重測定で行ってください。
7. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
8. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度などでわずかですが影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごとに作成してください。
9. 各試薬の保存中もしくは使用中には、これらに強い光が当たらないように注意してください。
10. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせ使用しないでください。
11. 酵素基質液は遮光しながら室温に戻し、使用してください。
12. HRP標識抗グルカゴン抗体溶液中にまれにわずかな浮遊物が見られることがありますが、性能上問題ありません。室温に戻した後、使用前に軽く攪拌してください。

〔測定例〕

■ 添加回収試験

	未添加	2.9pmol/L グルカゴン添加		14.4pmol/L グルカゴン添加		57.4pmol/L グルカゴン添加	
	測定値(pmol/L)	測定値(pmol/L)	Recovery	測定値(pmol/L)	Recovery	測定値(pmol/L)	Recovery
ヒト血清①	10.80	14.05	102.8%	25.67	102.0%	68.39	100.2%
ヒト血清②	4.31	6.89	95.9%	18.62	99.8%	57.71	93.5%
ヒト血漿①	12.51	16.04	104.3%	26.89	100.1%	68.83	98.4%
ヒト血漿②	10.97	14.21	102.7%	23.95	94.6%	62.38	91.2%
マウス血清①	8.11	10.92	99.4%	20.48	91.2%	53.75	82.0%
マウス血清②	5.60	8.17	96.4%	18.10	90.7%	54.54	86.5%
マウス血漿①	18.24	21.82	103.4%	31.64	97.1%	65.06	86.0%
マウス血漿②	6.55	9.13	96.9%	18.71	89.5%	54.69	85.5%
ラット血清①	6.46	8.86	94.9%	20.08	96.5%	56.71	88.8%
ラット血清②	5.46	8.12	97.5%	19.57	98.8%	50.75	80.7%
ラット血漿①	18.73	22.10	102.3%	34.36	103.8%	69.72	91.6%
ラット血漿②	13.25	16.32	101.2%	27.61	100.0%	69.51	98.4%

■ 希釈試験

	× 1	× 2		× 4		× 8	
	測定値(pmol/L)	測定値(pmol/L)	Recovery	測定値(pmol/L)	Recovery	測定値(pmol/L)	Recovery
ヒト血清①	11.51	5.66	98.4%	2.68	93.2%	-	-
ヒト血清②	12.14	6.23	102.6%	2.91	95.9%	-	-
ヒト血漿①	15.94	8.19	102.7%	4.11	103.1%	-	-
ヒト血漿②	14.93	7.35	98.5%	3.63	97.2%	-	-
マウス血清①	8.60	5.01	116.5%	2.39	111.1%	0.90	83.9%
マウス血清②	6.46	3.48	107.7%	1.53	94.7%	-	-
マウス血漿①	8.38	4.22	100.9%	1.85	88.1%	-	-
マウス血漿②	14.70	8.38	113.9%	4.22	114.8%	1.83	99.3%
ラット血清①	10.26	6.00	116.9%	2.79	108.6%	1.30	101.3%
ラット血清②	10.37	5.89	113.6%	2.78	107.3%	1.20	92.8%
ラット血漿①	24.69	12.26	99.3%	5.97	96.7%	2.88	93.2%
ラット血漿②	17.37	9.12	104.9%	4.34	100.0%	2.11	97.0%

〔交差反応性〕

関連ペプチド	交差反応性 (%)
Glicentin (1-69) (Human)	0.68
Glicentin (1-69) (Rat)	0.96
Glicentin (1-69) (Mouse)	0.97
Oxyntomodulin (Human, Rat, Mouse)	0.64
Mini-glucagon	not detected
GLP-1 (7-36) NH2 (Human, Rat, Mouse)	not detected
GLP-1 (9-36) NH2 (Human, Rat, Mouse)	not detected
GLP-2 (Human)	not detected
GLP-2 (Rat)	not detected
GLP-2 (Mouse)	not detected
GIP (Human)	not detected
GIP (Rat)	not detected
GIP (Mouse)	not detected

〔操作概要〕

- プレート、試薬類を十分に室温（20～30℃）に戻します。
- 濃縮洗浄液の希釈：蒸留水で20倍に希釈します。
- 標準溶液の調製：グルカゴン標準品のバイアルに緩衝液 1 mLを入れて約 5 分静置後、内容をよく攪拌し十分に溶解させ、287 pmol/Lの標準溶液を調整します。この標準液から 0.2 mLをとり、これを緩衝液 0.2 mLで希釈し、143.6 pmol/L (①)の標準液を調製します。その後、下記のように緩衝液希釈して 71.8 (②)、35.9 (③)、17.9 (④)、9.0 (⑤)、4.5 (⑥)、2.2 pmol/L (⑦)の標準溶液を作製します。0 pg/mL (⑧)の標準液は緩衝液をそのまま使用します。

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
濃度(pmol/L)	143.6	71.8	35.9	17.9	9.0	4.5	2.2	0
標準溶液(mL)*	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
緩衝液(mL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

※：一段階高濃度の標準溶液

- 抗体固相化96ウェルプレート
 - ↓ 洗浄 3 回
 - 検体または標準溶液 10 μL/ウェル
 - ↓
 - HRP標識抗グルカゴン抗体溶液 100 μL/ウェル
 - ↓ プレートをプレートシールで覆って 4℃で18-20時間静置
 - ↓ 洗浄 6 回
 - TMB溶液 100 μL/ウェル
 - ↓ TMB溶液を分取、遮光で室温に戻す（使用する 1 時間前に実施）。
 - ↓ 室温で遮光して30分間静置
 - 反応停止液 100 μL/ウェル
 - ↓
- 450 nm/620 nm の吸光度をプレートリーダーで測定

〔貯 法〕

2～10℃保存・遮光保存

〔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

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

1802KA1