



研究用試薬

モリナガ
マウス C-ペプチド測定キット
(Cat.# M1304)

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 11.

■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 C-ペプチド標準品	2.56 ng	2 本
C	酵素標識抗マウス C-ペプチド抗体溶液	13mL	1 本
D	酵素基質溶液(TMB溶液)	13mL	1 本
E	反応停止液(1N硫酸)	13mL	1 本
F	検体希釈液	30mL	1 本
G	20 倍濃縮洗浄液(1000mL 用)	50mL	1 本
	プレート用フレーム		1 個
	プレートシール		3 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 C-ペプチド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

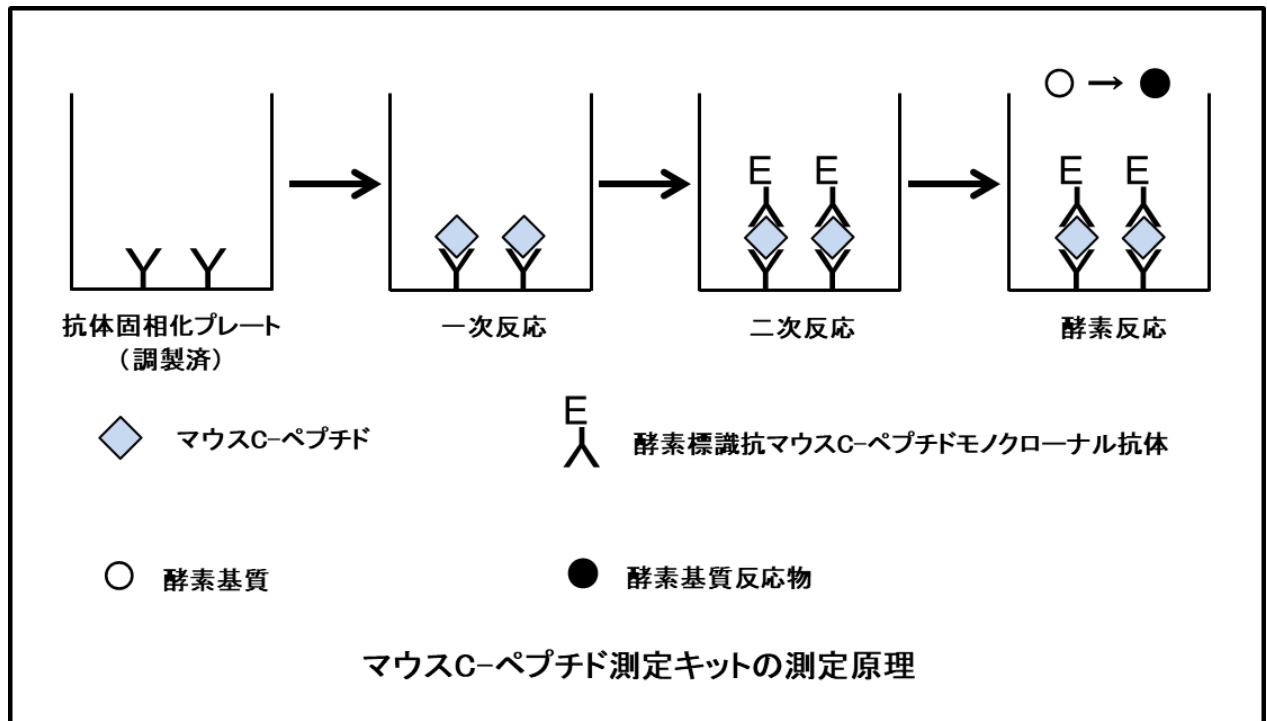
1. マウス血清・血漿・尿および培養上清中のマウス C-ペプチドを定量的に測定します。
2. マウス C-ペプチド 1 および 2 と同等に反応する抗体を用いているため、総 C-ペプチド量を正確に測定できます。
3. 5 μ L/ウェルの検体で測定が可能です。
* 注意 ピペティング誤差にご注意ください。
4. マイクロプレートを使用したサンドイッチ ELISA 法であるため特別な施設・設備等を必要とせず、通常の実験室で測定可能です。

■測定原理

一次反応：検体中のマウスC-ペプチドが、プレート上の固相化抗マウスC-ペプチドポリクローナル抗体と結合し、固相化抗マウスC-ペプチド抗体-マウスC-ペプチドの複合体を形成する。

二次反応：酵素標識抗マウスC-ペプチドモノクローナル抗体が複合体上のマウスC-ペプチドに結合する。

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C-ペプチド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

室温(20-30°C)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。

標準曲線用 C-ペプチド溶液

B 凍結乾燥マウス C-ペプチド標準品に **F 検体希釈液**を 200 μ L 加えて溶解してください。12.8ng/mL C-ペプチド標準溶液となります。溶解後は直ちに使用してください。

C-ペプチド標準溶液を **F 検体希釈液**で下表に従い希釈し、0ng/mL から 6.4ng/mL の標準曲線用 C-ペプチド溶液を調製してください。

	標準曲線用 C-ペプチド溶液 (ng/mL)								
	12.8	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0
C-ペプチド標準溶液	200								
検体希釈液		100	100	100	100	100	100	100	100
総液量	200	200	200	200	200	200	200	200	200

(μ L)

C 酵素標識抗 C-ペプチド抗体溶液

そのまま使用してください。

D 酵素基質溶液

そのまま使用してください。

E 反応停止液

そのまま使用してください。

F 検体希釈液

そのまま使用してください。

洗浄液

G 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で行ってください。

全ての試薬は室温(20-30°C)に戻してから使用してください。

ピペ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。

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 **F 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 C-ペプチド溶液**(4 ページの「試薬の調製法」に従い調製したもの) 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. 付属のプレートシールで密閉して平らな台の上でプレートを攪拌し、ウェル内の溶液を十分に混和させます。(マイクロプレートミキサーを使用して攪拌することをお勧めいたします)。
*** 注意** 攪拌が十分でない場合は、測定値がばらつく可能性があります。
5. 室温(20-30°C)で1時間静置して反応させます。

二次反応:

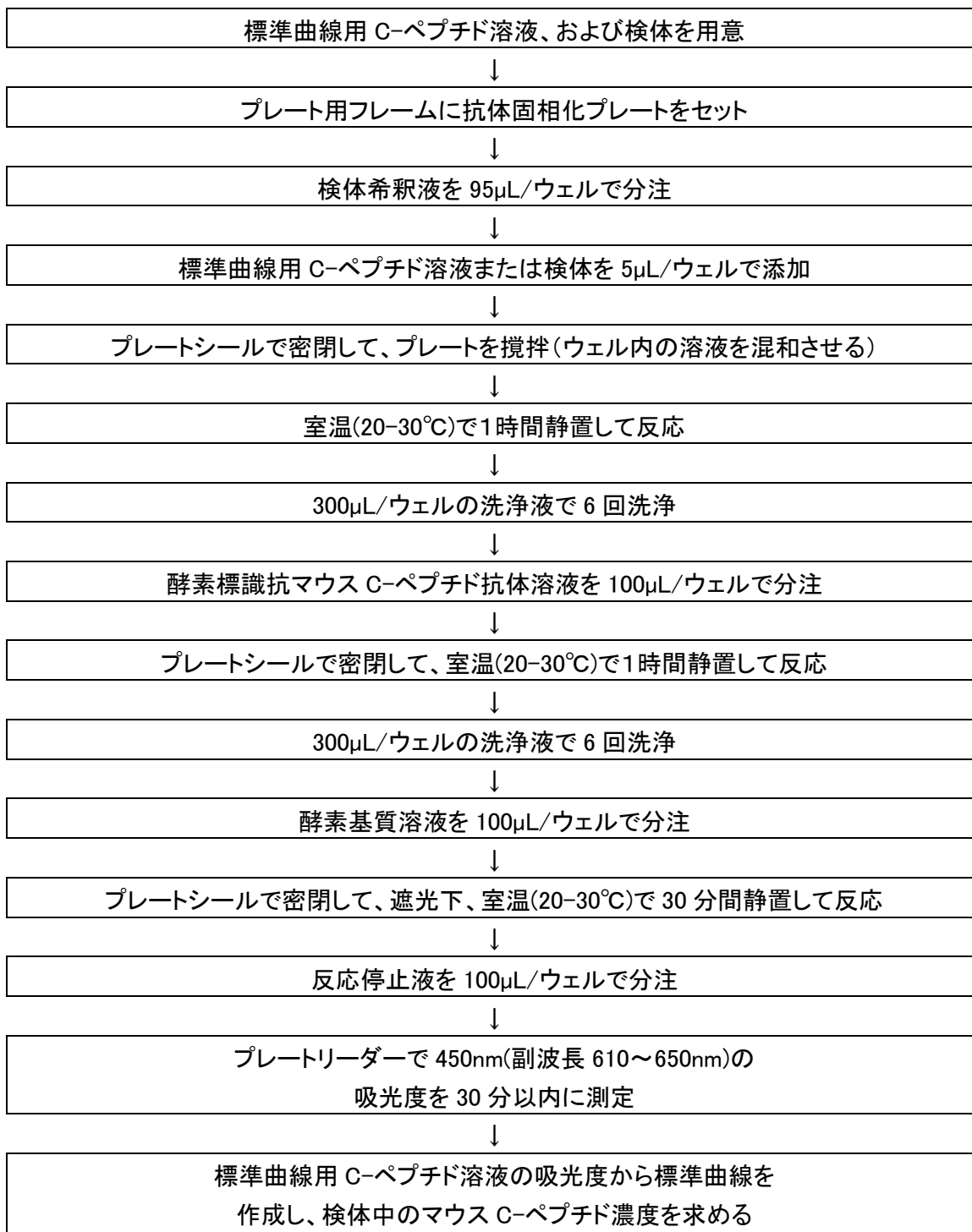
6. ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 300 μ L の洗浄液で 6 回洗浄します。ウェル内に残った溶液を完全に除くため、プレートを清潔なペーパータオルなどに押しつけるようにして水分を除いてください。
7. **C 酵素標識抗マウス C-ペプチド抗体溶液**を各ウェルに 100 μ L ずつ分注します。
8. プレートシールで密閉して室温(20-30°C)で1時間静置して反応させます。

酵素反応:

9. 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 6 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などに押しつけるようにして水分を除いてください。
10. **D 酵素基質溶液**を各ウェルに 100 μ L ずつ分注します。
11. プレートシールで密閉して遮光下、室温(20-30°C)で正確に 30 分間静置して反応させます。
12. **E 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。
13. プレートのリーダーで各ウェルの吸光度を測定します。
14. 標準曲線用 C-ペプチド溶液の吸光度より標準曲線を作成し、検体中のマウス C-ペプチド濃度を求めます。C-ペプチド濃度の算出法については、7 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。

■測定操作手順の概略

測定は二重測定以上で行ってください。



* 注意 洗浄の際は、ウェル内に反応液や洗浄液を残さないようにしてください。

■C-ペプチド濃度の算出法

1. 各濃度の標準曲線用 C-ペプチド溶液および検体について、吸光度の平均値を算出します。
2. グラフの横軸に標準曲線用 C-ペプチド溶液の各 C-ペプチド濃度を、縦軸に標準曲線用 C-ペプチド溶液のそれぞれの吸光度平均値をプロットし、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パラメーターを使用することをお勧めいたします。
3. 標準曲線より各検体中の C-ペプチド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範囲を超えた場合は、検体を検体希釈液で希釈して再度測定してください。

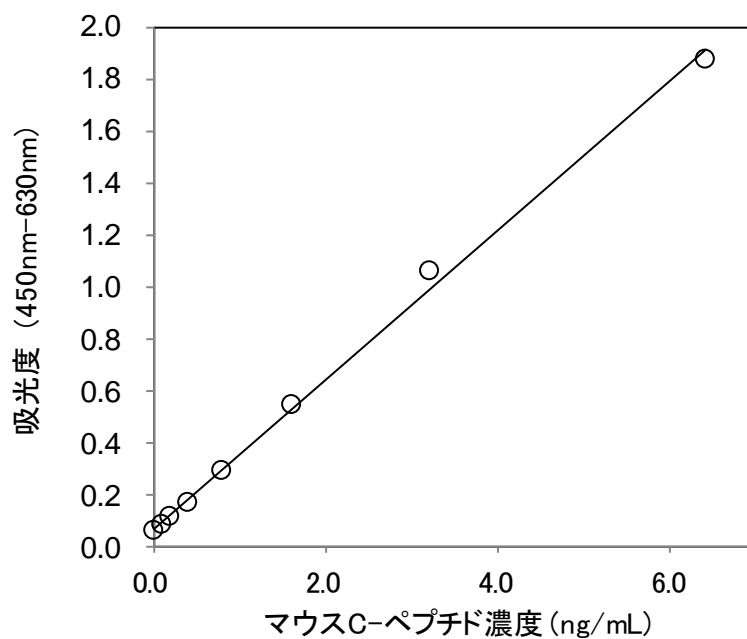


図1 標準曲線の例(直線回帰)

■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使用しないでください。
2. 測定の際は必ず標準曲線用 C-ペプチド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、凍結融解を繰り返さないようにしてください。

