



研究用試薬

---

モリナガ 超高感度“PLUS”  
マウスインスリン測定キット  
(Cat.# M1105)

---

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](mailto:info_miobs@morinaga.co.jp)

## キットの構成

	品名	容量	数量
A	抗体固相化プレート	96 ウェル	1 パック
B	凍結乾燥マウスインスリン標準品	2.56 ng	1 本
C	標準品希釈液	3 mL	1 本
D	検体希釈液	13 mL	1 本
E	酵素標識抗インスリン抗体溶液	6 mL	1 本
F	酵素基質溶液 (TMB 溶液)	13 mL	1 本
G	反応停止液 (1N 硫酸)	13 mL	1 本
H	20 倍濃縮洗浄液 (1000mL 用)	50 mL	1 本
	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  $\mu$ L ~ 1000  $\mu$ 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. インスリン濃度が 0.025ng/mL から測定可能です。

2. 5  $\mu$ L の検体で測定が可能です。

\*注意 ピペッティング誤差にご注意ください。

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

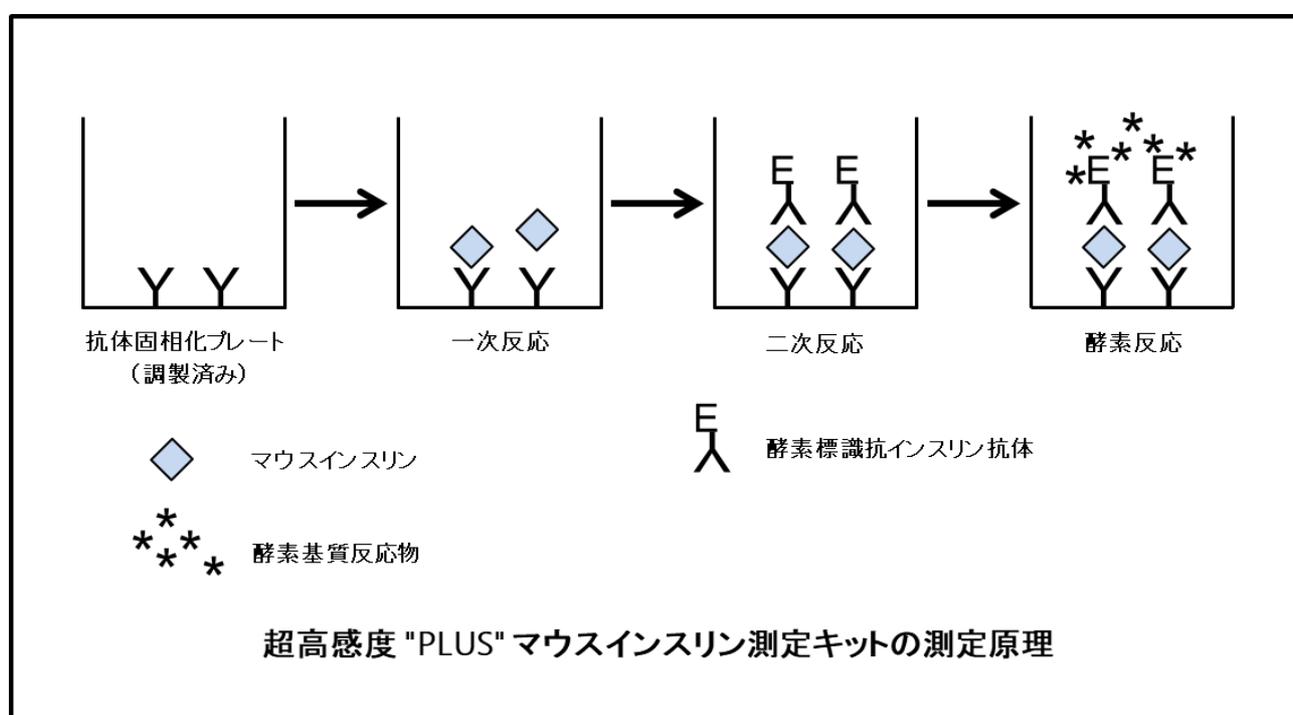
特別な施設・設備等を必要とせず、通常の実験室で測定可能です。

## 測定原理

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

**二次反応**：酵素標識抗インスリン抗体が複合体上のマウス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 凍結乾燥マウスインスリン標準品に 100  $\mu$ L の C 標準品希釈液を加えて溶解してください。  
インスリン標準溶液は 25.6 ng/mL となります。

### D 検体希釈液

そのまま使用してください。

#### E 酵素標識抗インスリン抗体溶液

そのまま使用してください。

#### F 酵素基質溶液

そのまま使用してください。

#### G 反応停止液

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

測定は**二重測定**以上をおすすめします。

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およ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 C 標準品希釈液で希釈し、下記に示すように 6.4ng/mL から 0ng/mL の標準曲線用インスリン溶液を調製してください。

測定には、1.6ng/mL から 0ng/mL のインスリン溶液を使用します。

	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	0.05	0.025	0
インスリン標準溶液	50									
標準品希釈液	150	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		↙100	↙100	↙100	↙100	↙100	↙100	↙100	↙100	
総液量	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200

( $\mu$ L)

### 一次反応

1. A 抗体固相化プレートを準備します。
2. 各ウェルに D 検体希釈液を 45  $\mu$ 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  $\mu$ L ずつ添加します。  
(一次反応の全液量は 50  $\mu$ 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注意してください。
4. 付属のプレート用ふたをして常温で 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 180  $\mu$ L ずつの洗浄液で 5 回洗浄します。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上で叩いて水分を除いてください。
  6. **E 酵素標識抗インスリン抗体溶液**を各ウェルに 50  $\mu$ 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 180  $\mu$ L ずつの洗浄液で 7 回洗浄します。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上で叩いて水分を除いてください。
  9. **F 酵素基質溶液**を各ウェルに 50  $\mu$ 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. **G 反応停止液**を各ウェルに 50  $\mu$ 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。インスリン濃度の算出法については、5 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。

### 【プレート洗浄時の注意点】

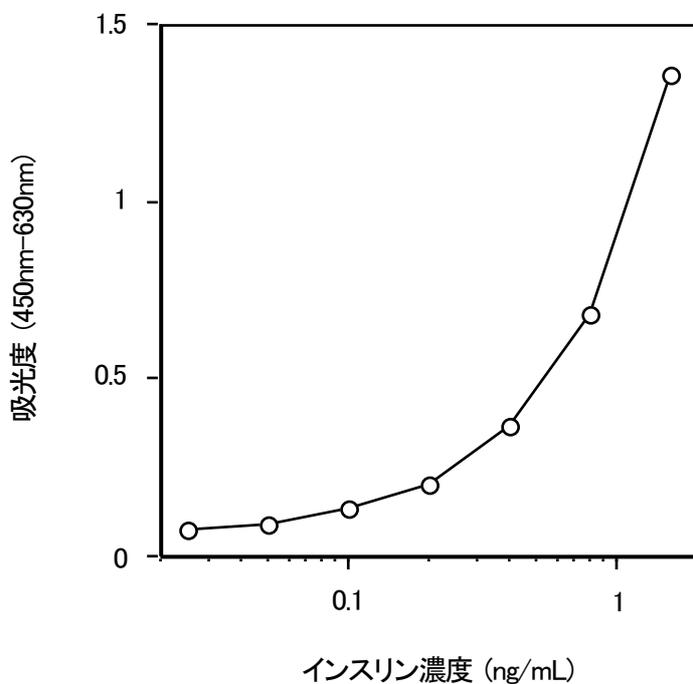
効果的なプレート洗浄を行うことにより、より精度の高い測定結果が得られます。  
以下の注意事項を参考にしてください。

- 洗浄は出来る限り素早く行い、ウェルが乾かないようにしてください。
- 洗浄液の分注に 8 連ピペッターで緩やかに吐出する方法では十分な洗浄効果が得られない場合があります。  
洗浄液を分注する場合、弊社ホームページの「便利な機器紹介」  
(<https://www.miobs.com/introduction/index.html>) でご紹介している ELISA 洗浄用ディスペンサーのご使用をお勧めいたします。
- ウェルに洗浄液を分注する際は、チップ等の吐出口の先をウェルの壁面につけて勢いよく吐出してください。
- デカントで溶液を捨てる場合、ウェル内の溶液を取り除いたら、その都度ペーパータオルの上でプレートを叩いて完全に溶液を取り除いてください。ペーパータオルは濡れたら交換してください。
- 洗浄機使用の場合は、全ての洗浄が終了したときにペーパータオルの上でプレートを叩いて、完全に溶液を取り除いてください。
- プレートの裏面が洗浄液等で汚れた場合は、速やかに拭き取ってください。
- 反応停止後は速やかに吸光度を測定してください。

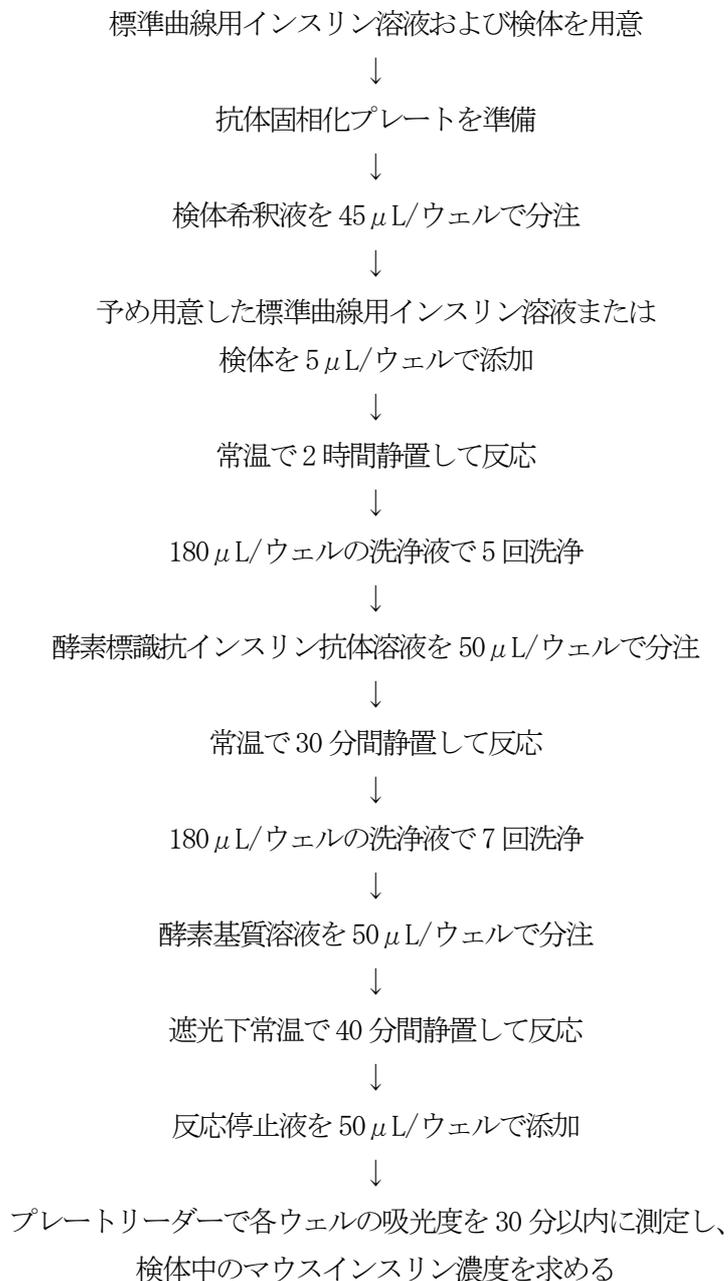
## インスリン濃度の算出法

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、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 **D 検体希釈液** で希釈し再度測定してください。

インスリン標準曲線の例



## 測定操作手順の概略



洗浄の際は、ウェル内に残った溶液を完全に取り除くため、  
プレートを清潔なペーパータオルなどに叩きつけて  
水分を除いてください。

## **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、必ず一週間以内に使用してください。

## **使用上又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て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、測定の都度検量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出来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。