



For research use only

Glucose-derived AGEs ELISA Kit

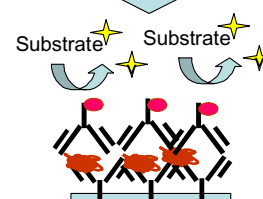
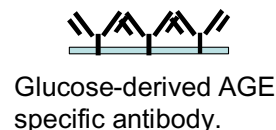
[Measurement principle]

The Glucose-derived AGEs ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on sandwich principle.

The microtiter wells are coated with a monoclonal antibody directed towards a unique antigenic site on Glucose-derived AGEs (Glc-AGEs).

When the sample diluted to an arbitrary density is added to well, Glc-AGEs is bonded.

In the use of HRP- anti AGE antibody, it is measured by the enzyme reaction of HRP.



Detect (enzymatic reaction)

[Kit Contents]

(1) Antibody coated microtiter plate,96 wells	1 plate
(2) Glucose-derived AGEs standard	250 μ L \times 2
(3) Reference standard and sample diluent	15 mL \times 1
(4) HRP- anti AGEs antibody concentrate(\times 100) (mouse monoclonal antibody)	60 μ L \times 1
(5) OPD (o-phenyldiamine) tablets	2 tab.
(6) Substrate solution	30 mL \times 1
(7) Stop solution	15 mL \times 1
(8) Wash buffer concentrate(\times 20)	30 mL \times 1
(9) Dilution plate	1 plate

[Equipments to be supplied by the user]

- (1) A microplate reader
- (2) A micropipet
- (3) A microplate washer

[Assay Method]

- (1) Preparation of working solution

① Wash solution

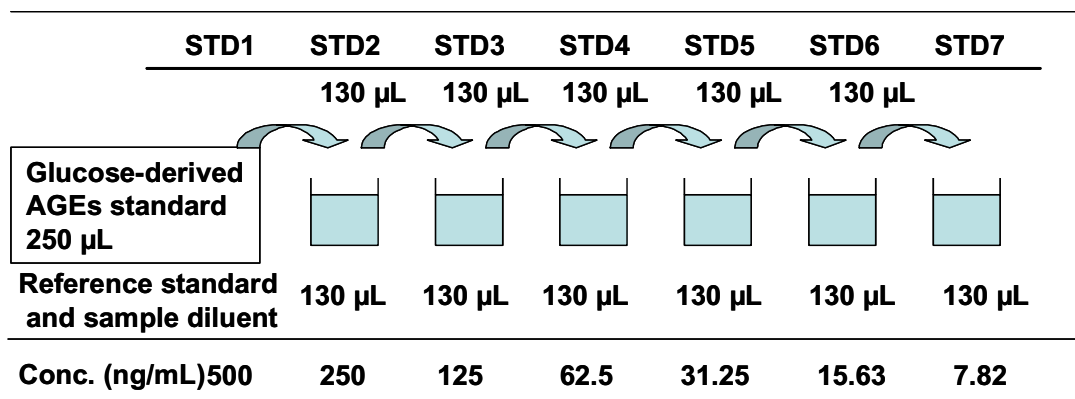
Make sure that wash buffer concentrate does not contain any crystallized material prior to use. Working solution is prepared by dilution 30 mL of wash buffer concentrate with 570 mL of distilled deionized water. For convenience this solution can be kept at



2-8°C up to 14 days.

② Antibody dilution solution

Please dilute "Reference standard and sample diluent" with Wash solution by ten times and use it as an antibody dilution solution.



③ Standard solution

"Glucose-derived AGEs standard" (500 ng/mL) is diluted with "Reference standard and sample diluent" by the twice, and each density of 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, and 7.82 ng/mL is made.

④ HRP-anti AGEs antibody ($\times 100$)

Dilute 50 μ L of "HRP-anti AGEs antibody" with 5 mL of Antibody dilution solution for 96 well reaction. Diluted antibody should not be stored.

⑤ Coloring solution

Add one "OPD tablet" to 13 mL of "Substrate solution" to reconstitute the coloring solution just before use. This solution should not be stored.

(2) Dilution of sample

When use the serum, please dilute to 30 times or more with the Reference standard and sample diluent.

Please dilute the sample made with *in vitro* to enter the base range.

In the case of high concentration sample, please pre-dilute with PBS and finally adjust to 100 times or more.

(3) Assay procedure

① Preparation for plate

①-1 Add wash solution 300 μ L to each well and hold 30 minutes.

①-2 Discard the Wash solution from the wells completely and wash with 300 μ L wash solution.

Repeat this step another 2 times

② Primary reaction

②-1 Apply 50 μ L/well $\times 2$ (In the case of measuring double wells) Standard solutions (see(1)-③), dilution samples and incubate for 1 hour.

②-2 After the incubation, discard the reaction solution and wash with 300 μ L wash solution. Repeat this step another 2 times.

③ Secondary reaction

③-1 Apply 50 μ L/well "HRP- anti AGEs antibody" (see(1)-④) and incubate for 1 hour.

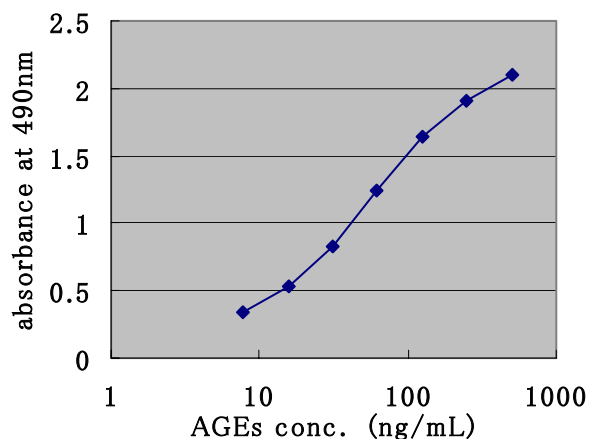
③-2 After the incubation, discard the reaction solution and wash with 300 μ L wash solution. Repeat this step another 2 times.

④ Coloring



- Apply 100 μ L Coloring solution to each well and incubate for 10 minutes.
- ⑤ Stop reaction
Apply 100 μ L of "Stop solution" to stop the enzymatic reaction.
 - ⑥ Read absorbance
Read absorbance of 490nm with a microplate reader.
 - ⑦ Calculation
Calculate the AGEs concentration using standard curve.
Please use and calculate 4Parameter Logistic Model.

[Standard curve]



[Reproducibility]

Domain of standard curve : 7.8125~500 ng/mL

Within-run (n=7, 2 concentration) : CV(%)= 6.7, 1.8

Between-run (n=10, 2 concentration) : CV(%)= 3.6, 7.8

Recovery test : In the recovery study, recoveries between 96% and 108% were obtained for 30 times dilutions of the sample sera (already-known AGEs conc. 300 ng/mL)



[Usage notes]

- The Reagents should be stored at recommended temperature, -30°C.
- The dryness of the plate causes the data error.
- Do not use the reagents which is expired the date of usage.
- Serum sample should be diluted more than 30 times with Dilution solution.
- Do not leave the standard and Antibody for long time under room temperature.
- The glassware for making coloring solution should be clean.
- Since OPD (o-phenyldiamine) is harmful, handle with care.
- Avoid contact with Stop Solution containing 1N H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and samples with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where samples or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling samples and reagents. Microbial contamination of reagents or samples may give false results.
- If the reagents happen to get into eye or mouth, wash out them and consult a doctor.
- After using the kit, wash your hands.
- The kit is constructed with well-adjusted combination in each lot. Replaced combination among different lots may cause unexpected results.
- This kit is only for research use. Do not use for diagnostic purposes.
- When the packages of the reagents are broken or something wrong, do not use them.
- After using the reagents, the packages should be discarded under the established rule.
- We do not guarantee the quality of the packages and accompaniments if not used according this direction.

[Storage]

All reagents: -30°C



This product is generated from GANP® mice.

Manufactured by  Trans Genic Inc.



COSMO BIO CO., LTD.
Inspiration for Life Science

TOYO 2CHOME, KOTO-KU, TOKYO, 135-0016, JAPAN

<http://www.cosmobio.co.jp> e-mail : export@cosmobio.co.jp

Phone : +81-3-5632-9617 FAX : +81-3-5632-9618

グルコース由来 AGEs 測定用 ELISA キット

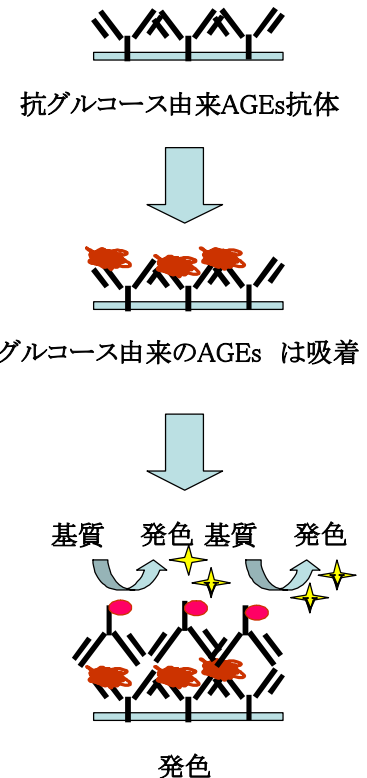
〔測定原理〕

本キットは、AGEsに特異的な抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法に基づいています。

マイクロプレートにはグルコースに由来する AGEs に特異的に結合する抗体がコートされています。

任意の濃度で希釈したサンプルをウェルに添加するとグルコースに由来する AGEs は特異的に結合されます。

さらに HRP 標識された抗 AGEs 抗体を用いることで、HRP により触媒される発色反応により定量することができます。



〔キット内容〕

① 抗体固相化マイクロプレート(96 well)	1 枚	
② AGEs 標準品 (STD) 500 ng/mL	250 μ L	× 2 本
③ 標準品及び検体共通希釈液	15 mL	× 1 本
④ HRP 標識-抗 AGEs 抗体(×100) (マウスモノクローナル抗体)	60 μ L	× 1 本
⑤ OPD (オルトフェニレンジアミン) 錠	2 錠	
⑥ 基質液	30 mL	× 1 本
⑦ 反応停止液	15 mL	× 1 本
⑧ 濃縮洗浄液(×20)	30 mL	× 1 本
⑨ 希釈用プレート	1 枚	

〔キット以外に必要な器具・器材〕

- (1) マイクロプレートリーダー
- (2) マイクロピペット
- (3) プレートウォッシャー ただし無い場合は、説明書内の操作法に従ってマニュアルで洗浄して下さい。

〔使用方法〕

(1) 試薬の調製

① 洗浄液

濃縮洗浄液 (×20) を室温に戻し、塩類が沈殿していないか確かめて下さい。

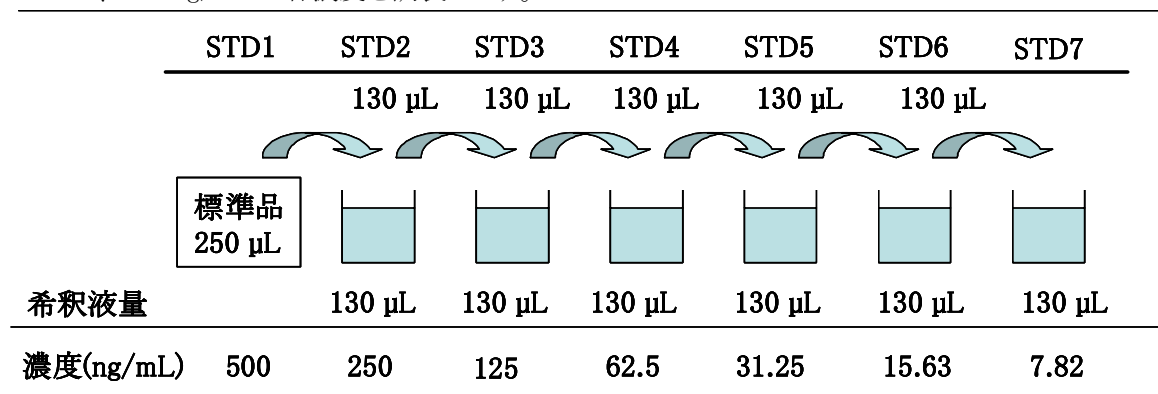
濃縮洗浄液 (×20) 30 mL を精製水 570 mL で希釈して用います。(希釈した洗浄液は冷蔵で 14 日間安定です。)

② 抗体希釈液

標準品及び検体共通希釈液を洗浄液で 10 倍希釈し抗体希釈液として用いてください。

③ 標準液(用事調製)

標準品は 500 ng/mL より標準品及び検体共通希釈液にて 2 倍段階希釈し、250、125、62.5、31.25、15.63、7.82 ng/mL の各濃度を調製します。



④ HRP 標識-抗 AGEs 抗体 (×100) (用事調製)

HRP 標識-抗 AGEs 抗体(×100) 50 μ L を抗体希釈液 5 mL で希釈すると 96 ウェル分の抗体溶液を調製することができます。

⑤ 発色液(用事調製)

室温に戻した基質液 13 mL に OPD 1 錠を溶解します。

(2) サンプルの調製

血清を用いて測る場合は検体希釈液で 30 倍以上に希釈して使用して下さい。

in vitro で作製したサンプルは測定範囲に入るように希釈して下さい。

100 倍以上に希釈する場合は一度 PBS で希釈してから測定に用いてください。

(3) 測定操作法

① 反応プレートの準備

①-1 抗体固相化マイクロプレートアルミシートから使用するウェルだけ取りだし、洗浄液を 300 μ L/ウェル加え、室温で 30 分間静置します。

①-2 上記ウェル内の液を捨て、洗浄液を少なくとも 300 μ L 分注し、デカントで除去します(2 回)。ペーパータオルなどの上でプレートを叩きよく水気を取り、速やかに次のステップに進んで下さい。

② 1 次反応

②-1 ウェルに標準液、任意の濃度に希釈したサンプル液を 50 μ L/ウェル×2 ウェル(ダブル測定の場合)ずつ加え、プレートを軽く叩いて混和し、室温で 1 時間インキュベートします。

②-2 反応終了後、ウェル内の反応液を捨て、洗浄液を 300 μ L 分注し、デカントで除去します。この操作をさらに 2 回繰り返した後、ペーパータオルなどの上でプレートを叩きよく水気を取り、速やかに次のステップに進んで下さい。

③ 2 次反応

③-1 各ウェルに HRP 標識-抗 AGEs 抗体(×100)を 50 μ L ずつ加え、プレートを軽く叩いて混和し、室温で 1 時間インキュベートします。

③-2 反応終了後、ウェル内の反応液を捨て、洗浄液を 300 μ L 分注し、デカントで除去します。この操作をさらに 2 回繰り返した後、ペーパータオルなどの上でプレートを叩きよく水気を取り、速やかに次のステップに進んで下さい。

④ 発色

各ウェルに発色液を 100 μ L ずつ加え、室温で 10 分間反応させます。

⑤ 反応停止

各ウェルに反応停止液を 100 μ L ずつ加え、酵素反応を停止させます。各ウェルの酵素反応時間が一定になるように、発色液と同様に添加して下さい。反応時間が変わると発色強度に誤差が生じます。

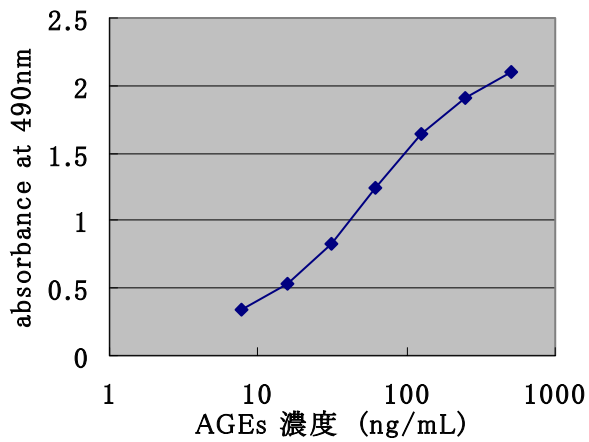
⑥ 吸光度測定

プレートリーダーで 490nm の吸光度を測定します。

⑦ 濃度換算

標準曲線より、AGEs の濃度を算出します。
4Parameter Logistic Model で回帰して下さい。

[標準曲線]



[キット性能]

標準曲線領域: 7.8125 ~ 500 ng/mL

日内再現性 (n=7, 2 濃度): CV(%) = 6.7, 1.8

日間再現性 (n=10, 2 濃度): CV(%) = 3.6, 7.8

添加回収試験: $\times 30$ 正常血清に既知濃度(300 ng/mL)の AGEs を添加した場合: 93% ~ 106% 以内

〔使用上の注意〕

- ・試薬は -30°C で保管し、再凍結・融解は避けて下さい。(融解後は冷蔵にて保管し、4週間以内に使用してください。)
- ・プレートの乾燥はデータエラーの原因になります。
- ・使用期限を過ぎた試薬は使用しないで下さい。
- ・血清サンプルは30倍以上に希釈して測定して下さい。
- ・溶解した標準品及び抗体は、室温で長時間放置しないで下さい。
- ・発色液(基質液)を調製する器具は、よく洗浄したものを使用して下さい。
- ・OPD (オルトフェニレンジアミン) は有害物質ですので取り扱いに注意して下さい。
- ・反応停止液は1N 硫酸を使用していますので、取り扱いに注意して下さい。
- ・本キット内でも他のロットのものとの併用、混合による使用はしないで下さい。
- ・本品は研究用試薬であり、医薬品その他の目的にはご使用になれません。
- ・取り扱い中は皮膚、粘膜、着衣に触れたり、目に入らないように適切な措置を行なって下さい。
- ・試薬が誤って目や口に入った場合には、水で十分に洗い流すなどの応急処置を行ない、必要があれば医師の手当てを受けて下さい。
- ・取り扱い後には手洗いを十分に行なって下さい。
- ・容器の破損、異物混入など異常が認められたものは使用しないで下さい。
- ・使用後の容器および廃液は廃棄物に関する規定に従って処理して下さい。
- ・容器、付属品などの他目的への転用は保証できません。

〔使用期限〕キット外箱に表示

This product is generated from GANP[®] mice.

人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)

TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619

TEL : (03) 5632-9620