

研究用試薬

モリナガ

超高感度マウスインスリン測定キット
超高感度ラットインスリン測定キット

共通取扱説明書

【お願い】

製品をご使用になる前に、必ずお読みください。

株式会社森永生科学研究所

横浜市鶴見区下末吉2-1-1 〒230-8504

URL:<https://www.miobs.com> E-MAIL:info_miobs@morinaga.co.jp

An instruction in English is from page 17.

■キットの構成

	品名	容量	数量
A	抗体固相化プレート	8ウェル×6本	2パック
B	凍結乾燥マウス/ラットインスリン標準品	2.56ng	1本
C	酵素標識抗マウス/ラットインスリン抗体原液	8mL	1本
D	酵素標識抗体希釈液	4mL	1本
E	酵素基質溶液 (TMB溶液)	13mL	1本
F	反応停止液 (1N硫酸)	13mL	1本
G	検体希釈液	30mL	1本
H	20倍濃縮洗浄液 (1000mL用)	50mL	1本
	プレート用フレーム		1個
	プレート用ふた		1枚

■その他必要な器具・装置

1. マイクロピペット
5 μ L ~ 1000 μ L の範囲が必要です。
2. メスシリンダー (1000mL)
3. ポリプロピレン製チューブ (1.5mL)
標準曲線用インスリン溶液の調製および検体の希釈に使用します。
4. プレートリーダー
単波長の場合：450nm
2波長の場合：主波長 450nm・副波長 610 ~ 650nm が測定できるもの。

■キットの特長

1. 5 μ L の検体で測定が可能です。
△注意 検体量 5 μ L で測定する場合はピペティング誤差にご注意ください。
2. 100 μ L の検体を使用した場合、インスリン濃度が 5pg/mL から測定可能です。
3. マイクロプレートを使用した EIA サンドイッチ法を用いているため特別な施設・設備等を必要とせず、通常の実験室で測定可能です。

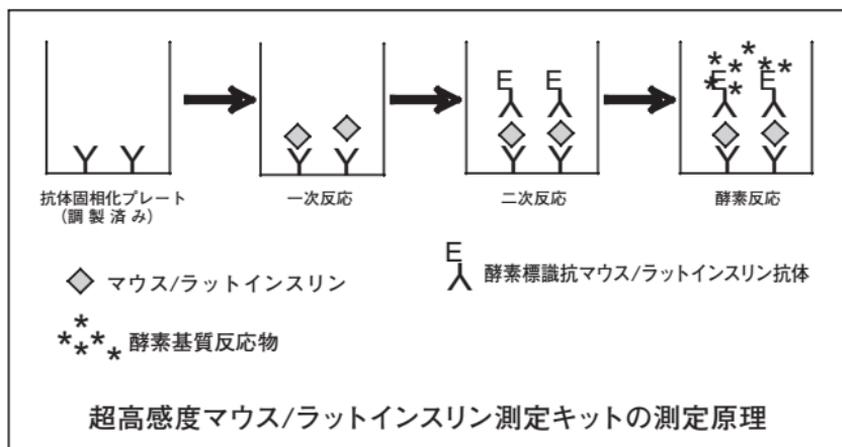
■測定原理

一次反応：検体中のマウス/ラットインスリンが、プレート上の固相化抗マウス/ラットインスリン抗体と結合し、固相化抗マウス/ラットインスリン抗体-マウス/ラットインスリンの複合体を形成する。

二次反応：酵素標識抗マウス/ラットインスリン抗体が複合体上のマウス/ラットインスリンに結合する。

酵素反応：酵素基質溶液を加えると、プレート上の複合体に結合した酵素により呈色する。

得られた吸光度に対応するマウス/ラットインスリン濃度を標準曲線から算出する。



■試薬の調製法

A 抗体固相化プレート

常温に戻してから開封してください。開封後は直ちに使用してください。

インスリン標準溶液

B 凍結乾燥マウス/ラットインスリン標準品に 100 μ L の蒸留水またはイオン交換水を加えて溶解してください。インスリン標準溶液は 25.6ng/mL となります。

酵素標識抗マウス/ラットインスリン抗体溶液 (使用直前に調製)
使用する直前に C 酵素標識抗マウス/ラットインスリン抗体原液と D 酵素標識抗体希釈液を 2 : 1 の割合で混和し、必要量を調製してください。混合後は直ちに使用してください。

E 酵素基質溶液

そのまま使用してください。

F 反応停止液

そのまま使用してください。

G 検体希釈液

そのまま使用してください。

洗浄液

H 20 倍濃縮洗浄液を蒸留水またはイオン交換水で 20 倍に希釈し、必要量を調製してください。

■測定操作手順 1【検体を 5 μ L で測定する場合】

測定は二重測定で行ってください。

全ての試薬は常温に戻してから使用してください。

標準曲線用インスリン溶液及び検体を分注する際、ピペッティング容量にばらつきが生じないように注意してください。

標準曲線用インスリン溶液の調製法

インスリン標準溶液を G 検体希釈液で希釈し、下記に示しますように 0ng/mL から 6.4ng/mL の標準曲線用インスリン溶液を調製してください。

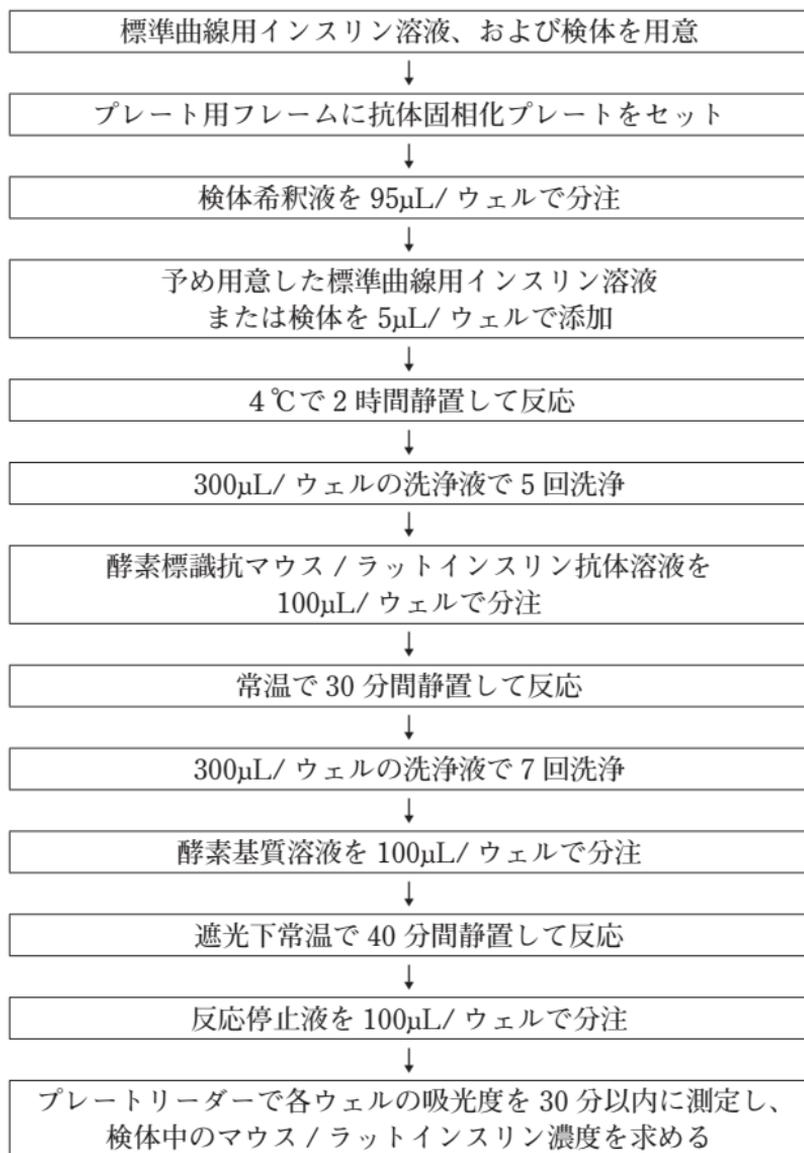
	標準曲線用インスリン溶液 (ng/mL)							
	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0
インスリン標準溶液	50							
検体希釈液	150	50	50	50	50	50	50	50
総液量	200	100	100	100	100	100	100	100

(μ L)

- 一次反応：1. A 抗体固相化プレートを付属のプレート用フレームにセットします。
2. 各ウェルに G 検体希釈液を 95 μ L ずつ分注します。
3. 各ウェルに標準曲線用インスリン溶液または検体を 5 μ L ずつ添加します。
(一次反応の全液量は 100 μ L/ ウェルとなります)
△注意 ピペッティング容量にばらつきが生じないようにご注意ください。
4. 付属のプレート用ふたをして 4 $^{\circ}$ C で 2 時間静置して反応させます。

- 二次反応：5. ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 300 μ L の洗浄液で 5 回洗浄します。最後の洗浄でウェル内に残った溶液を完全に除くため、プレートを清潔なペーパータオルなどに押しつけるようにして水分を除いてください。
6. **酵素標識抗マウス/ラットインスリン抗体溶液** (4 ページの「試薬の調製法」に従い調製したもの) を各ウェルに 100 μ L ずつ分注します。
7. プレート用ふたをして常温で 30 分間静置して反応させます。
- 酵素反応：8. ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 300 μ L の洗浄液で 7 回洗浄します。最後の洗浄でウェル内に残った溶液を完全に除くため、プレートを清潔なペーパータオルなどに押しつけるようにして水分を除いてください。
9. **E 酵素基質溶液** を各ウェルに 100 μ L ずつ分注します。
10. プレート用ふたをして遮光下常温で正確に 40 分間静置して反応させます。
11. **F 反応停止液** を各ウェルに 100 μ L ずつ分注し酵素反応を停止させます。
12. プレートリーダーで各ウェルの吸光度を測定します。
13. 標準曲線用インスリン溶液の吸光度より標準曲線を作成し、検体中のインスリン濃度を求めます。マウス/ラットインスリン濃度の算出法については、11 ページを参照してください。
- △ 注意** 酵素反応停止後は 30 分以内に吸光度を測定してください。

■測定操作手順 1【検体を 5 μ L で測定する場合】の概略



■測定操作手順 2【検体を100μLで測定する場合】

測定は二重測定で行ってください。

全ての試薬は常温に戻してから使用してください。

標準曲線用インスリン溶液及び検体を分注する際、ピペッティング容量にばらつきが生じないように注意してください。

標準曲線用インスリン溶液の調製法

インスリン標準溶液をG検体希釈液で希釈し、下記に示しますように0pg/mLから320pg/mLの標準曲線用インスリン溶液を調製してください。

	標準曲線用インスリン溶液 (pg/mL)							
	320	160	80	40	20	10	5	0
インスリン標準溶液	12.5							
検体希釈液	987.5	500	500	500	500	500	500	500
総液量	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

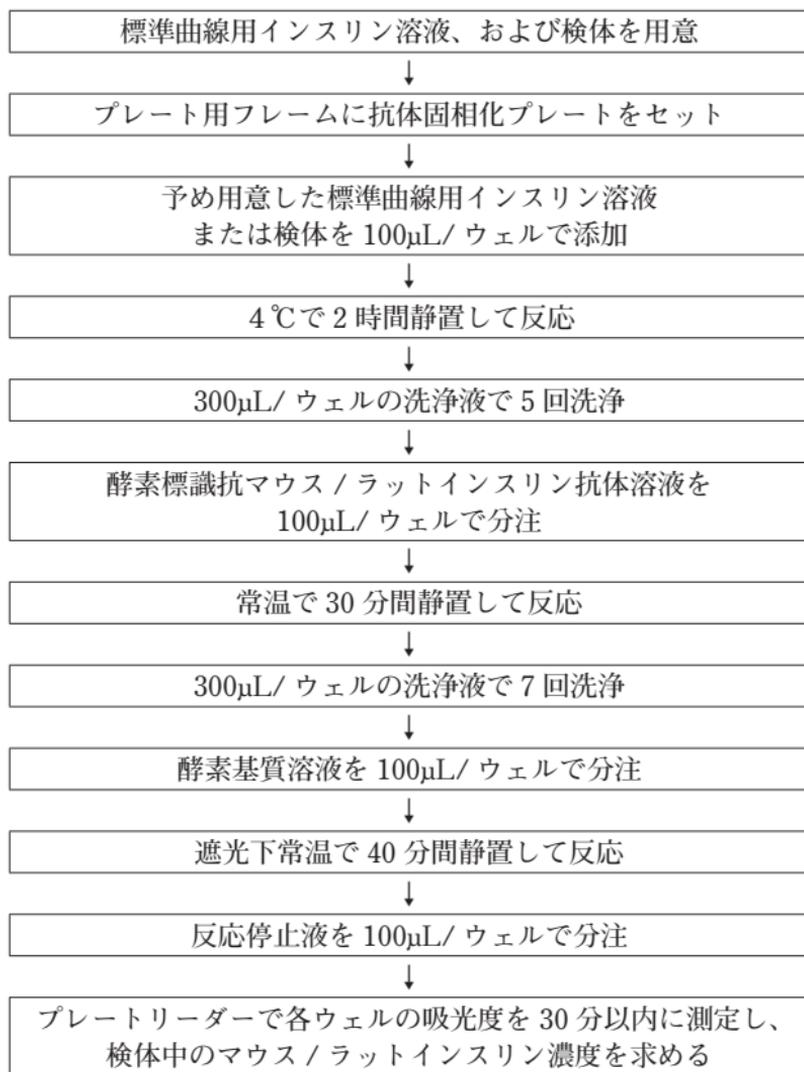
(μL)

- 一次反応：1. A 抗体固相化プレートを付属のプレート用フレームにセットします。
2. 各ウェルに標準曲線用インスリン溶液または検体を100μLずつ添加します。
 ▲注意 ピペッティング容量にばらつきが生じないようにご注意ください。
3. 付属のプレート用ふたをして4℃で2時間静置して反応させます。
- 二次反応：4. ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり300μLの洗浄液で5回洗浄します。最後の洗浄でウェル内に残った溶液を完全に除くため、プレートを清潔なペーパータオルなどに押しつけるようにして水分を除いてください。
5. 酵素標識抗マウス/ラットインスリン抗体溶液(4ページの「試薬の調製法」に従い調製したものを)を各ウェルに100μLずつ分注します。

- プレート用ふたをして常温で 30 分間静置して反応させます。

- 酵素反応** :
- ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 300 μ L の洗浄液で 7 回洗浄します。最後の洗浄でウェル内に残った溶液を完全に除くため、プレートを清潔なペーパータオルなどに押しつけるようにして水分を除いてください。
 - E 酵素基質溶液** を各ウェルに 100 μ L ずつ分注します。
 - プレート用ふたをして遮光下常温で正確に 40 分間静置して反応させます。
 - F 反応停止液** を各ウェルに 100 μ L ずつ分注し酵素反応を停止させます。
 - プレートリーダーで各ウェルの吸光度を測定します。
 - 標準曲線用インスリン溶液の吸光度より標準曲線を作成し、検体中のインスリン濃度を求めます。マウス/ラットインスリン濃度の算出法については、11 ページを参照してください。
△ 注意 酵素反応停止後は 30 分以内に吸光度を測定してください。

■測定操作手順 2【検体を100 μ Lで測定する場合】の概略



■インスリン濃度の算出法

1. 二重測定した各ウェルの吸光度の平均値を算出します。
2. 標準曲線用インスリン溶液の各インスリン濃度を横軸に、標準曲線用インスリン溶液のそれぞれの吸光度を縦軸にプロットし、標準曲線を作成します。
グラフ描画ソフトウェアを用いて標準曲線を作成する場合は、直線回帰もしくは4-パラメーターロジスティック回帰をお勧めします。
3. 標準曲線より各検体中のマウス/ラットインスリン濃度を読みとります。
4. 検体の吸光度が標準曲線の吸光度より外れた場合は、検体を検体希釈液で希釈し再度測定してください。

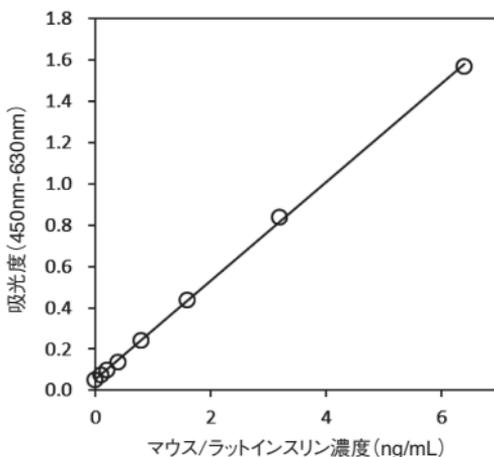


図1 インスリン標準曲線の例

■より広い検出範囲に対応した測定方法

インスリンの濃度を概算で知る必要がある場合、12.8ng/mLまでの範囲でインスリン濃度を測定することができます。この場合は5ページの標準曲線用インスリン溶液の調製法を次のように変更し0ng/mLから12.8ng/mLの標準曲線用インスリン溶液を使用します。操作手順は5ページの通りです。

	標準曲線用インスリン溶液 (ng/mL)								
	12.8	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0
インスリン標準溶液	50								
検体希釈液	50	50	50	50	50	50	50	50	50
総液量	100	100	100	100	100	100	100	100	100

(μ L)

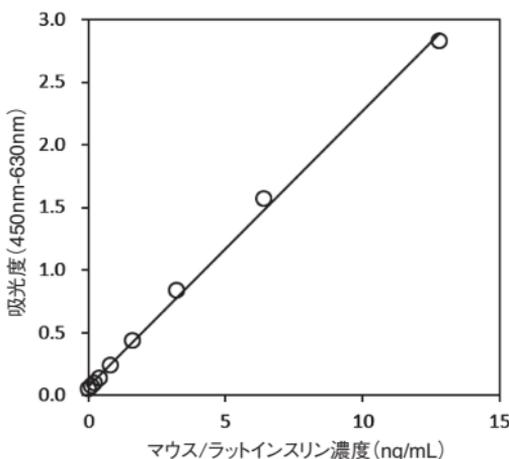


図2 より広い検出範囲で測定したインスリン標準曲線の例

■高インスリン濃度測定法

インスリン濃度の高い検体に対応した測定方法

インスリン濃度の高い検体を測定する場合、1～64ng/mLの範囲で検体を希釈せずに測定することができます。この場合は4ページのインスリン標準溶液及び酵素標識抗マウス/ラットインスリン抗体溶液の調製法を次のように変更してください。

インスリン標準溶液

B 凍結乾燥マウス/ラットインスリン標準品に 40 μ L の蒸留水またはイオン交換水を加えて溶解してください。インスリン標準溶液は64ng/mLになります。そのインスリン標準溶液を下記に示すように **G 検体希釈液** で希釈してください。

	標準曲線用インスリン溶液 (ng/mL)							
	64	32	16	8	4	2	1	0
インスリン標準溶液	40							
検体希釈液	0	20	20	20	20	20	20	20
総液量	40	40	40	40	40	40	40	40

(μ L)

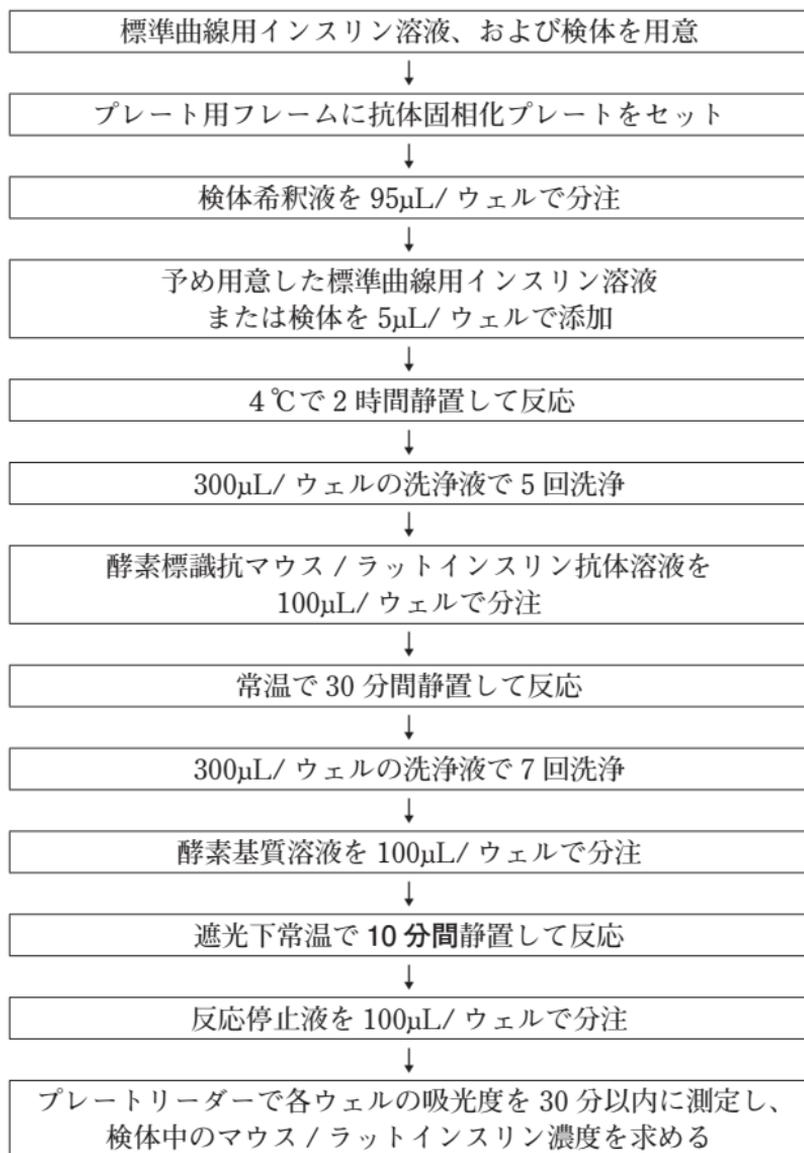
酵素標識抗マウス/ラットインスリン抗体溶液 (使用直前に調製)
使用する直前に **C 酵素表標識抗マウス/ラットインスリン抗体原液** と **D 酵素標識抗体希釈液** を 2:1 の割合で混和し、それを **G 検体希釈液** で 指定の希釈倍率になるように 希釈、調製してください。

酵素標識抗マウス/ラットインスリン抗体溶液を調製する際の希釈倍率は製品のロットごとに異なります。
製品ロットごとの希釈倍率は弊社ホームページにてご確認ください。

製品ロットごとの希釈倍率は、弊社ホームページ [超高感度マウス/ラットインスリン測定キット] 中の [取扱説明書] ページ
マウス：<https://www.miobs.com/product/dobutsu/01/manual.html>
ラット：<https://www.miobs.com/product/dobutsu/02/manual.html>
にてご確認ください。

測定手順は5、6ページに準じますが、酵素反応の反応時間が異なりますので14ページの測定操作手順の概略をご参照ください。

■測定操作手順【高インスリン濃度測定法の場合】の概略



■インスリン濃度の算出法【高インスリン濃度測定法の場合】

1. 二重測定した各ウェルの吸光度の平均値を算出します。
2. 標準曲線用インスリン溶液の各インスリン濃度を横軸に、標準曲線用インスリン溶液のそれぞれの吸光度を縦軸にプロットし、標準曲線を作成します。
グラフ描画ソフトウェアを用いて標準曲線を作成する場合は、4-パラメーターロジスティック回帰をお勧めします。
3. 標準曲線より各検体中のマウス/ラットインスリン濃度を読みとります。

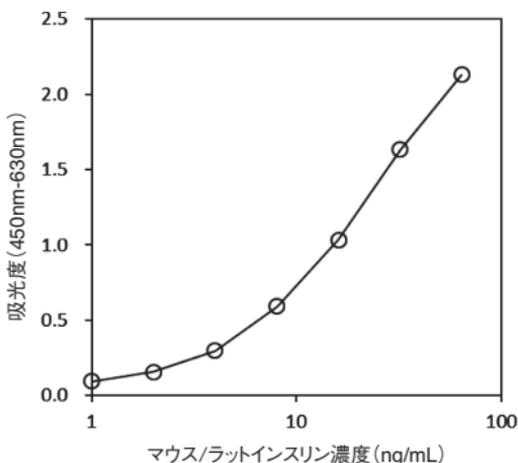


図3 高インスリン濃度測定法の標準曲線の例

■キットの保存条件および有効期限

1. 2～8℃で光の当たらない場所に保管してください。
(凍結厳禁)
2. キットは有効期限内に使用してください。
有効期限はラベルに記載してあります。
3. 一度開封した試薬は、1週間以内に使用してください。

■使用上または取り扱い上の注意

1. ロット番号の異なる試薬を組み合わせず使用しないでください。
2. 測定の際は必ず標準曲線用インスリン溶液を同時に測定し、測定の都度標準曲線を作成してください。
3. 反応停止液、酵素基質溶液を取り扱う場合、溶液と接触する部分に金属が使用されていないものを使用してください。
4. 反応停止液は1N硫酸であり、酵素基質溶液は過酸化水素を含むので、これらの試薬の取扱いの際は手や粘膜に付かないようご注意ください。
5. 試薬が誤って手や粘膜についた場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。
6. 一部の試薬には動物の血清が使用されていますので、取り扱いにご注意ください。
7. 検体を保存する場合はできるだけ低温で凍結保存し、凍結融解は繰り返さないようにしてください。



Morinaga Ultra Sensitive Mouse/Rat Insulin ELISA Kit

For the quantitative determination of insulin
in mouse/rat serum, plasma, and fluid.

96 wells

For Research or Laboratory Use Only.

Not for Use in Diagnostic Procedures.

Please read full descriptions in this manual before use.

Manufactured by:

Morinaga Institute of Biological Science (MIoBS)

2-1-1 Shimosueyoshi, Tsurumi-ku, Yokohama-shi, 230-8504, Japan

E-mail: info_miobs_e@morinaga.co.jp

Website: <https://www.miobs-e.com>

TABLE OF CONTENTS

<i>A. Intended Use</i>	20
<i>B. Introduction</i>	20
<i>C. Principles of the Assay</i>	21
<i>D. Kit Storage</i>	21
<i>E. Assay Materials</i>	
E.1. Materials supplied.....	22
E.2. Materials required but not provided.....	22
<i>F. Reagent Precautions</i>	23
<i>G. Maximizing Kit Performance</i>	23
<i>H. Preparation of Mouse/Rat Plasma and Serum</i>	23
<i>I. ELISA Assay (0.1 – 6.4 ng/mL)</i>	
I.1. Preparation of reagents.....	24
I.2. Preparation of working mouse/rat insulin standards.....	25
I.3. Assay procedure	26
I.4. Determining the insulin concentration.....	27
I.5. Expanding Assay Range (0.1 – 12.8 ng/mL).....	28
<i>J. Appendix</i>	
J.1. Performance characteristics.....	29
J.2. Summary of reagent preparation	29
J.3. Summary of ELISA assay	30
<i>Warranty</i>	31

A. Intended Use

The Morinaga Ultra Sensitive Mouse/Rat Insulin ELISA kit is for the quantitative determination of insulin in mouse/rat serum, plasma, and fluid. Please read full descriptions in this manual before performing this assay. The kit is for *Laboratory use only*. It is not intended for use in clinical or diagnostic procedures or for internal or external use in humans or animals.

B. Introduction

Insulin is the primary hormone produced in the β cells of the islets of Langerhans, and is known not only to regulate glucose metabolism, *i.e.* the uptake of blood glucose to the liver and peripheral tissues, but also play other important physiological roles.

Recent increases in the incidence of diabetes and obesity have stimulated intensive research on insulin levels and production. As a result, the accurate measurement of insulin in experimental animals is becoming increasingly important.

The kit is a simple, precise, and sensitive ELISA sandwich assay for mouse/rat insulin.

C. Principles of the Assay

1. First reaction

Mouse/rat insulin in the sample is bound to the guinea pig anti-insulin antibody coated on the microplate well.

2. Washing

Unbound material is removed by washing.

3. Second reaction

Horse radish peroxidase (POD)-conjugated anti-insulin antibody is then bound to the guinea pig anti-insulin antibody mouse/rat insulin complex immobilized to the microplate well.

4. Washing

Excess POD-conjugate is removed by washing.

5. Enzyme reaction

The bound POD conjugate in the microplate well is detected by the addition of the 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution.

6. Measurement of absorbance

7. Evaluation of results

The insulin concentration is determined via interpolation using the standard curve generated by plotting absorbance versus the corresponding concentration of mouse/rat insulin standard.

D. Kit Storage

1. Upon receipt of the Morinaga Ultra Sensitive Mouse/Rat Insulin ELISA kit, store it at 2-8°C and avoid light exposure (do not freeze the kit or hold it at temperatures above 25°C).
2. The kit should not be used after the expiration date.

E. Assay Materials

E.1. Materials supplied

TABLE 1 Contents of the kit

Mark	Description	Amount
A	Antibody-coated Microplate (One pack contains 6 x 8 well modules, <i>i.e.</i> 48 wells / pack)	2 packs
B	Mouse/Rat Insulin Standard, Lyophilized	2.56 ng/vial (for 100 μ L)
C	Anti-Insulin Enzyme Conjugate Stock Solution	1 bottle (8 mL)
D	Enzyme Conjugate Diluent	1 bottle (4 mL)
E	Enzyme Substrate (TMB) Solution	1 bottle (13 mL)
F	Enzyme Reaction Stop Solution (1 N Sulfuric Acid)	1 bottle (13 mL)
G	Sample Diluent	1 bottle (30 mL)
H	Wash Buffer Stock Solution (20x Concentrate)	1 bottle (50 mL)
	Frame for affixing the microplate well module	1 piece
	Plastic microplate cover	1 piece

E.2. Materials required but not provided

Micropipettes and disposable tips

Volumetric flasks

Distilled or deionized water

Polypropylene microtubes

Test tube racks

Vortex mixer

Aspirator for washing procedure

Microplate reader (capable of measuring A_{450} and A_{630} values)

F. Reagent Precautions

1. Avoid direct contact with the Enzyme Substrate Solution (marked “E”) and the Enzyme Reaction Stop Solution (marked “F”). In case of contact, immediately flush eyes or skin with plenty of water and get medical advice.
2. Do not allow the Enzyme Substrate Solution (marked “E”) to contact any metal.
3. Only appropriately-trained personnel should use the kit. Laboratory personnel should wear suitable protective clothing. All chemicals should be considered potentially hazardous.

G. Maximizing Kit Performance

1. Given the small sample volumes required (5 μ L), pipetting should be done as carefully as possible. A high quality 10 μ L or better precision pipette should be used for such volumes. Drops of liquid adhering to the outside of the pipette tips should be removed by wiping to ensure the highest degree of accuracy.
2. In order to prevent the microplate wells from drying out, samples and reagents should be dispensed quickly into the wells. In no case should 10 minutes be exceeded per plate per pipetting step.
3. The wash procedure should be done thoroughly in order to minimize background readings.
4. Each standard and sample should be assayed in duplicate.
5. The same sequence of pipetting and other operations should be maintained in all procedures.
6. Do not mix reagents that have different lot numbers.

H. Preparation of Mouse/Rat Plasma and Serum

Plasma: Collect blood into a tube containing an anticoagulant such as heparin (final concentration: 1 unit/mL), EDTA (final concentration: 0.1%), or sodium citrate (final concentration: 0.76%), and centrifuge at 4°C for 20 min at 2,000 x g.

Serum: Collect blood, allow to clot, and centrifuge at 4°C for 20 min at 2,000x g.

Note: *Be sure to avoid hemolysis during preparation. Do not use turbid serum or plasma samples. Turbid serum or plasma should be centrifuged to produce a clear solution. Samples which need to be diluted must be diluted using the Sample Diluent (marked “G”).*

I. ELISA Assay (0.1 – 6.4 ng/mL)

I.1. Preparation of reagents

Prior to use, all reagents should be brought to room temperature (18-25°C), and should be stored at 2-8°C immediately after use. Before use, mix the reagents thoroughly by gentle agitation or swirling.

1. Antibody-coated microplate

Remove the “Antibody-coated Microplate” (marked “A”) from the sealed foil pouch after the pouch has been equilibrated to room temperature.

Note: *The microplate must be used the same day as the pouch is opened.*

2. Mouse/rat insulin stock solution

Reconstitute the “Mouse/Rat Insulin Standard, Lyophilized” (marked “B”) by careful addition of 100 µL of distilled or deionized water to the vial. Invert the vial gently until the contents are completely dissolved. This stock solution contains 25.6 ng/mL of mouse/rat insulin. The reconstituted mouse/rat insulin stock solution is stable for one week at 2-8°C.

3. Anti-insulin enzyme conjugate

For six modules, prepare the needed volume of anti-insulin enzyme conjugate solution by mixing 3.6 mL of “Anti-Insulin Enzyme Conjugate Stock Solution” (marked “C”) with 1.8 mL of “Enzyme Conjugate Diluent” (marked “D”), and mix completely to ensure a homogeneous and clear solution. Avoid foaming during mixing.

Note: *The anti-insulin enzyme conjugate should be prepared just before the second reaction and must be used immediately.*

4. Enzyme substrate solution

The “Enzyme Substrate Solution” (marked “E”) is provided as a ready-to-use preparation. Once the bottle is opened, the enzyme substrate solution is stable for one week at 2-8°C.

Note: *Avoid exposure of the enzyme substrate solution to light.*

5. Enzyme reaction stop solution (1 N sulfuric acid)

The “Enzyme Reaction Stop Solution” (marked “F”) is provided as a ready-to-use preparation.

6. Sample diluents

The "Sample Diluent" (marked "G") is provided as a ready-to-use preparation. Once the bottle is opened, the sample diluent is stable for one week at 2-8°C.

7. Wash buffer

The "Wash Buffer Stock Solution" (marked "H") should be brought to 1 L with distilled or deionized water in a volumetric flask. Mix the solution well before use. The wash buffer is stable for one week at 2-8°C.

I.2. Preparation of working mouse/rat insulin standards

1. Pipette 150 μL of sample diluent (marked "G") and 50 μL of mouse/rat insulin stock solution (25.6 ng/mL) into a polypropylene microtube labeled 6.4 ng/mL and mix thoroughly.
2. Dispense 50 μL of sample diluent into six polypropylene microtubes labeled 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, and 3.2 ng/mL, respectively.
3. Dispense 50 μL of the 6.4 ng/mL standard into the 3.2 ng/mL microtube, and mix thoroughly.
4. Dispense 50 μL of the 3.2 ng/mL standard into the 1.6 ng/mL microtube, and mix thoroughly.
5. Repeat this dilution scheme using the remaining microtubes.
6. Dispense 50 μL of sample diluent into one polypropylene microtube labeled 0 ng/mL.

Note: *The working insulin standards should be prepared shortly before use and discarded after use. Prepare working insulin standards using polypropylene microtubes because polypropylene exhibits minimal adsorption of insulin.*

TABLE 2 Preparation of working mouse/rat insulin standards

	Mouse/Rat insulin concentration (ng/mL)							
	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0
ISS*(μL)	50							
SD**(μL)	150	50	50	50	50	50	50	50
		↙	↙	↙	↙	↙	↙	
Total (μL)	200	100	100	100	100	100	100	50

ISS*: Mouse/Rat Insulin Stock Solution (25.6 ng/mL)

SD** : Sample Diluent

I.3. Assay procedure

First reaction:

1. Remove the antibody-coated microplate modules (marked "A") from the sealed foil pouch after the pouch has been equilibrated to room temperature. Affix the microplates to the supporting frame.
2. In each well, dispense 95 μL of sample diluent (marked "G").
3. Pipette 5 μL samples (or 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, and 6.4 ng/mL working mouse/rat insulin standards) into the wells.

Note: *Each standard and sample should be assayed in duplicate. It is also recommended that a 10 μL or better precision pipette be used when dispensing small volumes (5 μL).*

4. Cover the microplate with the plastic microplate cover and incubate for 2 hours at 4°C.

Second reaction:

5. Aspirate well contents and wash five times using 300 μL of wash buffer per well. After each wash, remove any remaining solution by inverting and tapping the plate firmly on a clean paper towel.
6. Dispense 100 μL per well of anti-insulin enzyme conjugate.
7. Cover the microplate with the plastic microplate cover and incubate for 30 minutes at room temperature.

Third reaction:

8. Aspirate well contents and wash seven times using 300 μL of wash buffer per well. After each wash, remove any remaining solution by inverting and tapping the plate firmly on a clean paper towel.
9. Immediately dispense 100 μL per well of enzyme substrate solution (marked "E") and react for 40 minutes at room temperature. During the enzyme reaction, avoid exposing the microplate to light.
Note: *Do not cover the microplate with aluminum foil.*
10. Stop the enzyme reaction by adding 100 μL per well of enzyme reaction stop solution (marked "F").
11. Measure absorbance within 30 minutes using a plate reader. (Measure A_{450} values and subtract A_{630} values).

I.4. Determining the insulin concentration

1. Determine the mean absorbance for each set of duplicate standards or samples.

Note: *If individual absorbance values differ from the mean by greater than 20%, performing the assay again is recommended. The mean absorbance of the 0 ng/mL standard should be less than 0.1.*

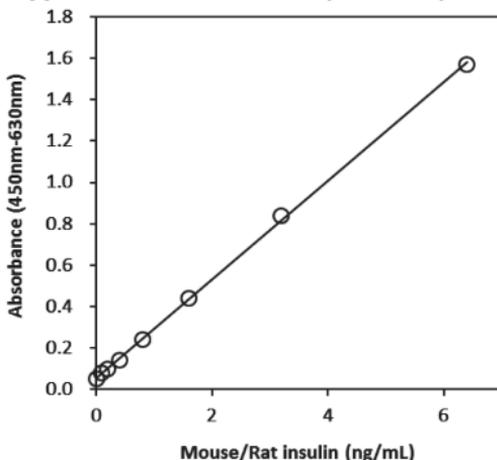
2. Using graphing software, the built-in graphing feature of the microplate reader, or linear graph paper, construct the insulin standard curve by plotting the mean absorbance value for each standard on the Y axis versus the corresponding standard mouse/rat insulin concentration on the X axis. Figure 1 is an example of a typical standard curve generated by the ELISA assay.

Note: *A standard curve should be plotted every time the assay is performed. For computer processing of the data, a 4-parameter curve fit (Cubic regression) is recommended and a liner curve fit is also available.*

3. Mouse/rat insulin concentrations in the samples are interpolated using the standard curve and mean absorbance values for each sample.

Note: *Samples with a high insulin concentration (6.4 ng/mL or higher) should be diluted with the sample diluents and rerun.*

Figure 1. A typical standard curve (linear fit)



I.5. Expanding assay range (0.1-12.8 ng/mL)

In case in which samples are believed to contain an insulin concentration higher than 6.4 ng/mL (*i.e.* the highest standard), assay range can be expanded from 0.1-6.4 ng/mL to 0.1-12.8 ng/mL.

Note: This assay procedure is intended for screening purposes. It is recommended that samples with a reading of 6.4 ng/mL or higher be diluted and rerun using the ELISA assay in order to obtain accurate values.

Note: To construct an insulin standard curve, it is recommended to use either 4-parameter, 5-parameter, Log/Logit or cubic spline curves.

Prepare working mouse/rat insulin standard as Table 3.

TABLE 3 Preparation of working mouse/rat insulin standards

	Mouse/Rat insulin concentration (ng/mL)								
	12.8	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0
ISS*(μ L)	50								
SD**(μ L)	50	50	50	50	50	50	50	50	50
		↖	↖	↖	↖	↖	↖	↖	
Total (μ L)	100	100	100	100	100	100	100	100	50

ISS*: Mouse/Rat Insulin Stock Solution (25.6 ng/mL)

SD** : Sample Diluent

J. Appendix

J.1. Performance characteristics

1. Precision: The intra-assay precision C.V. \leq 10%
The inter-assay precision C.V. \leq 10%
2. Recovery: When mouse/rat insulin was spiked in a 5 μ L mouse/rat serum sample, the recovery was 100% \pm 15%.

J.2. Summary of reagent preparation

TABLE 4 Summary of reagent preparation

Reagent	Preparation Procedure
A: Antibody-coated Microplate	Ready to use
B: Mouse/Rat Insulin Standard, Lyophilized	Dilute with 100 μ L of water*
C: Anti-Insulin Enzyme Conjugate Stock Solution	For 6 modules** 3.6 mL
D: Enzyme Conjugate Diluent	For 6 modules** 1.8 mL
E: Enzyme Substrate (TMB) Solution	Ready to use
F: Enzyme Reaction Stop Solution (1N Sulfuric Acid)	Ready to use
G: Sample Diluent	Ready to use
H: Wash Buffer Stock Solution (20X Concentrate)	Bring contents of the bottle to 1 L with water*

Note: All reagents should be brought to room temperature (18-25°C) prior to use.

* Distilled or deionized water.

** Prepare just before the second reaction.

J.3.Summary of ELISA assay

Affix the Antibody-coated Microplate (marked “A”) to the frame.



Dispense 95 μL of Sample Diluent (marked “G”) per well.



Pipette 5 μL of the sample
(or working mouse/rat insulin standard) per well.



Incubate the microplate for 2 hours at 4°C.



Wash each well five times with wash buffer*.



Dispense 100 μL of anti-insulin enzyme conjugate per well.



Incubate the microplate for 30 min at room temperature.



Wash each well seven times with wash buffer*.



Dispense 100 μL of Enzyme Substrate Solution
(marked “E”) per well.



Incubate microplate for 40 min at room temperature
while avoiding exposure to light.



Stop the enzyme reaction by adding 100 μL of Enzyme
Reaction Stop Solution (marked “F”) per well.



Measure A_{450} and subtract A_{630} values within 30 min.



Calculate insulin concentrations using the standard curve.

* Each well should be washed with 300 μL of wash buffer. Aspirate the wells completely so all excess solution is removed.

Warranty

Morinaga Institute of Biological Science, Inc. makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Buyer assumes all risk and liability resulting from the use of this product.

THERE IS NO WARRANTY OF MERCHANTABILITY OF THE PRODUCTS, OR THAT SUCH PRODUCTS ARE FIT FOR ANY PARTICULAR PURPOSE. MORINAGA INSTITUTE OF BIOLOGICAL SCIENCE, INC.'S LIABILITY SHALL NOT EXCEED THE RETURN OF THE PURCHASE PRICE, AND UNDER NO CIRCUMSTANCES SHALL MORINAGA INSTITUTE OF BIOLOGICAL SCIENCE, INC. BE LIABLE FOR SPECIAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES, OR EXPENSES ARISING DIRECTLY OR INDIRECTLY FROM THE USE OF THIS PRODUCT.

