

Tau ELISA kit Wako

【Introduction】

Tau is a microtubule-associated protein that is mainly expressed in neurons in the central nervous system and regulates stability of microtubules. In the brain in patients with Alzheimer's disease, aggregates of phosphorylated Tau or neurofibrillary tangles are formed, and extent of the formation has been reported to be correlated to severity of dementia. Tau, therefore, has been studied to investigate causes of Alzheimer's disease and to development drugs for treating the disease. On the other hand, the concentrations of Total Tau and phosphorylated Tau in cerebrospinal fluid are higher in Alzheimer's disease patients than in non-dementia subjects.

This product is an ELISA kit that readily allows measurement of Tau. This kit recognizes total Tau whether it is phosphorylated or not.

【Kit Performance】

Standard curve range	4.1-1000 pg/mL
Reactive Tau	Total Tau
Sample	Human cerebrospinal fluid (CSF)
Sample volume	10 μ L-*
Assay time	3 hours
Detection method	Luminescent system

*It is recommended that CSF sample volume is 50 μ L, considering accuracy of dilution.

【Kit Content】

Component	Condition	Volume or quantity
Antibody-coated Plate	Use as is	1 plate 96 wells(8 × 12)
Tau Standard	Use after reconstitution	1 tube
Buffer	Use as is	60 mL/1 tube
Biotin-conjugated Antibody Solution	Use after preparation	100 μ L/1 tube
Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Use after preparation	100 μ L/1 tube
Luminescent Reagent 1	Use as is	6 mL/1 tube
Luminescent Reagent 2	Use as is	6 mL/1 tube
Wash Solution (10 ×)	Use after preparation	100 mL/1 tube
Sample Buffer 1	Use as is	0.6 mL/1 tube
Sample Buffer 2	Use as is	30 mL/1 tube
Plate Seal	Use as is	3 sheets
Instruction manual		1 copy

【Measurement Principle】

The microplate is coated with anti Tau monoclonal antibody (epitope, C-terminal region of Tau corresponding to positions 412-432 a.a.). In each well, the standard solution or sample and biotin-conjugated anti Tau monoclonal antibody (epitope, middle region of Tau corresponding to positions 211-231 a.a.) are incubated to proceed with the antigen-antibody reaction. Furthermore, peroxidase-conjugated streptavidin is added to

proceed with the biotin-streptavidin binding. Finally, peroxidase activity in each well is measured to determine total Tau concentration in the sample.

Equipment or materials required but not supplied

- Purified water (distilled water)
- Tubes for dilution of a standard solution or sample
- Glass utensils for dilution of Wash Solution (graduated cylinder and beaker)
- Pipettes with disposable tips (one capable of pipetting 10 μ L of liquid accurately and one capable of pipetting 100 to 500 μ L)
- Repetitive dispenser pipette, capable of continuously dispensing 50 μ L and 100 μ L
- Water absorbing material such as paper towel (used to remove liquid remaining in the plate after rinsing)
- Stirrer (Vortex type)
- Microplate shaker (approximately 600 to 800 rpm)
- 96-well plate washer (preferable if available) or washing bottle
- 96-well plate reader (for luminescent measurement)
- Data processing software

【Preparation Methods of Reagents】

(1) Preparation of standard solution

Reconstitute the standard with the volume of purified water* stated in a separate sheet (standard stock solution, 10 ng/mL), and then mix with the Buffer included in the kit to prepare standard solutions as shown below.

*Because the volume of purified water to be added differs depending on the lot, see the specified volume in the annex

Concentration of the standard solution(pg/mL)	Volume of the preceding standard solution	Buffer
1000	Stock solution (10 ng/mL) : 50 μ L	450 μ L
400	Standard solution at 1000 pg/mL : 200 μ L	300 μ L
160	Standard solution at 400 pg/mL : 200 μ L	300 μ L
64.0	Standard solution at 160 pg/mL : 200 μ L	300 μ L
25.6	Standard solution at 64.0 pg/mL : 200 μ L	300 μ L
10.2	Standard solution at 25.6 pg/mL : 200 μ L	300 μ L
4.10	Standard solution at 10.2 pg/mL : 200 μ L	300 μ L
0.00	—	300 μ L

(2) Biotin-conjugated Antibody Solution

Dilute this solution 100 folds with the Buffer.

(3) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

Dilute this solution 100 folds with the Buffer.

(4) Luminescent Reagent 1 and 2

Mix Luminescent Reagent 1 and 2 in equal volumes (1:1, vol./vol.) 15 to 30 minutes before use.

Store the mixture protected from light.

Example: Mix 6 mL each of Luminescent Reagent 1 and 2 (in a case where all of 96 wells are to be used)

(5) Wash Solution (10 ×)

Dilute this solution 10 fold with purified water (distilled water).

Example: Mix 100 mL of Wash Solution (10 ×) and 900 mL of purified water (distilled water) (in a case where all of 96 wells are to be used)

○ Use other reagents as they are.

【Stability and Storage Methods of Reagents】

- (1) Antibody-coated Plate
Store unused antibody-coated strips (kept refrigerated with a seal covered) at 2°C to 10°C in a reclosable pack included in the kit. This component remains stable until the expiration date.
- (2) Tau Standard
Reconstitute the standard with the volume of purified water stated in a separate sheet* (standard stock solution, 10 ng/mL). Proceed with the subsequent preparation using the Buffer included in the kit, which has been brought to room temperature. For the volume of purified water to be added, see the annex. (*because the volume of purified water to be added differs depending on the lot, see the specified volume in the annex) Use each standard solution immediately after the dilution, and do not store them.
- (3) Buffer
If a part of the Buffer is used, transfer a volume slightly larger than that required to another container, close the lid tightly soon after use, keep the remaining Buffer cool without bringing it back to room temperature, and store it at 2°C to 10°C. This component remains stable until the expiration date.
- (4) Biotin-conjugated Antibody Solution and (5) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution
If a divided part of the kit is used, dilute the stock solution immediately after taking out of the refrigerator, close the lid tightly soon after use, keep the remaining stock solution cool without bringing it back to room temperature, and store it at 2°C to 10°C. This component remains stable until the expiration date. Discard the remaining diluted solution after use.
- (5) Luminescent Reagent 1 and 2
If a divided part of the kit is used, proceed with preparation immediately after taking the Luminescent Reagents out of the refrigerator, close the lid tightly soon after use, keep the remaining reagents cool without bringing them back to room temperature, and store them at 2°C to 10°C. This component remains stable until the expiration date.
- (6) Wash Solution (10 ×)
Store the Wash Solution (10 ×) with the lid tightly closed at 2°C to 10°C. This component remains stable until the expiration date. Discard the remaining diluted wash solution after use.
- (7) Sample Buffer 1 and 2
If a divided part of the kit is used, proceed with preparation immediately after taking the Sample Buffers out of the refrigerator, close the lid tightly soon after use, keep the remaining buffers cool without bringing them back to room temperature, and store them at 2°C to 10°C. This component remains stable until the expiration date.

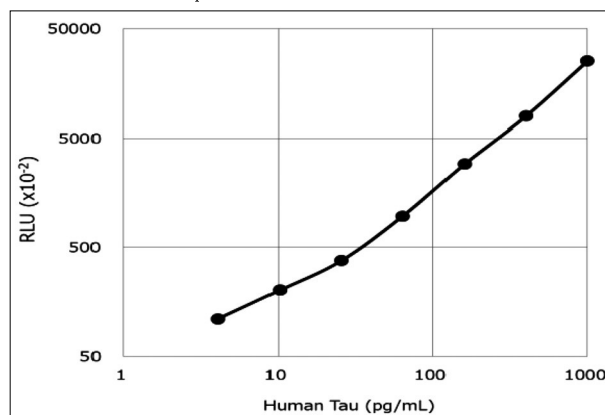
【Sample Preparation Method】

1. To human cerebrospinal fluid (CSF) collected by the established procedure, add its 1/10 volume of Sample Buffer 1 that has been brought to room temperature, stir, and allow to stand at room temperature for 30 minutes. (preferably, to 50 μL of CSF, add 5 μL of Sample Buffer 1)
2. Then, further add its 4-fold volume of Sample Buffer 2 that has been brought to room temperature, stir, allow to stand at room temperature for 15 to 20 minutes, and use this mixture as the prepared sample (preferably, make 220 μL). Note that Sample Buffer 2 has a blue color.

【Measuring Operations】

1. Fill each well of the antibody-coated plate with the previously diluted wash solution, and discard the solution to wash the well. Repeat the above washing operation 4 times in total. Then, tap the plate upside down gently against a paper towel to remove the remaining solution from wells.
2. Dispense 50 μL of the diluted biotin-conjugated antibody solution to each of wells for standards and ones for samples.
3. Add 50 μL of the standard solution at each concentration to each of wells for that standard solution.
4. Add 50 μL of the sample prepared with sample buffers (prepared samples) to each of wells for that samples.
5. Shake the plate using a microplate shaker.
6. Attach a plate seal, and allow to stand at room temperature (20°C to 25°C) for 2.5 hours.
7. After end of the reaction, discard the reaction mixture. Fill each well with the diluted wash solution, and discard the solution to wash the well. Repeat the above washing operation 4 times in total. Then, tap the plate upside down gently against a paper towel to remove the remaining solution from wells.
8. Dispense 100 μL of the diluted Peroxidase-conjugated streptavidin solution to each well. Shake the plate using a microplate shaker.
9. Attach a plate seal, and allow to stand at room temperature (20°C to 25°C) for 30 minutes.
10. After end of the reaction, discard the reaction mixture. Fill each well with the diluted wash solution, and discard the solution to wash the well. Repeat the above washing operation 4 times in total. Then, tap the plate upside down gently against a paper towel to remove the remaining solution from wells.
11. Dispense 100 μL of the mixed luminescent reagent to each well. Shake the plate using a microplate shaker for 1 minute.
12. After stirring, measure the luminescent intensity with a 96-well plate reader (for luminescent measurement). It is recommended to perform the measurement within 10 to 20 minutes after addition of the combined luminescent reagent.
13. Prepare a standard curve by plotting the standard solution concentration (pg/mL) on the X-axis and the luminescent intensity on the Y-axis. Read the concentration (pg/mL) corresponding to the luminescent intensity of the diluted sample. Multiply the read concentration by a dilution factor for the sample (5.5) to obtain the measured value.
*For software-based computation, it is recommended to use cubic polynomial with 4 or 5 parameters.

Standard curve (example)



[Precautions for Use]

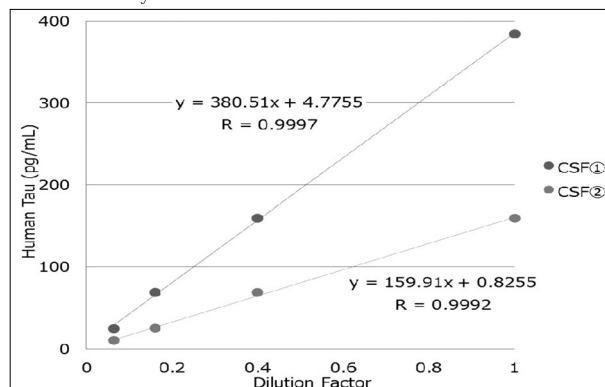
1. Please use polypropylene container. It is recommended to store samples at -35°C or lower if store for an extended period. Do not repeat freeze-thawing. Thaw the frozen sample just before use, and stir the thawed sample sufficiently. Prepare the samples before use.
2. Remove the turbidity or insoluble matters from a sample by centrifugation, etc., if any, before measurement.
3. If a sample is suspected of containing any interfering substance, measure the concerned samples at different dilution factors to check the dilution linearity. Dilute a prepared sample with the diluted wash solution ($1 \times$) if applicable.
4. This kit shall be used by an operator who has completed training for ELISA method or under appropriate supervision.
5. This kit shall be used by an operator who has a stably reproducible pipetting skill if the measurement is manually operated.
6. Wear gloves, glasses, and protective garment during preparation and operation with this kit.
7. Avoid skin contact with any reagent. In case where any reagent in this kit comes in contact with eyes, mouth, wound, or skin by mistake, provide emergency care, for instance, rinsing immediately with plenty of water, and seek medical advice if necessary.
8. Do not drink, eat, or smoke in a place where this kit is used.
9. Handle samples carefully as ones with a risk of infection. Note that this kit contains animal-derived substances.
10. Soak any used sample or consumables in a solution containing 1% formalin and 2% glutaraldehyde or $\geq 0.1\%$ sodium hypochlorite solution for at least 1 hour. Or autoclave them before disposition. Dispose used consumables and unused reagents in accordance with rules of the facility and regional regulations.
11. Do not mix reagents with different lot numbers for use. To prevent drying of the well surface, contamination with foreign matters, biased temperature distribution, or evaporation of dispensed reagents, affix the plate seal during static incubation in each step.
12. Note that any ELISA method is affected by measurement environment. Ensure that places for measurement operations and static incubation are kept at room temperature of 20°C to 25°C (on the bench or in an incubator). In addition, avoid the measurement in an environment with air flow (including one from an air-conditioning system) and low humidity.

[Example of measurement]

Spike-recovery test

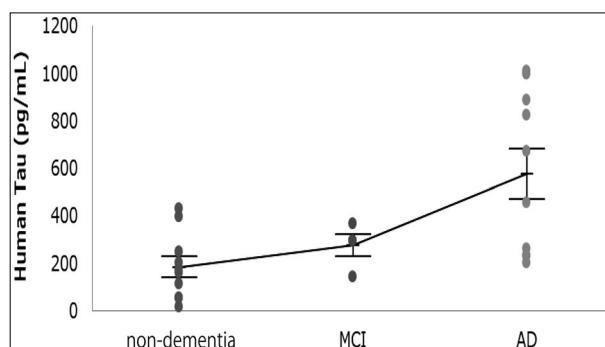
Human CSF [1]	Unspiked	Spiked with Tau at 20 pg/mL		Spiked with Tau at 60 pg/mL		Spiked with Tau at 150 pg/mL	
	Measured value	Measured value	Recovery	Measured value	Recovery	Measured value	Recovery
	4.09 pg/mL	24.8 pg/mL	104%	58.1 pg/mL	90%	175 pg/mL	114%
Human CSF [2]	Unspiked	Spiked with Tau at 40 pg/mL		Spiked with Tau at 135 pg/mL		Spiked with Tau at 380 pg/mL	
	Measured value	Measured value	Recovery	Measured value	Recovery	Measured value	Recovery
	24.8 pg/mL	70.5 pg/mL	114%	160 pg/mL	100%	390 pg/mL	96.1%

Dilution linearity



Measurement of CSF samples

CSF samples from non-dementia subjects (non-dementia), patients with mild cognitive impairment (MCI), and those with Alzheimer's disease (AD) were measured with this ELISA kit.



Non-dementia1	430	MCI1	295	AD1	458
Non-dementia2	157	MCI2	294	AD2	231
Non-dementia3	246	MCI3	369	AD3	260
Non-dementia4	52.7	MCI4	142	AD4	826
Non-dementia5	14.1			AD5	230
Non-dementia6	397			AD6	670
Non-dementia7	53			AD7	1000
Non-dementia8	112			AD8	201
Non-dementia9	178			AD9	1011
Non-dementia10	203			AD10	886
Mean for non-dementia	184	Mean for MCI	275	Mean for AD	577

→ A difference was observed in measured value between non-dementia subjects and patients with Alzheimer's disease.

[Outline of Measurement Procedures]

- Bring the plate and reagents back to room temperature (20°C to 25°C).
- Dilution of Wash Solution concentrate: Dilute 10 folds with purified water that has been brought to room temperature.
- Dilution of the standard solution (example) : Reconstitute the standard with the volume of purified water stated in a separate sheet (standard stock solution, 10ng/mL), and then mix with the Buffer of the kit to prepare standard solutions as shown below.

Example of dilutions	Concentration (pg/mL)	1000	400	160	64.0	25.6	10.2	4.10	0
Standard solution (μL)	Stock	50	200*	200*	200*	200*	200*	200*	0
Buffer (μL)		450	300	300	300	300	300	300	300

*: Preceding standard solution at a one-level higher concentration

- Preparation of diluted biotin-conjugated antibody solution (dilute the Biotin-conjugated Antibody Solution 100 folds with Buffer that has been brought to room temperature.)
- Preparation of working (prepared) samples
To a sample, add its 1/10 volume of Sample Buffer 1, stir, and allow to stand at room temperature for 30 minutes. Then, further add its 4-fold volume of Sample Buffer 2, stir, and allow to stand at room temperature for 15 to 20 minutes. (Preferably : 50 μL sample, 5 μL sample buffer 1, 220 μL sample buffer 2)

• Antibody-coated Plate

- ↓ Repeat washing operation 4 times (*[1])
- Diluted biotin-conjugated antibody solution 50 μL/well
- Standard solution or prepared sample 50 μL/well
- ↓ Stirring (*[2]) and then static incubation for reaction at room temperature (20°C to 25°C) for 2.5 hours (*[3])

↓

- *Preparation of diluted peroxidase-conjugated streptavidin solution (dilute Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution 100 folds with Buffer that has been brought to room temperature)

- ↓ Repeat washing operation 4 times (*[1])
- Diluted peroxidase-conjugated streptavidin solution 100 μL/well
- ↓ Stirring (*[2]) and then static incubation for reaction at room temperature (20°C to 25°C) for 30 minutes (*[3])

↓

- *Preparation of combined luminescent reagent (mix Luminescent Reagents 1 and 2 in equal volumes [1:1, vol./vol.]

- ↓ Repeat washing operation 4 times (*[1])
- Mixed luminescent reagent 100 μL/well
- ↓ Stirring at room temperature (20 to 25°C) for 1 minute
- Measurement of luminescent intensity (within 10 to 20 minutes after addition)

(*[1]) In each washing operation, dispense the diluted wash solution to wells, shake the plate gently on the palm of your hand for approximately 10 seconds, and discard the solution. After 4 continuous washing operations, tap the plate upside down against a paper towel to remove the remaining solution completely from wells. After removing the diluted wash solution, dispense the next solution immediately with care so as not to dry the well surface. If a pipette is used to dispense the diluted wash solution, set the volume at 300 μL/well.

(*[2]) Stir at 600 to 800 rpm for 10 seconds, and repeat 3 times.

(*[3]) After stirring, affix a plate cover seal, and allow to stand. Peel the liner from a plate seal, and attach the seal with the adhesive side on the plate. Do not reuse any plate seal.

Storage Condition : Store at 2-10°C

Expiration date : Indicated on the label.

Package : For 96 tests

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
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
 Richmond, VA 23237
 U.S.A.
 Telephone : + 1-804-271-7677
 Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggenstrasse 12
 D-41468 Neuss
 Germany
 Telephone : + 49-2131-311-0
 Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 296-80401

Tau ELISA キットワコー

【はじめに】

Tau は、微小管結合タンパク質の一つで、主に中枢神経系の神経細胞に発現しており、微小管の安定性を制御しています。アルツハイマー病患者の脳では、リン酸化 Tau が蓄積した神経原線維変化が形成され、その出現の程度が認知症の重症度と相関すると報告されています。そのため、Tau はアルツハイマー病の原因究明や治療薬開発のために研究されています。一方、脳脊髄液の総 Tau とリン酸化 Tau の濃度は、アルツハイマー病患者では非認知症患者よりも上昇すると報告されています。

本品は Tau を簡便に測定可能な ELISA キットです。リン酸化状態に関わらずすべての Tau を認識します。

【キット性能】

検量線範囲	4.10 ~ 1000 pg/mL
測定対象	Total Tau
測定対象検体	ヒト脳脊髄液 (CSF)
必要検体量	10 μ L ~*1
測定時間	3 時間
検出法	発光系

*1 希釈の正確さを考慮して CSF 検体量は 50 μ L を推奨しています。

【キット内容】

構 成 品	状 態	容 量
Antibody-coated Plate/ 抗体固相化プレート	そのまま使用	1 プレート 96 wells (8 \times 12)
Tau Standard/Tau 標準品	溶解後使用	1 本
Buffer/ 緩衝液	そのまま使用	60 mL / 1 本
Biotin-conjugated Antibody Solution/ ビオチン結合抗体溶液	調製後使用	100 μ L / 1 本
Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution/ ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液	調製後使用	100 μ L / 1 本
Luminescent Reagent 1/ 発光試薬 1	そのまま使用	6 mL / 1 本
Luminescent Reagent 2/ 発光試薬 2	そのまま使用	6 mL / 1 本
Wash Solution (10 \times) / 洗浄液 (10 \times)	調製後使用	100 mL / 1 本
Sample Buffer 1/ 検体調製液 1	そのまま使用	0.6 mL / 1 本
Sample Buffer 2/ 検体調製液 2	そのまま使用	30 mL / 1 本
プレートシール	そのまま使用	3 枚
取扱説明書		1 部

【測定原理】

測定プレートの中には抗 Tau モノクローナル抗体 (エピトープ: Tau C 末端側、412-432 a.a.) が固相化されています。このウエルに標準溶液または検体と、ビオチン標識抗 Tau モノクローナル抗体 (エピトープ: Tau 中央部分、211-231 a.a.) を入れて反応させます。さらにペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを反応させます。最後にウエル中のペルオキシダーゼ活性を測定することにより、検体中の Tau (total) の濃度を求めることができます。

【使用器具および装置】

- ・精製水 (蒸留水)
- ・標準溶液 / 検体希釈用チューブ
- ・洗浄液希釈用ガラス器具 (メスシリンダー・ピペーター)

—9/16—

- ・チップ交換型ピペット (使い捨てチップで 10 μ L を正確にピペティングできるもの、および 100 ~ 500 μ L を正確にピペティングできるもの)
- ・連続分注ピペット、50 μ L、100 μ L 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 ~ 800 rpm)
- ・96 ウエルプレート用洗浄機 (あれば好ましい) または洗浄瓶
- ・96 ウエルプレートリーダー (発光測定用)
- ・データ処理ソフトウェア

【試薬類の調製法】

(1) 標準溶液の調製

標準品に別紙に記載*の指定量の精製水を加え溶解し (標準品原液: 10 ng/mL)、その後キット添付の緩衝液で各濃度の標準溶液を下記のように混合して標準溶液を調製して下さい。*ロットにより精製水を添加する量が異なりますので、別紙に記載の指定量をご確認ください。

標準溶液濃度 (pg/mL)	標準溶液の容量	緩衝液
1000	原液 (10 ng/mL): 50 μ L	450 μ L
400	1000 pg/mL の標準溶液: 200 μ L	300 μ L
160	400 pg/mL の標準溶液: 200 μ L	300 μ L
64.0	160 pg/mL の標準溶液: 200 μ L	300 μ L
25.6	64.0 pg/mL の標準溶液: 200 μ L	300 μ L
10.2	25.6 pg/mL の標準溶液: 200 μ L	300 μ L
4.10	10.2 pg/mL の標準溶液: 200 μ L	300 μ L
0.00	—	300 μ L

(2) ビオチン結合抗体溶液

緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。

(3) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。

(4) 発光試薬 1 および発光試薬 2

使用する 15~30 分前に、発光試薬 1 と発光試薬 2 を 1:1 (vol./vol.) で混合してください。
使用するまで遮光しておいてください。
例: 発光試薬 1 (6 mL): 発光試薬 2 (6 mL) の混合 (96 ウエル全て使用する場合)

(5) 洗浄液 (10 \times)

精製水 (蒸留水) で 10 倍に希釈して使用してください。
例: 100 mL の濃縮洗浄液 (10 \times) + 900 mL の精製水 (蒸留水) (96 ウエル全て使用する場合)

○その他の試薬はそのまま使用します。

【試薬の安定性と保存方法】

(1) 抗体固相化プレート

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) 抗体固相化ストリップは同梱のジップシールバックに戻し、そのまま 2 ~ 10 $^{\circ}$ C で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(2) 標準品

標準品に精製水を別紙に記載の指定量を加え溶解し*、標準品原液 (10 ng/mL) を調製してください。(*ロットにより精製水を添加する量が異なりますので、別紙に記載の指定量をご確認ください。) その後室温化されたキット添付緩衝液で調製してください。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

—10/16—

(3) 緩衝液

溶液の一部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、残りは室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(4) ビオチン結合抗体溶液および (5) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

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ず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。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下さい。

(5) 発光試薬 1 および発光試薬 2

キットを分割して使用する際は冷蔵庫より取り出し調製をしてください。残りの発光試薬は室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(6) 洗浄液 (10×)

洗浄液 (10×) を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。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下さい。

(7) 検体調製液 1 および検体調製液 2

キットを分割して使用する際は冷蔵庫より取り出し、調製をしてください。残りの調製液は室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

【検体調製方法】

1. 定法により採取したヒト脳脊髄液 (CSF) に室温化した検体調製液 1 を 1/10 量添加し攪拌後、室温で 30 分間静置します。(推奨量: CSF: 50 μ L、検体調製液 1: 5 μ L)
2. その後、さらに室温化した検体調製液 2 を 4 倍量添加し攪拌後、室温で 15～20 分静置し、調製済み検体とします (CSF+検体調製液 1 が 55 μ L のときの推奨量 検体調製液 2: 220 μ L)。なお検体調製液 2 は青色です。

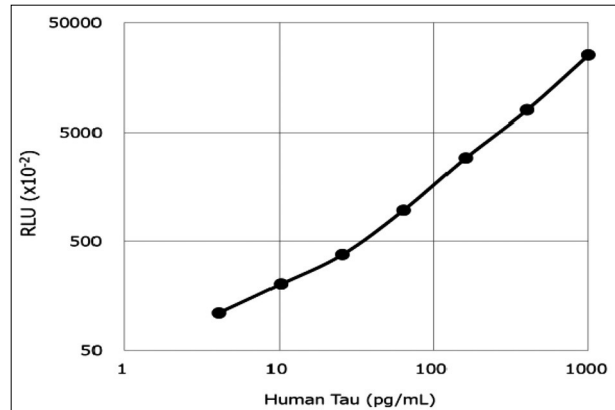
【測定操作】

1. 抗体固相化プレートにあらかじめ調製した洗浄液を各ウエルに満たし、4 回洗浄します。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エルに残った液を取り除きます。
2. 標準品測定ウエルと検体測定ウエルにビオチン標識抗体溶液を 50 μ L ずつ分注します。
3. 標準品測定ウエルに各濃度の標準溶液を 50 μ L ずつ分注します。
4. 検体測定ウエルに検体調製液で調製した検体 (調整済み検体) を 50 μ L ずつ分注します。
5. マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌します。
6. プレートシールを貼り、室温 (20～25℃) で 2.5 時間静置します。
7. 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし、4 回洗浄します。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エルに残った液を取り除きます。
8. 各ウエルにペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を 100 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します。
9. プレートシールを貼り、室温 (20～25℃) で 30 分間静置します。
10. 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし 4 回洗浄します。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エルに残った液を取り除きます。
11. 各ウエルに混和調製した発光試薬を 100 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 1 分間、攪拌します。
12. 攪拌後、96 ウエルマイクロプレートリーダー (発光測定用) で発光強度を測定します。発光試薬添加後、10 分～20 分の間での測定を

推奨します。

13. X 軸を標準溶液濃度 (pg/mL)、Y 軸を発光強度の検量線を作成します。希釈検体の発光強度に対応する濃度 (pg/mL) を読み取ります。読み取った濃度に検体希釈率 (5.5 倍) をかけて測定値とします。
*コンピュータソフトでの演算処理では、3 次多項式、4 または 5 パラメーターの使用をお勧め致します。

検量線 (例)



【使用上の注意】

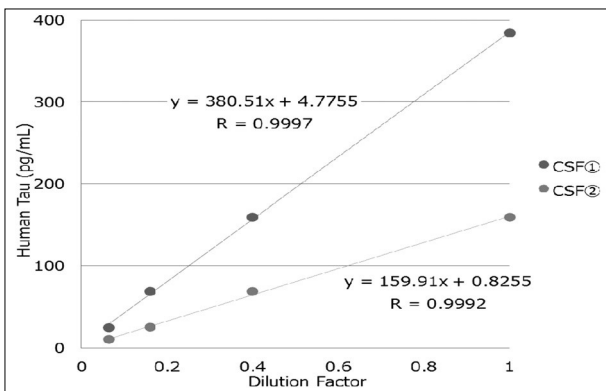
1. 検体を入れる容器はポリプロピレン製のものを使用してください。長期に保管する場合は、-35℃以下での凍結保管を推奨します。繰り返し凍結融解は避けて下さい。凍結した検体は測定する直前に解凍し十分に攪拌して下さい。また検体は用時調製して下さい。
2. 濁り及び不溶解物のある検体は遠心分離等で除去後測定に用いて下さい。
3. 妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、2 種以上の異なる希釈率で希釈直線性を確認して下さい。調製済み検体の希釈は洗浄液 (1×) で行ってください。
4. キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の方でご使用下さい。
5. 的手法操作で測定する際にはピペッティング操作の再現性が安定した方がご使用下さい。
6. 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下さい。
7. 試薬類を皮膚に付けないで下さい。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、必要場合は医師の手当てを受けて下さい。
8. 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下さい。
9. 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下さい。本キットは動物由来の成分を含んでいます。
10. 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 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。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下さい。
11. ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。各ステップでの静置反応時には、ウエルの乾燥、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下さい。
12. 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) を厳守して下さい。また、風速 (エアコン風も含む) 低湿度の環境下での測定は避けて下さい。

【測定例】

○添加回収試験

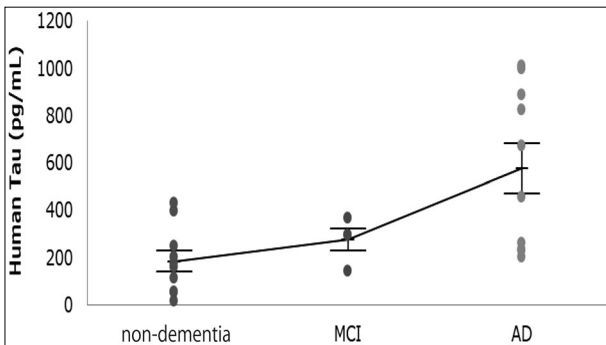
ヒト脳脊髄液 ①	未添加	20 pg/mL Tau 添加	60 pg/mL Tau 添加	150 pg/mL Tau 添加			
	測定値	測定値	Recovery	測定値	Recovery	測定値	Recovery
	4.09 pg/mL	24.8 pg/mL	104%	58.1 pg/mL	90%	175 pg/mL	114%
ヒト脳脊髄液 ②	未添加	40 pg/mL Tau 添加	135 pg/mL Tau 添加	380 pg/mL Tau 添加			
	測定値	測定値	Recovery	測定値	Recovery	測定値	Recovery
	24.8 pg/mL	70.5 pg/mL	114%	160 pg/mL	100%	390 pg/mL	96.1%

○希釈直線性



○脳脊髄液検体での測定

非認知症者 (non-dementia)、軽度認知障害患者 (MCI)、アルツハイマー病患者 (AD) の脳脊髄液を本 ELISA で測定した。



Non-dementia1	430	MCI1	295	AD1	458
Non-dementia2	157	MCI2	294	AD2	231
Non-dementia3	246	MCI3	369	AD3	260
Non-dementia4	52.7	MCI4	142	AD4	826
Non-dementia5	14.1			AD5	230
Non-dementia6	397			AD6	670
Non-dementia7	53			AD7	1000
Non-dementia8	112			AD8	201
Non-dementia9	178			AD9	1011
Non-dementia10	203			AD10	886
Mean for non-dementia	184	Mean for MCI	275	Mean for AD	577

→ 非認知症者とアルツハイマー病患者間で測定値に差が見られた。

【測定手順概要】

- ・プレート、試薬類を十分に室温 (20 ~ 25℃) に戻して下さい。
- ・濃縮洗浄液の希釈：室温化した精製水で、10 倍に希釈して下さい。
- ・標準溶液の希釈 (例)：標準品に精製水を別紙に記載の指定量を加え溶解 (標準品原液、10ng/mL) し、その後キットの緩衝液で各濃度の標準溶液を下記のように混合して標準溶液を調製して下さい。

希釈例	濃度 (pg/mL)	1000	400	160	64.0	25.6	10.2	4.10	0
標準溶液 (μL)	凍凍液 (μL)	50	200*	200*	200*	200*	200*	200*	0
緩衝液 (μL)		450	300	300	300	300	300	300	300

*:ひとつ高濃度の標準溶液

- ・ビオチン結合抗体溶液の調製 (室温化した緩衝液で 100 倍希釈して下さい。)
- ・検体の調整
検体に検体調製液 1 を 1/10 量添加して攪拌後、室温で 30 分間静置 (推奨量 検体：50 μL、検体調製液 1：5 μL)。その後検体調製液 2 を 4 倍量添加し攪拌後、室温で 15 ~ 20 分静置する (推奨量 検体調製液 2：220 μL)。

・抗体固相化プレート

- ・↓ 洗浄 4 回 (*①)
- ・ビオチン標識抗体溶液 50 μL / ウエル
- ・標準溶液または調製済み検体 50 μL / ウエル
- ・↓ 攪拌 (*②)、室温 (20 ~ 25℃)、2.5 時間反応、静置 (*③)
- ↓
- ・*ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液の調製 (室温化した緩衝液で 100 倍希釈して下さい)
- ・↓ 洗浄 4 回 (*①)
- ・ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液 100 μL / ウエル
- ・↓ 攪拌 (*②)、室温 (20 ~ 25℃)、30 分間反応、静置 (*③)
- ↓
- ・*発光試薬の調製 (発光試薬 1:発光試薬 2 = 1:1 (vol./vol.) に混和調製)
- ・↓ 洗浄 4 回 (*①)
- ・発光試薬 100 μL / ウエル
- ・↓ 1 分間 攪拌 室温 (20 ~ 25℃)
- ・発光強度測定 (10 分 ~ 20 分の間に測定)

(*①) 洗浄毎に洗浄液をウエルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。4 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。洗浄液除去後はウエル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 / ウエルです。

(*②) 攪拌の目安は 600 ~ 800 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下さい。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下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

〔貯 法〕 2-10℃保存
〔使用期限〕 ラベルに記載
〔包 装〕 96 回用

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

1808KA2