

[LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type)]

Cat # 631-07231

Please, read this instruction carefully before use.

This kit is manufactured by FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation. Use only the current version of Instruction Manual enclosed with the kit!

1. Intended use

LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type) is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of mouse C-peptide. This is for research use only.

2. Storage and expiration

When the complete kit is stored at 2 °C - 8 °C, the kit is stable until the expiration date shown on the label on the box. Opened reagents should be used as soon as possible to avoid loss in optimal assay performance caused by storage environment.

3. Introduction

Insulin is first synthesized as a single chain polypeptide, proinsulin, then three disulfide bonds are formed, and finally divided into insulin and C-peptide through enzymatic splitting. Mouse C-peptide 1 is a single chain peptide composed of 29 amino acids, while C-peptide 2 is composed of 31 residues. C-peptide is secreted together with insulin. The role of C-peptide has been considered to keep the best configuration to form three disulfide bonds, and has no biological activity, however, recent studies revealed that C-peptide can bind, probably, a G-protein-coupling specific receptor present on the surface of endothelial cells, kidney microtubule cells and fibroblasts, resulting in activation of calcium-dependent intracellular signaling, activation of Na⁺-K⁺-ATPase, and enhancement of NO synthesis. Administration of C-peptide to DM1 patients enhances blood circulation in the skeletal muscle and skin, and also minimizes kidney glomerular hyperfiltration, decreasing albumin excretion into urine, and also improves nervous function, indicating that C-peptide should be given together with insulin to DM1 patients. Important region to bind receptor has been reported to be C-terminal pentapeptide (27-31).

The biological half life of C-peptide is several times longer than that of insulin. Measurement of C-peptide is useful in estimation of pancreatic function for insulin synthesis and secretion. Urinary C-peptide concentration is well correlated to its blood level. C-peptide measurement is also useful in estimation of insulin secretion by cultured islet of Langerhans because very often insulin is added to the culture medium, and it is difficult to discriminate secreted insulin from added insulin. As FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's kit recognizes the common sequences between C-peptide 1 and 2, it can measure total amount of C-peptide.

4. Assay principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS Mouse C-Peptide ELISA Kit (U-type), standards or samples are incubated in monoclonal anti-C-peptide-coated wells to capture C-peptide. After 2 hours' incubation and washing, biotinylated anti-C-peptide antibody is added and incubated further for 2 hours' to bind with captured C-peptide. Then HRP (horse radish peroxidase)-conjugated streptavidin is added, and incubated for 30 minutes. After washing, HRP-conjugated streptavidin remaining in wells are reacted with a chromogen (TMB) for 30 minutes, and reaction is stopped by addition of acidic solution, and absorbance of yellow product is measured spectrophotometrically at 450 nm. The absorbance is proportional to C-peptide concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against standard C-peptide concentrations. C-peptide concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

5. Precautions

- For professional use only. Beginners are advised to use this kit under the guidance of experienced person.
- Do not drink, eat or smoke in the areas where assays are carried out.
- In treating assay samples of animal origin, be careful for possible biohazards.
- This kit contains components of animal origin. These materials should be handled as potentially infectious.
- Be careful not to allow the reagent solutions of the kit to touch the skin, eyes and mucous membranes. Especially be careful for the stop solution because it is sulfuric acid. The stop solution and the substrate solution may cause skin/eyes irritation. In case of contact with these wash skin/eyes thoroughly with water and seek medical attention, when necessary.
- Avoid contact with the acidic stop solution and chromogen (TMB) containing hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine. Wear gloves and eye and clothing protection when handling these reagents.
- The materials must not be pipetted by mouth.

LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type)

- Unused samples and used 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 an autoclave before disposal.
- Dispose consumable materials and unused contents in accordance with applicable regional/national regulatory requirements.
- Use clean laboratory glassware.
- In order to avoid dryness of wells, contamination of foreign substances and evaporation of dispensed reagents, never forget to cover the well plate with a plate seal supplied, during incubation.
- ELISA can be easily affected by your laboratory environment. Room temperature should be at 20 - 25 °C strictly. Avoid airstream velocity over 0.4 m/sec. (including wind from air conditioner), and humidity less than 30 %.

6. Reagents supplied

Components	State	Amount
(A) Anti-C-peptide coated plate	Use after washing	96 wells/1 plate
(B) Standard C-peptide solution (6000 pg/mL)	Concentrated. Use after dilution	500 µL/1 vial
(C) Buffer solution	Ready for use.	60 mL/1 bottle
(D) Biotinylated anti-C-peptide antibody	Concentrated. Use after dilution.	100 µL/1 vial
(E) HRP-conjugated streptavidin	Concentrated. Use after dilution.	100 µL/1 vial
(F) Chromogen (TMB)	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(H) Stop solution Be careful!	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(I) Wash stock solution (10×)	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle
Plate seal	—	4 sheets
Instruction Manual	—	1 copy

7. Equipments or supplies required but not supplied Use as a check box

- Deionized water (or Distilled water). Test tubes for preparation of standard solution series.
- Glassware for dilution of Wash stock solution (10×) (a graduated cylinder, a bottle)
- Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 10 µL precisely, and another for 10 µL -50 µL and 100µL -300 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 rpm -1200 rpm) An automatic washer for 96 well-plate (if available), or a wash bottle with a jet nozzle. A 96 well-plate reader (450 nm ±10 nm, 620 nm: 600 nm - 650 nm) Software for data analysis.

8. Preparation of reagents

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

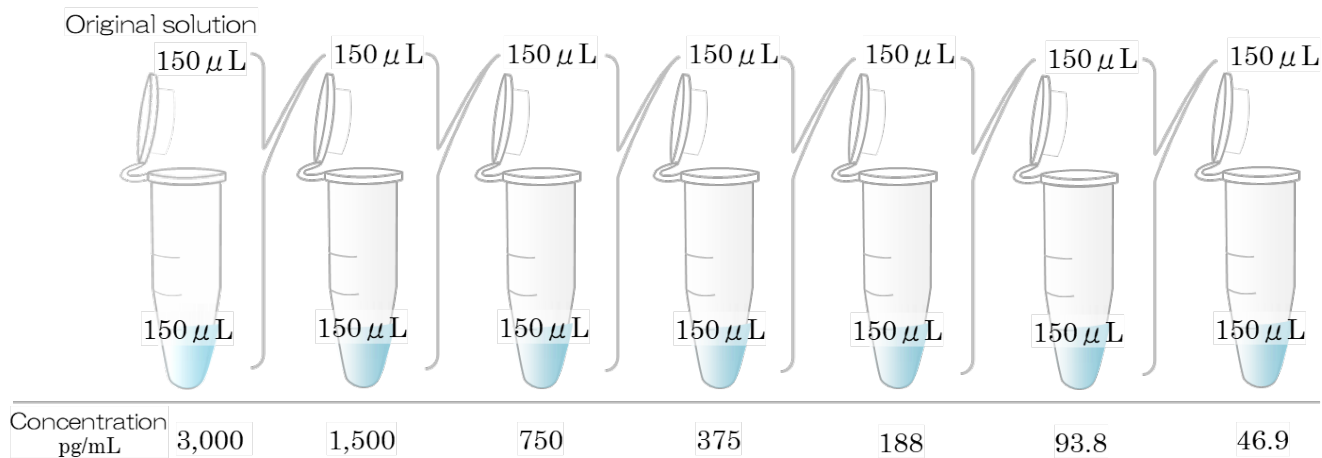
[Concentrated reagents]

[(B) Standard C-peptide solution (6000 pg/mL)]

Make a serial dilution of master standard (6000 pg/mL) solution to prepare each standard solution.

Volume of standard solution	(C) Buffer solution	Concentration (pg/mL)
Original solution: 150 µL	150 µL	3000
3000 pg/mL solution: 150 µL	150 µL	1500
1500 pg/mL solution: 150 µL	150 µL	750
750 pg/mL solution: 150 µL	150 µL	375
375 pg/mL solution: 150 µL	150 µL	188
188 pg/mL solution: 150 µL	150 µL	93.8
93.8 pg/mL solution: 150 µL	150 µL	46.9
0 (Blank)	150 µL	0

LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type)



[(D) Biotinylated anti-C-peptide antibody]

Prepare working solution by dilution of (D) with the (C) buffer solution to **1:100**.
10 mL of the diluted solution is enough for 96 wells.

[(E) HRP-conjugated streptavidin]

Prepare working solution by dilution of (E) with the (C) buffer solution to **1:100**.
10 mL of the diluted solution is enough for 96 wells.

[(I) Wash stock solution (10×)]

Dilute 1 volume of the concentrated Wash stock solution (10×) to **10 volume** with deionized water (or distilled water) to prepare working solution. Example: 100 mL of concentrated washing buffer (10×) and 900mL of deionized water (or distilled water).

[Storage and stability]

[(A) Anti-C-peptide coated plate]

If seal is not removed, put the strip back in a plastic bag with zip-seal originally used for well-plate container and store at 2 °C - 8 °C. The strip will be stable until expiration date.

[(B) Standard C-peptide solution (6000 pg/mL)]

Standard solutions prepared above should be used as soon as possible, and should not be stored. The rest of original standard: if stored tightly closed at 2 °C - 8 °C, it is stable until expiration date.

[(C) Buffer solution] & [(F) Chromogen (TMB)]

If not opened, store at 2 °C - 8 °C. It maintains stability until expiration date. Once opened, we recommend using as soon as possible to avoid influence by environmental condition.

[(D) Biotinylated anti-C-peptide antibody] & [(E) HRP-conjugated streptavidin]

Unused working solution (already diluted) should be disposed.

The rest of the undiluted solution: if stored tightly closed at 2 °C - 8 °C, it is stable until expiration date.

[(H) Stop solution]

Close the stopper tightly and store at 2 °C - 8 °C. It maintains stability until expiration date.

[(I) Wash stock solution (10×)]

The rest of undiluted buffer: if stored tightly closed at 2 °C - 8 °C, it is stable until expiration date.

Dispose any unused diluted buffer.

9. Technical tips

- In manual operation, proficiency in pipetting technique is recommended.
- The reagents are prepared to give accurate results only when used in combination within the same box. Therefore, do not combine the reagents from kits with different lot numbers. Even if the lot number is the same, it is best not to mix the reagents with those that have been preserved for some period.
- Be careful to avoid any contamination of assay samples and reagents. We recommend the use of disposal pipette tips, and 1 tip for 1 well.
- Optimally, the reagent solutions of the kit should be used immediately after reconstitution. Otherwise, store them in a dark place at 2 °C - 8 °C.
- Time the reaction from the pipetting of the reagent to the first well.
- Prepare a standard curve for each assay.
- Dilution of the assay sample must be carried out using the buffer solution provided in the kit.
- The chromogen (TMB) should be almost clear pale yellow before use. It turns blue during reaction, and gives yellowish color after addition of stop solution. Greenish color means incomplete mixing.
- To avoid denaturation of the coated antibody, do not let the plate go dry.
- As the anti-C-peptide-coated plate is module type of 8 wells × 12 strips, each strip can be separated by

LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type)

cutting the cover sheet with a knife and used independently.

- When ELISA has to be done under the airstream velocity over 0.4 m/sec. and the humidity less than 30 %, seal the well plate with a plate seal and place the well plate in an incubator or a styrofoam box in each step of incubation.

10. Preparation of samples

This kit is intended to measure C-peptide in mouse serum or plasma. The necessary sample volume for the standard procedure is 10 μL .

Samples should be immediately assayed or stored below $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ until assay. Defrosted samples should be mixed thoroughly for best results. Do not repeat freeze and thaw cycles of samples. It may cause improper results.

Hemolytic and hyperlipemic serum samples are not suitable.

*** To avoid influence of blood (high lipid or hemolysis, etc.), if your original samples have heavy chyle or hemolysis, do not use them for assay. Abnormal value might be obtained with hemolysis above 80 mg/dL with this kit.**

Sample's pH should be between 6.5 - 7.5. If presence of interfering substance is suspected, examine by dilution test at more than 2 points. Dilution of a sample should be made in a test tube using buffer solution prior to adding them to wells (e.g. sample 10 μL + buffer 40 μL). Turbid samples or those containing insoluble materials should be centrifuged before testing to remove any particulate matter.

Storage and stability

C-peptide in samples will be inactivated if stored at $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. If it is necessary to store sample in refrigerator ($2\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $8\text{ }^{\circ}\text{C}$), add aprotinin at final concentration of 100 - 500 KIU/mL. (KIU: kallikrein inhibitor unit).

If you have to store assay samples for a longer period, snap-freeze samples and keep them below $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

11. Assay procedure

Remove the cover sheet of the anti-C-peptide-coated plate after bringing up to room temperature.

- (1) Wash the anti-C-peptide-coated plate (A) by filling the wells with 300 μL of washing buffer and discard 3 times(*②), then strike the plate upside-down onto several sheets of paper towel to remove residual buffer in the wells.
- (2) Pipette 40 μL of (C) buffer solution and 10 μL of samples to the designated sample wells.
- (3) Pipette 50 μL of standard solution to the wells designated for standards.
- (4) Shake the plate gently on a plate shaker (*③).
- (5) Stick a plate seal (*④) on the plate and incubate for 2 hours at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- (6) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (7) Pipette 50 μL of biotinylated anti-C-peptide antibody to all wells, and shake as step (4).
- (8) Stick a plate seal (*④) on the plate and incubate the plate for 2 hours at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- (9) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (10) Pipette 50 μL of HRP-conjugated streptavidin to all wells, and shake as step (4).
- (11) Stick a plate seal (*④) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- (12) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (13) Pipette 50 μL of chromogen (TMB) to wells, and shake as step (4).
- (14) Stick a plate seal (*④) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- (15) Add 50 μL of the stop solution to all wells and shake as step (4).
- (16) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620* nm) immediately using a plate reader.

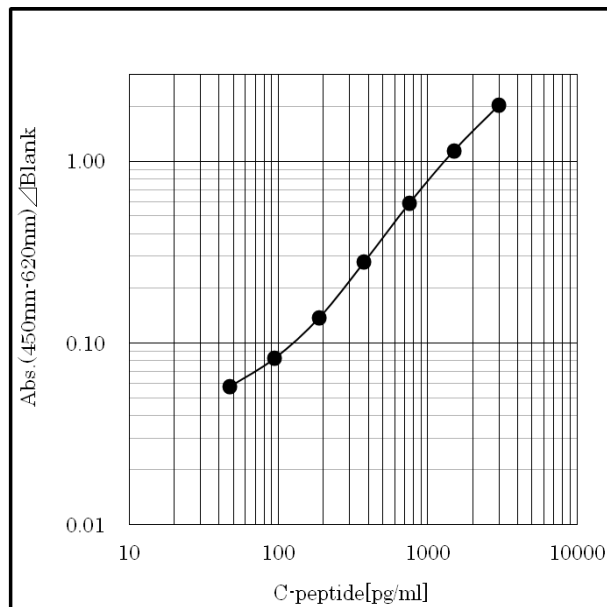
*Refer to the page 7 for notes of *②, *③ and *④.

12. Calculations

- (1) Prepare a standard curve by plotting standard concentration on X-axis and absorbance on Y-axis.
- (2) Using the standard curve, read the C-peptide concentration of a sample at its absorbance*, and multiply the assay value by dilution factor if the sample has been diluted. Though the assay range is wide enough, in case the absorbance of some samples is higher than that of the highest standard, please repeat the assay after proper dilution of samples with the buffer solution.

* We recommend the use of 3rd order regression curve for log-log plot, or 4 or 5 parameters method for log-normal plot in computer calculation.

Physiological or pathological situation of animals should be judged comprehensively taking other examination results into consideration.



Mouse C-peptide assay standard curve
Absorbance may change due to assay environment.

13. Performance characteristics

- Assay range
The assay range of the kit is 46.9 pg/mL ~ 3000 pg/mL.
The effective assay range by standard assay procedure (dilution rate: 5×) is 234.5 pg/mL ~ 15000 pg/mL.
- Specificity
The antibodies used in this kit are specific to mouse C-peptide. Cross-reactivity against rat C-peptide is 89 % and human C-peptide is 85 % when tested at 3000 pg/mL.
- Precision of assay
Within assay variation (2 samples, 8 replicates assay), Mean CV was within 10 %.
- Reproducibility
Between assay variation (3 samples, 4 days, 4 replicates assay), Mean CV was within 10 %.
- Recovery test
Standard C-peptide was added in 3 concentrations to 2 serum samples and were assayed.
The recoveries were 94 % ~ 104 %
- Dilution test
2 serum samples were serially diluted by 3 steps.
The dilution curves showed linearity with $R^2 = 1.0$.

14. Trouble shooting

- 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-C-peptide antibody, HRP-conjugated streptavidin, or chromogen (TMB) might not be added.
 - 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of biotinylated anti-C-peptide antibody or HRP-conjugated streptavidin.
 - 4) Contamination of peroxidase 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 chromogenic substrate reagent soon after taking out from a refrigerator might cause poor coloration owing to low temperature.
- Blank OD was higher than that of the lowest standard concentration (46.9 pg/mL).
Possible explanations: Improper or inadequate washing. (Change washing frequency from 3 times to 4-6 times at the constant stroke after the reaction with HRP-conjugated streptavidin.)
- High coefficient of variation (CV)
Possible explanation:
 - 1) Improper or inadequate washing.
 - 2) Improper mixing of standard or samples.
 - 3) Pipetting at irregular intervals.

LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type)

- Q-1: Can I divide the plate to use it 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 soon.

- Q-2: I found there contains liquid in 96 well-plate when I opened the box. What is it?

A-2: When we manufacture 96 well-plate, we insert preservation stabilizer in wells.

Example Version

LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type)

Summary of assay procedure : Use as a check box

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

Bring the well-plate and all reagents back to **20 °C - 25 °C for 2 hours**.

Wash stock solution (10×) must be diluted to **10 times** by deionized water (or distilled water that returned to 20 °C - 25 °C).

Standard C-peptide solution dilution example:

Concentration (pg/mL)	3000	1500	750	375	188	93.8	46.9	0
Std. solution (μL)	Orig.sol. 150	150*	150*	150*	150*	150*	150	0
Buffer solution (μL)	150	150	150	150	150	150	150	150

*One rank higher standard.

<input type="checkbox"/> Anti-C-peptide-coated plate		
<input type="checkbox"/> ↓Washing 3 times(*②)		*⑥
<input type="checkbox"/> Diluted samples (e.g. (C) buffer solution 40 μL + sample 10 μL) or Standards	50 μL	
<input type="checkbox"/> ↓Shaking(*③), Incubation for 2 hours at 20 °C - 25 °C. (Standing(*④))		
<input type="checkbox"/> Dilute Biotinylated anti-C-peptide antibody to 100× with buffer returned to 20 - 25 °C. This should be prepared during incubation.		
<input type="checkbox"/> ↓Washing 3 times(*②)		*⑥
<input type="checkbox"/> Biotinylated anti-C-peptide antibody	50 μL	
<input type="checkbox"/> ↓Shaking(*③), Incubation for 2 hours at 20 °C - 25 °C. (Standing(*④))		
<input type="checkbox"/> Dilute HRP-conjugated streptavidin to 100× with buffer returned to 20 °C - 25 °C. This should be prepared during incubation.		
<input type="checkbox"/> ↓Washing 3 times(*②)		*⑥
<input type="checkbox"/> HRP-conjugated streptavidin	50 μL	
<input type="checkbox"/> ↓Shaking(*③), Incubation for 30 minutes at 20 °C - 25 °C. (Standing(*④))		
<input type="checkbox"/> ↓Washing 3 times(*②)		*⑥
<input type="checkbox"/> Chromogen (TMB) (After dispense, the color turns to blue depending on the concentration.)	50 μL	
<input type="checkbox"/> ↓Shaking(*③), Incubation for 30 minutes at 20 °C - 25 °C. (Standing(*④))		
<input type="checkbox"/> Stop solution (After dispense, the color turns to yellow depending on the concentration.)	50 μL	
<input type="checkbox"/> ↓Shaking(*③) Immediately shake.		
<input type="checkbox"/> Measurement of absorbance (450 nm Ref 620 nm(*⑤)) immediately. (Ref. wave cancels the dirt in the back of plate.)		

*② After dispensing wash buffer to wells, lightly shake the plate on your palm for 10 seconds and remove the buffer. Guideline of washing volume: 300 μL/well for an automatic washer and for a pipette if the washing buffer is added by pipette. In case of washing by using 8 channel pipette, sometimes the back ground tends to be high. If so, change washing frequency from 3 times to 4 - 6 times at the constant stroke after the reaction with HRP-conjugated streptavidin.

Standard of plate-washing pressure: 5 mL/min - 25 mL/min. (Adjust it depending on the nozzle's diameter.)

*③ Guideline of shaking: 600 rpm - 1200 rpm for 10 seconds × 3 times.

*④ Seal the plate during the reaction after shaking. Peel off the protective paper from the seal and stick the seal on the plate. Do not reuse the plate seal used once.

*⑤ 600 - 650 nm can be used as reference wavelength.

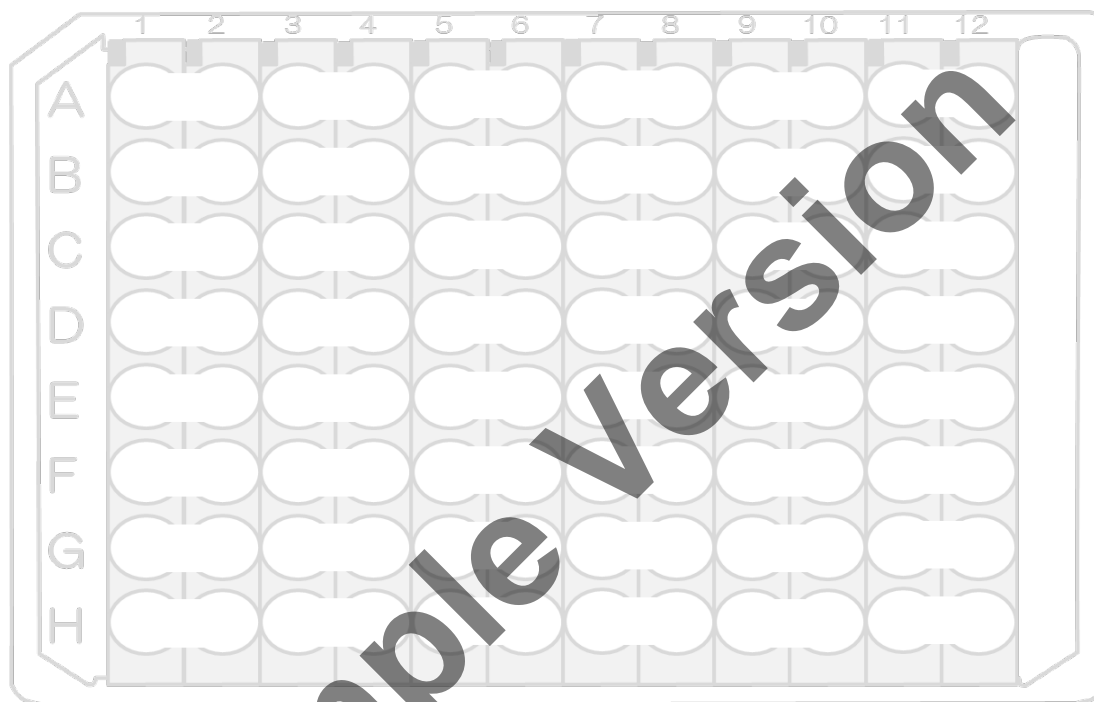
*⑥ After removal of wash buffer, immediately dispense the next reagent.

LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type)

Worksheet example

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	3000 pg/mL	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
B	1500 pg/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
C	750 pg/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
D	375 pg/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
E	188 pg/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
F	93.8 pg/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
G	46.9 pg/mL	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39
H	0(Blank)	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32	Sample 40

Assay worksheet



LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type)

[Storage condition] Store the kit at 2 °C - 8 °C (Do not freeze).

[Term of validity] Expiration date is indicated on the container.

[Cat #] 631-07231

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

<https://www.fujifilm.com/ffwk/en>

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書に従って測定を実施してください。本キットを初めてご使用になられる場合は後述の「◆ご使用前にご確認頂きたい技術上のヒント及び注意事項」をご確認の上ご使用ください。

『 レビス® C - ペプチド - マウス (Uタイプ) 』 取扱説明書

1. イントロダクション

インスリンは細胞内で1本鎖のプロインスリンの形で合成された後、S-S結合が形成され、酵素分解による活性化がおこってC-ペプチドとインスリンが分離します。インスリン部分のアミノ酸配列はマウス、ラット共通ですが、C-ペプチドの部分は多少違います。マウスC-ペプチド1はアミノ酸29個、2は31個の単鎖ペプチドです。C-ペプチドはプロインスリンから分離したあと、インスリンとともに分泌されます。

C-ペプチドは長い間生理作用がなく、インスリン生合成の過程においてA鎖とB鎖が正しい形で折りたたまれ、正しい組み合わせのS-S結合ができるようにする作用のほかには生理作用は特に無いと考えられていましたが、近年の研究の積み重ねにより様々な生理作用のあることが明らかになってきました。まずC-ペプチドは 10^{-9} M程度で内皮細胞、腎尿細管細胞や繊維芽細胞の表面の恐らくGタンパクにカップルした受容体に結合し、カルシウムイオン依存性の細胞内シグナルを活性化すること、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ を活性化し、内皮細胞のNO合成を促進すること、受容体との結合には立体的特異性があり、インスリン、プロインスリン、IGF-I、-II、NPYとの交差性が無いことが示されています。またC-ペプチドを欠いているI型糖尿病患者にC-ペプチドを投与することにより、骨格筋と皮膚の血流が増強され、腎糸球体のhyperfiltrationを低下させ、尿中へのアルブミンの排泄を抑制し、神経機能を改善するが健常人には作用が現われないことが示されています。このことからI型糖尿病患者にはインスリンのみでなくC-ペプチドの同時投与が合併症の阻止に有用であることが示唆されます。

C-ペプチドのC末端部のペントペプチド(27-31)が受容体との結合に重要で、この部分の欠如したDes(27-31)C-ペプチドはその作用を失うとされています。このペントペプチドはC-ペプチドと受容体との結合を完全にreplaceすることができ、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ を活性化します。Des(27-31)C-ペプチドの存在量は新生仔ラットではC-ペプチドの約37%、成熟ラットでは8.5%を占めるという報告があります。C-ペプチドの血中における寿命はインスリンよりも数倍長いという特徴を持ちます。そこで、C-ペプチドの血中レベル測定は臨床的にはインスリン合成、分泌機能を観察するのに用いられます。また尿中に多量に排泄され、血中のレベルとよく相関することから、尿を検体として測定することもできます。また、インビトロで培養されたランゲルハンス島(膵島)からのインスリン分泌の指標としてC-ペプチド測定は有用です。なぜなら、培養液にはインスリンが添加されることが多いので、培養後培養液中のインスリンを測定すると、分泌されたインスリンと添加されたインスリンの区別がつかなくなってしまう、培養開始時の量を差し引かなければなりません。その場合、分泌されたインスリン量が少ないと測定誤差の影響が大きくなり正確な判定ができなくなります。この時、C-ペプチドを測定してやれば、インスリンと等モルで分泌されますから、分泌されたインスリンを正確に判定できるというわけです。

当社のキットはC-ペプチド1、2の共通部分を認識しますので、トータルのC-ペプチドが測定されます。

本キットはマウスC-ペプチド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ください。

◆製品の特長

- 全反応時間は5時間です。
- マウス血清または血漿中のC-ペプチドを測定します。
- 微量な検体(標準操作法は10 μL)で測定可能です。
- 1キットは96ウェルです。
- 全ての試薬は溶液タイプです。

2. 測定原理

本キットは標準品、希釈検体が抗C-ペプチド抗体固相化マイクロプレートウェル中でインキュベートされます。2時間のインキュベーションと洗浄後、ビオチン結合抗C-ペプチド抗体を加え捕捉されたC-ペプチドとともに2時間インキュベートします。洗浄後、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物を加え、30分インキュベートします。再度の洗浄後、ウェ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450 nm(副波長620 nm)で比色測定されます。吸光度はC-ペプチド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し標準曲線を作成し、この標準曲線から未知検体中の濃度が決定されます。

3. キットの保存と使用期限

キットは2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ で保存してください(凍結厳禁)。この保存条件下でキットは外箱のラベルに記載さ

LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type)

れた有効期限内安定です。有効期限の過ぎた試薬は使用しないでください。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。

4.キット以外に必要な器具 □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 μL~50 μL を正確にピペッティングできるもの、及び 100 μL~300 μL を正確にピペッティングできるもの) □連続分注ピペット(例 Eppendorf の multipette plus)、50 μL 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 rpm~1200 rpm) □96 ウェルプレート用洗浄機(あれば好ましい)または噴射ビン □96 ウェルプレートリーダー(450 ± 10 nm、620 nm : 600 nm~650 nm) □データ計算用ソフトウェア

5. 構成品

構成品	状態	容量
(A) Anti-C-peptide coated plate 抗体固相化 96 ウェルプレート	洗浄後使用	96 wells(8×12)/1 枚
(B) Standard C-peptide solution (6000 pg/mL) 標準 C - ペプチド溶液(6000 pg/mL)	希釈後使用	500 μL/1 本
(C) Buffer solution 緩衝液	そのまま使用	60 mL/1 本
(D) Biotinylated anti-C-peptide antibody ビオチン結合抗 C-ペプチド抗体	希釈後使用	100 μL/1 本
(E) HRP-conjugated streptavidin ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	希釈後使用	100 μL/1 本
(F) Chromogen (TMB) 発色液(TMB)	そのまま使用	12 mL/1 本
(H) Stop solution 反応停止液	Be careful! 取扱注意	そのまま使用
(I) Wash stock solution (10×) 濃縮洗浄液(10×)	希釈後使用	100 mL/1 本
Plate seal プレートシール		4 枚
Instruction Manual 取扱説明書		1 部

6. 試薬の調製

- *キットの試薬は使用前に必ず室温(20 °C~25 °C)に戻してください(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ください。
- *測定に必要な分だけ試薬を調製してください(ご不明な際にはお問い合わせください)。

【濃縮された試薬類】

[(B) Standard C-peptide solution (6000 pg/mL)] ; 標準曲線作成用

(B) Standard C-peptide solution (6000 pg/mL) (原液) と(C) Buffer solution を使って標準溶液を調製してください。下記は一例です。

標準溶液の容量	(C) Buffer solution	濃度 (pg/mL)
標準溶液原液 150 μL	150 μL	3000
3000 pg/mL 溶液 150 μL	150 μL	1500
1500 pg/mL 溶液 150 μL	150 μL	750
750 pg/mL 溶液 150 μL	150 μL	375
375 pg/mL 溶液 150 μL	150 μL	188
188 pg/mL 溶液 150 μL	150 μL	93.8
93.8 pg/mL 溶液 150 μL	150 μL	46.9
0 (Blank)	150 μL	0

LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type)

[(D) Biotinylated anti-C-peptide antibody]

100 µL を充分分取できる量をご提供しています。濃縮液を(C)緩衝液で **100 倍**に希釈してください。

[(E) HRP-conjugated streptavidin]

100 µL を充分分取できる量をご提供しています。濃縮液を(C)緩衝液で **100 倍**に希釈してください。

[(I) Wash stock solution (10×)]

濃縮洗浄液(10×)を室温化された精製水(蒸留水)で **10 倍**に希釈してください。

例：100 mL の濃縮洗浄液(10×)+900 mL の精製水(蒸留水)(96 ウェル全てを使用する場合)

【試薬の安定性と保存方法】

(A) Anti-C-peptide coated plate

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)の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℃~8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(B) Standard C-peptide solution (6000 pg/mL)

キットを分割して使用する際は使用する直前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℃~8℃で保存してください。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、保存はしないでください。

(C) Buffer solution 及び(F) Chromogen (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℃~8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(D) Biotinylated anti-C-peptide antibody 及び(E) HRP-conjugated streptavidin

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℃~8℃で保存してください。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ください。

(H) Stop solution

使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2℃~8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(I) Wash stock solution (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℃~8℃で保存してください。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ください。

7.検体の調製

本キットはマウス血清または血漿中の C-ペプチドを測定します。

●検体は定法にしたがって採取しすぐに測定するか、-35℃以下で凍結保存してください。凍結した検体は測定する直前に解凍し十分に攪拌してください。繰り返しの凍結融解は避けてください。正しい結果が得られない原因になります。

●pH が 6.5~7.5 の範囲であることを確認してください。

●採血時の麻酔は測定値に影響を与える場合がありますのでご注意ください。エーテルは使用しないでください。

●採血の際にヒト用の採血管をご使用になるのは避けてください。血清分離促進剤等の添加剤が測定系に影響を与える可能性が考えられます。

●溶血した検体や高脂質検体は異常値の発生原因となりますので避けてください。

※血液成分の影響(高脂質・溶血等)を抑制する為に原検体中の脂質(乳び)・溶血が高い場合は異常値発生の原因となる場合がありますので測定に使用しないでください。本キットの場合、溶血は 80 mg/dL 以上で影響が現れます。

●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ください。

●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ください。

●検体の希釈(本測定法では 5 倍)は、あらかじめ試験管等で行い測定ウェルに分注しても構いません。

【検体の安定性と保存方法】

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ください。また、検体の希釈は用時調製としてください。

8.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ください。

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ください。

(1) あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満し、3 回洗浄(*①)します。その後、ペーパータオルなどでプレート逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。

(2) 検体測定ウェルに緩衝液を 40 µL ずつ分注し、さらに検体を 10 µL 添加します。

(3) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 50 µL ずつ分注します。

(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ェルに満し、3 回洗浄(*①)します。その後、ペーパータオル

LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type)

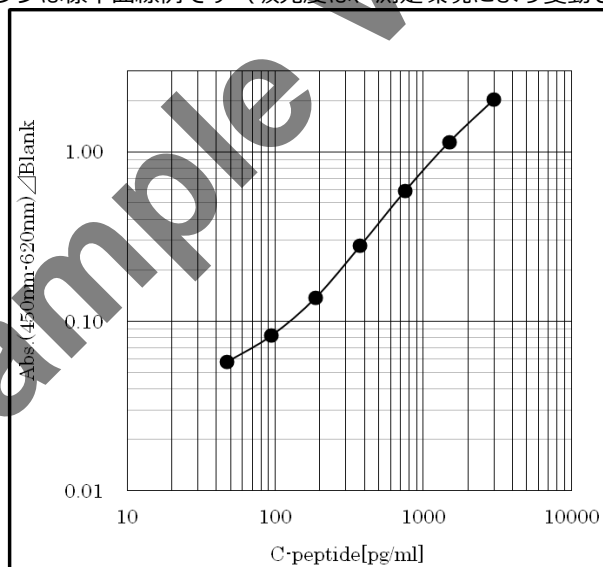
ルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。

- (7) 各ウェルにビオチン結合抗 C-ペプチド抗体を 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 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)で 2 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ェルに満たし 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ェルに残った液を取り除きます。
 - (10) 各ウェルに、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 $^{\circ}$ C~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ェルに満たし 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ェルに残った液を取り除きます。
 - (13) 各ウェルに発色液を 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 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)で 30 分間静置します。
 - (15) 各ウェルに反応停止液を 50 μ L ずつ分注し、発色反応を停止します。
 - (16) 攪拌(*②)後、直ちにマイクロプレート用分光光度計で 450 nm (副波長 620 nm) での吸光度を測定します。副波長は 600 nm~650 nm の範囲で使用できます。
- (*①)、(*②)、(*③)測定手順概要 (14、15 ページ) をご参照ください。

9.計算

- (1)測定毎に標準曲線を作成します。両対数を使用し X 軸を標準溶液濃度(pg/mL)、Y 軸を吸光度の標準曲線グラフを作成してください。
 - (2)標準曲線より、検体の吸光度に対応する濃度(pg/mL)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) Buffer solution にて適当倍率に調製し再度測定を実施してください。
- * 演算処理では、3 次多項式または 4 または 5 パラメーターの使用をお薦め致します。

右のグラフは標準曲線例です(吸光度は、測定環境により変動します)。



* プレートリーダーは SUNRISE RAINBOW(TECAN)を使用

10.キットの性能

●測定範囲

46.9 pg/mL~3000 pg/mL の範囲で測定できます

(5 倍希釈時の実効測定範囲は 234.5 pg/mL~15 000 pg/mL)。

●特異性

この ELISA 系で使用されている抗体はマウス C-ペプチドに対して特異的です。関連物質を本キットで測定しました。マウス C-ペプチド 1、2 を 100 % としますと、ラット C-ペプチドとは 89 %、ヒト C-ペプチドとは 85 % ですが、マウスインスリン、プロインスリンと反応しません (3000 pg/mL 時において)。

●精度試験 (アッセイ内変動) (8 重測定、2 検体)

平均 C.V.値は 10 %未滿

●再現性試験 (アッセイ間変動) (4 重測定、3 検体、4 日間)

平均 C.V.値は 10 %未滿

●添加回収試験

2 血清検体に異なる 3 濃度の C-ペプチドを添加し測定した結果、回収率は 94.0 % から 104 %

●希釈直線性

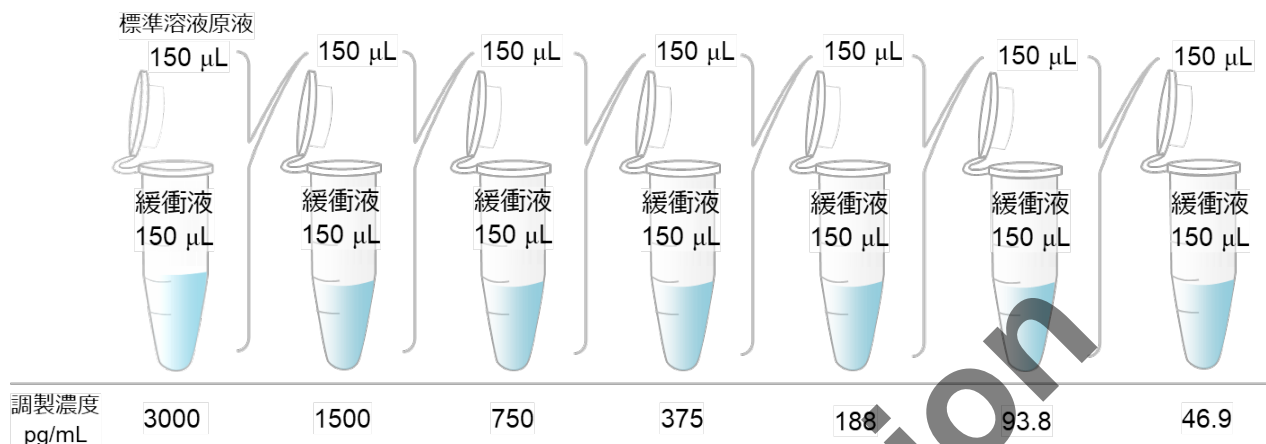
11.トラブルシューティングと Q&A

- すべてのウェルでの反応が弱い
原因として考えられること
 - 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)ペルオキシダーゼ酵素阻害剤の混入。
 - 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(46.9 pg/mL)の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。
原因として考えられること
洗浄が不適當、不完全であった。
(ペルオキシダーゼ・アビジン結合物と反応後の洗浄回数3回を同じ流速で4回~6回に増やしてください。)
- 変動係数(CV)が大きい
原因として考えられること
 - 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をそってカッターなどで切り離してご使用ください。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ください。
- Q-2：プレートを取り出したらウェ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。

【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、測定方法を確認後測定操作を行ってください。

- ウェルプレート、試薬類を十分に室温(20 °C~25 °C)に戻してください。室温化には2時間位必要
- 濃縮洗浄液の希釈 : 室温化された精製水で、10倍に希釈してください。
- 標準溶液の希釈 (例) : 室温化された緩衝液で、希釈してください。



各操作注意事項並びに関連情報

<input type="checkbox"/> 抗体固相化 96 ウェルプレート		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 3 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> 希釈検体 (例えば緩衝液 40 µL と検体 10 µL) または標準溶液	50 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20 °C~25 °C)、2 時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> ビオチン結合抗 C-ペプチド抗体の希釈。室温化された緩衝液で 100 倍に希釈してください。希釈溶液の調製は第一反応中に行う。		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 3 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> ビオチン結合抗 C-ペプチド抗体	50 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20 °C~25 °C)、2 時間反応、静置		* ② * 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 倍に希釈してください。希釈溶液の調製は第二反応中に行う。		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 3 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	50 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20 °C~25 °C)、30 分間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 3 回 (洗浄液除去後、直ちに発色液分注)		* ①
<input type="checkbox"/> 発色液(TMB) 分注後、濃度により青色に変色	TMB が室温化されていることを確認 50 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20 °C~25 °C)、30 分間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> 反応停止液 分注後、濃度により黄褐色に変色	強酸性につき取扱注意 50 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌 (直ちに攪拌)		* ②
<input type="checkbox"/> 直ちに吸光度測定 (主波長 450 nm、副波長 620 nm:600 nm~650 nm) 副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします		

(* ①)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 µL/ウェルです。万一、最小標準溶液濃度(46.9 pg/mL)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・アビジン結合物と反応後の洗浄回数 3 回を同じ流速で 4 回~6 回に増やしてください。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5 mL/分~25 mL/分 (ノズルの径により異なります) です。第一

LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type)

反応後の初回の洗浄のみウェル間のコンタミに注意してください。

(* ②) 攪拌の目安は 600 rpm~1200 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ください。

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ください。一度使用したプレートシールは再使用しないでください。

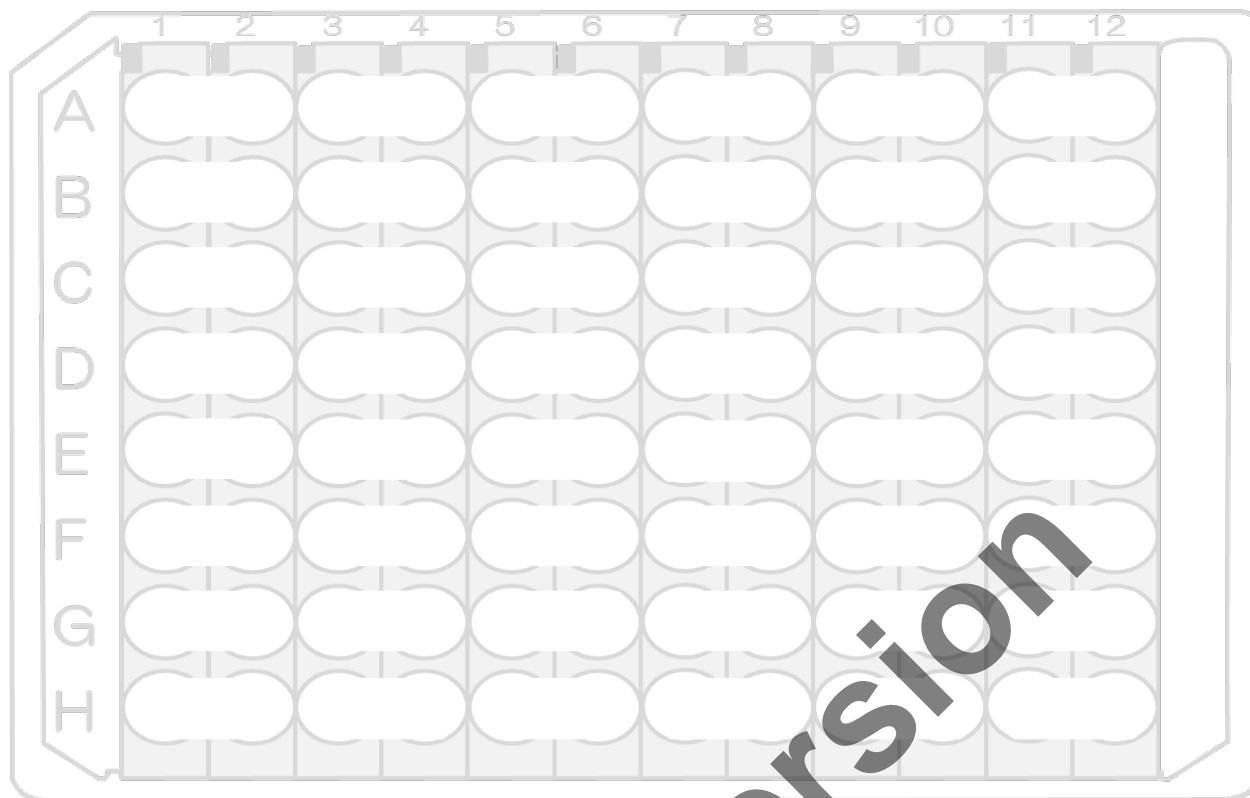
ワークシート (例)

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	3000 pg/mL	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	1500 pg/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	750 pg/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	375 pg/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	188 pg/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	93.8 pg/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	46.9 pg/mL	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
H	0(Blank)	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40

◆ご使用前にご確認頂きたい技術上のヒント及び注意事項

- 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℃（実験台上またはインキュベータ内温度）を厳守してください。また、風速（エアコンの風も含む）：0.4 m/sec 以上、湿度 30%未満の環境下での測定は避けてください。やむを得ず、測定操作を風速：0.4 m/sec 以上、湿度 30%未満の環境下で実施する場合には、各ステップの静置反応時、プレートシールをすることに加え、下記のような方法をご検討ください。
例) インキュベータ内、発泡スチロール製箱内で静置反応させる等。測定室の環境条件により対策方法が異なる場合がありますので、詳細はお問い合わせください。
- 各ステップでの静置反応時には、ウェルの乾燥、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ください。
- 検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけてください。1 ウェル/1 チップのご使用をお勧めします。
- 発色液は 96 ウェルプレートに使用するまでは薄い黄色澄明です。光を避けて保存してください。
- 反応停止液は使用するまでは無色です。
- 本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者のもとでご使用ください。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ください。
- 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ください。
- 試薬類を皮膚に付けないでください。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ください。
- 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ください。
- 試薬類は口でピペティングしないでください。
- ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないでください。
- 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ください。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 時間以上浸けてください。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄してください。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ください。

LBIS Mouse C-peptide ELISA Kit (U-type)



【測定名】

【所属】

【測定者】

【測定日】

【ロット番号】

【有効期限】

【備考】

【製品名】

レビス® C-ペプチド-マウス (Uタイプ)

【和光コード】

631-07231

【英語表記】

LBIS Mouse C-peptide (U-type) ELISA Kit

【お問い合わせ先】

製造発売元

富士フイルム 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

Fax : 06-6201-5964

<https://www.fujifilm.com/ffwk/ja>