

## Mature BDNF ELISA Kit *Wako*, High Sensitive

### 1. Introduction

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is known to mediate neurogenesis, neuroprotection, synapses formation, and other biological processes to play key roles in the brain. Therefore, BDNF is expected to serve as a clinical marker for depression and other psychological diseases. In addition to nerve-related diseases, it is reportedly associated with cardiac diseases such as heart failure, thereby becoming a research target in a broad range of areas. BDNF has a precursor, proBDNF, which undergoes processing to convert it to mature BDNF (mBDNF). As such, proBDNF and mBDNF have been reported to have distinct mechanisms of action. Mature BDNF ELISA Kit *Wako*, High Sensitive is an ELISA kit capable of specifically measuring mBDNF concentrations in a sample.

With the use of a luminescence detection system, this product is more sensitive than our other products: approximately 35 times more sensitive compared with our standard product (code No. 296-83201 Mature BDNF ELISA Kit *Wako*). In addition, because it has lower cross-reactivity to proBDNF than conventional products, specific and highly sensitive measurement of mBDNF is possible.

### 2. Performance of the Kit

Range of standard curve concentrations	0.116-50 pg/mL
Analyte	mature BDNF*
Analyte samples	Mouse serum, plasma, and brain lysate Rat serum and plasma Human serum, plasma, and saliva
Required volume	13 $\mu$ L (as diluted 4-fold)
Assay time	Approx. 4 hours
Detection method	Luminescent detection

\* This kit has 1.30% cross-reactivity to recombinant human proBDNF, and 0.32% cross-reactivity to recombinant mouse proBDNF.

### 3. Materials Supplied

Component	State	Volume
Antibody-coated Plate	Use after washing	1 plate 96-wells (8 $\times$ 12 wells)
Mature BDNF Standard	Use after reconstitution	1 vial
Buffer	Ready-to-use	60 mL/1 vial
Biotin-conjugated Antibody	Use after reconstitution	1 vial

Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Use after dilution	100 $\mu$ L/1 vial
Luminescent Reagent 1	Ready-to-use	6 mL/1 vial
Luminescent Reagent 2	Ready-to-use	6 mL/1 vial
Wash solution (10 $\times$ )	Use after dilution	100 mL/1 vial
Plate Seal	Ready-to-use	4 sheets
Manual	—	1 book

### 4. Measurement Principle

The microplate is coated with anti-Mature BDNF monoclonal antibody. In each well, the standard solution or sample and Biotin-conjugated anti BDNF polyclonal antibody 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 Mature BDNF in the sample.

### 5. Equipment or Materials Required but not Supplied

- Purified water (distilled water)
- Test tubes for dilution of standard solution and samples
- Glass utensils for dilution of Wash Solution (e.g. volumetric cylinders and beakers)
- Pipettes with disposable tips (one capable of accurately pipetting 10  $\mu$ L of liquid, and one capable of accurately pipetting 200-500  $\mu$ L of liquid)
- Continuous dispensing pipettes for 100  $\mu$ L of liquid
- Water absorbents such as paper towels (used to remove the liquid remaining on the washed microplate)
- Stirrer (vortex type)
- Microplate shaker (approximately 600 to 800 rpm)
- Automatic washer (preferred) or washing bottles for 96-well microplates
- 96-well microplate reader for luminescence detection
- Software for data analysis

### 6. Reagents Preparation

Be sure to return kit reagents to room temperature (20-25°C) before use (approximately 2 hours).

The reagents described as "Ready-to-use" in the 3. Materials Supplied section shall be used as they are after being returned to room temperature. For the reagents described as "Use after reconstitution" or "Use after dilution," prepare only as much reagent as needed for measurements as instructed below.

#### 6-1. Standard Solution

Dissolve the Mature BDNF Standard in the specified volume (see Appendix)<sup>\*1</sup> of purified water added to prepare a standard stock solution (10.0 ng/mL). Thereafter, prepare standard solutions at various concentrations by mixing purified water and the standard stock solution using the kit component buffer, previously returned to room temperature, as follows :

\*1 Since the volume of purified water to be added varies among different lots, please confirm the volumes specified in Appendix. The following is an example formulation.

Standard solution concentration (pg/mL)	Volume of standard solution	Volume of Buffer
500.0	stock solution (10.0 ng/mL) : 20 $\mu$ L	380 $\mu$ L

↓

50.0	Standard solution (500.0 pg/mL) : 50 $\mu$ L	450 $\mu$ L
18.2	Standard solution (50.0 pg/mL) : 100 $\mu$ L	175 $\mu$ L
6.61	Standard solution (18.2 pg/mL) : 100 $\mu$ L	175 $\mu$ L
2.40	Standard solution (6.61 pg/mL) : 100 $\mu$ L	175 $\mu$ L
0.874	Standard solution (2.40 pg/mL) : 100 $\mu$ L	175 $\mu$ L
0.318	Standard solution (0.874 pg/mL) : 100 $\mu$ L	175 $\mu$ L
0.116	Standard solution (0.318 pg/mL) : 100 $\mu$ L	175 $\mu$ L
0 (Blank)	-	175 $\mu$ L

#### 6-2. Biotin-conjugated Antibody

Dissolve in 100  $\mu$ L of purified water, and dilute 100-fold with the Buffer.

#### 6-3. Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

Dilute 100-fold with the Buffer.

#### 6-4. Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2

Mix Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 in a 1 : 1 ratio (vol./vol.) and stored protected from light 15-30 minutes before use.

e.g. a mixture of Luminescent Reagent 1 (6 mL) and Luminescent Reagent 2 (6 mL) (when using all 96 wells)

#### 6-5. Wash Solution (10 $\times$ )

Dilute 10-fold with purified water (distilled water) before use. e.g., 100 mL of Wash Solution (10 $\times$ ) + 900 mL of purified water (distilled water) (when using all 96 wells)

○The other reagents are supplied Ready-to-use.

### 7. Reagent Stability and Storage

#### 7-1. Antibody-coated Plate

Unused antibody-immobilized strips should be returned to the attached zip seal pack and stored at 2-10 $^{\circ}$ C as they are. It is stable until the expiration date.

#### 7-2. Mature BDNF Standard

Store the prepared standard stock solution (10.0 ng/mL) at 2-10 $^{\circ}$ C, and use within 2 weeks. The standard solutions that have been diluted should be used immediately. Do not store. While in a freeze-dried state, it is stable until the expiration date.

#### 7-3. Buffer

When using a portion of the solution, transfer a volume slightly larger than required to another container, close the lid tightly, and store the remaining portion at 2-10 $^{\circ}$ C (do not return to room temperature). It is stable until the expiration date.

#### 7-4. Biotin-conjugated Antibody

Store the Biotin-conjugated Antibody in solution in purified water at 2-10 $^{\circ}$ C, and use within 2 weeks. The solution that has been diluted with the buffer should be used immediately. Do not store.

While in a freeze-dried state, this product is stable until the expiration date.

#### 7-5. Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

When using the kit in several divided portions, take out the solution from the refrigerator, dilute, immediately close the lid tightly, and store the remaining stock solution at 2-10 $^{\circ}$ C (do not return to room temperature). This product is stable until the expiration date. Discard the unused portions of diluted solutions.

#### 7-6. Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2

When using the kit in several divided portions, take out the solution from the refrigerator, prepare, immediately close the lid tightly, and store the remaining stock solution at 2-10 $^{\circ}$ C (do not return to room temperature). This product is stable until the expiration date.

#### 7-7. Wash Solution (10 $\times$ )

When storing the Wash Solution (10 $\times$ ), close the lid tightly, and store at 2-10 $^{\circ}$ C. This product is stable until the expiration date. Discard the unused portions of diluted Wash Solutions.

### 8. Method of Sample Preparation

After diluting the sample with Buffer, allow to stand at room temperature for 15 minutes before measurement. It is recommended that you optimize the dilution ratio to fall within the range of standard curve concentrations.

Sample	Dilution ratio
Mouse plasma and serum	4-fold
Mouse brain lysate Lysis buffer : RIPA buffer + Protease inhibitor	2-320-fold
Rat plasma	30-fold
Rat serum	50-fold
Human plasma	10-80-fold
Human serum	10-800-fold
Human saliva	2-8-fold

### 9. Assay Procedures

- (1) Remove the microplate protectant liquid, fill each well with a previously prepared Wash Solution, and wash four 4 times (\*①). Thereafter, invert the microplate on a paper towel or the like, and remove the liquid remaining in the wells by gentle tapping.
- (2) Dispense 50  $\mu$ L of the standard solution at each concentration to each well for standard measurement.
- (3) Dispense 50  $\mu$ L of the sample, previously diluted with Buffer in the optimum ratio, to each sample measurement well.
- (4) Stir using a microplate shaker or the like (\*②).
- (5) Apply a Plate Seal (\*③), and allow the microplate to stand

at room temperature (20-25°C) for 2 hours.

- (6) After completion of the reaction, discard the reaction liquid, fill each well with Wash Solution, and wash four 4 times (\*①).

Thereafter, invert the microplate on a paper towel or the like, and remove the liquid remaining in the wells by gentle tapping.

- (7) Dispense 50  $\mu$ L of Biotin-conjugated Antibody Solution to each well.

Stir using a microplate shaker or the like (\*②).

- (8) Apply a new Plate Seal (\*③), and allow to stand at room temperature (20-25°C) for 1 hour.

- (9) After completion of the reaction, perform the washing procedure described in (6).

- (10) Dispense 50  $\mu$ L of Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to each well.

Stir using a microplate shaker or the like (\*②).

- (11) Apply a Plate Seal (\*③), and allow the microplate to stand at room temperature (20-25°C) for 30 minutes.

- (12) After completion of the reaction, perform the washing procedure described in (6).

- (13) Dispense 50  $\mu$ L of prepared luminescent reagent mixture to each well.

Stir for 1 minute using a microplate shaker.

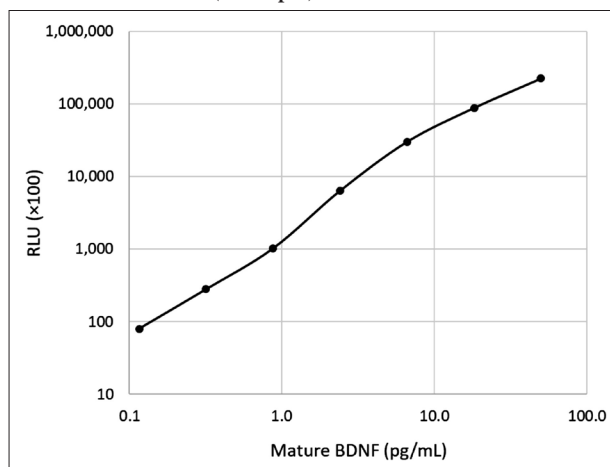
- (14) After stirring, determine luminescence intensity using a 96-well microplate reader for luminescence detection. It is recommended that measurements be taken over a period of 10 to 20 minutes after addition of luminescent reagent.

- (15) Generate a standard curve with the standard solution concentration (pg/mL) plotted on the X-axis, and luminescence intensity on the Y-axis. Read the concentration (pg/mL) corresponding to the luminescence intensity of the diluted sample. Multiply the concentration reading by the sample dilution ratio (e.g., 4-fold for mouse plasma and serum), and use the product as the assay value.

\*In computing using computer software, it is recommended to use a tertiary polynomial expression or four or five parameters.

For (\*①), (\*②), and (\*③), refer to the measurement procedure outline.

## 10. Standard Curve (Example)



## 11. Precautions

1. This kit should be used under the guidance of a person who has been trained in ELISA techniques or a trainer.
2. For manual measurements, this kit should be used by an operator who can stably obtain reproducible pipetting results.
3. Wear protective gloves, goggles, and a protective gown during preparatory work and operation of this kit.
4. Avoid contact between the skin and the reagents. In the event any reagent in this kit accidentally comes into contact with wounds, the eye, mouth, skin, and other parts of the body, take first-aid measures, such as by immediately washing off the reagent, and seeking medical attention as required.
5. Do not eat or smoke in the places where this kit is being used.
6. Samples should be carefully handled as they are potentially infectious. This kit contains animal-derived components.
7. Used samples, used consumables, etc. should be immersed in 1% formalin, 2% glutaraldehyde, or  $\geq$  0.1% sodium hypochlorite solution for 1 hour or more. Alternatively, such items may be autoclaved and discarded. Used consumables and unused chemicals should be discarded in accordance with the rules of your facility and local laws and regulations.
8. Reagents from different lots should not be used when preparing the mixture. During the standing reaction in each step, be sure to affix a Plate Seal to stop the well from drying out, prevent the entry of foreign matter, prevent uneven temperature distributions, and stop evaporation of dispensed reagents.
9. ELISA techniques are susceptible to the measurement environment. Room temperatures during measurements and the places used for standing reactions should be strictly controlled at 20-25 °C (on the experimental bench or in the incubator). And avoid measurements in an air flow (including air movement caused by an air-conditioner) and at low humidity. No heat sources (computers, incubators, etc.) should be placed close to the microplate to be reacted.

## 12. Assay Procedure Summary

Before performing any measurements, read through the operating manual, and confirm the sample conditions, measurement conditions, and measurement methods.

Bring the plate and reagents to room temperature (20-25°C) about 2 hours before use.

Preparation of Wash Solution (10×) : Dilute 10-fold with purified water, previously returned to room temperature.

Preparation of standard solutions (example) : Dissolve the Mature BDNF Standard in the specified volume (see Appendix)\* of purified water added to prepare a standard stock solution (10.0 ng/mL). Thereafter, prepare standard solutions at various concentrations using Buffer, previously returned to room temperature. For the volume of purified water to be added, refer to the Appendix.

\*Since the volume of purified water to be added varies among different lots, please confirm the volumes specified in Appendix. The following is an example formulation.

Concentration (pg/mL)	500.0	50.0	18.2	6.61	2.40	0.874	0.318	0.116	0
Standard solution (μL)	20	50	100*	100*	100*	100*	100	100	-
Buffer (μL)	380	450	175	175	175	175	175	175	175

\*Standard solution at a 1-step higher concentration.

**Antibody-coated Plate**

↓ Wash 4 times (\*①)

**Sample or standard solution** **50 μL/well**

↓ Stir the solution (\*②), react at room temperature (20-25°C) for 2 hours, and allow to stand (\*③).

\*Preparation of Biotin-conjugated Antibody (dissolve in 100 μL of purified water, and dilute 100-fold with Buffer, previously adjusted to room temperature)

↓ Wash 4 times (\*①)

**Biotin-conjugated Antibody** **50 μL/well**

↓ Stir the solution (\*②), react at room temperature (20-25°C) for 1 hour, and allow to stand (\*③).

\*Preparation of Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution (dilute 100-fold with Buffer, previously adjusted to room temperature)

↓ Wash 4 times (\*①)

**Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution** **50 μL/well**

↓ Stir the solution (\*②), react at room temperature (20-25°C) for 30 minute, and allow to stand (\*③).

\*Preparation of luminescent reagent (mix Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 in 1:1 ratio (vol./vol.).

↓ Wash 4 times (\*①)

**Luminescent Reagent** **50 μL/well**

↓ Stir at room temperature (20-25°C) for 1 minute.

**Measurement of luminescence intensity (measure between 10 and 20 minutes after sample preparation)**

(\*①) In each washing operation, dispense the Wash Solution (1×) into wells, gently agitate the filled plate on the palm for about 10 seconds, and then empty the wells. After washing the wells 4 times consecutively, reverse the plate, and tap it against paper towel to remove the washing solution completely. After removal of the Wash Solution, immediately dispense the next

solution with care not to dry the wells. Use of a pipet set at the liquid volume of 300 μL may be appropriate for dispensing the Wash Solution into each well.

(\*②) Three repeats of agitation at 600 to 800 rpm for 10 seconds may be appropriate.

(\*③) After stirring is complete, cover with a Plate Seal. Remove the liner from the Plate Seal, and apply its adhesive side to the plate for affixation. Do not re-use any Plate Seal.

**[Storage]** Store at 2-10°C.

**[Expiration date]** Indicated on the label.

**[Package]** For 96 assays.

## 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**

Fuggerstrasse 12  
D-41468 Neuss  
Germany  
Telephone : + 49-2131-311-0  
Facsimile : + 49-2131-311-100  
<http://www.wako-chemicals.de>

## Mature BDNF ELISA キットワコー、高感度品

### 1. はじめに

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は神経栄養因子のひとつで、神経発生・神経保護作用・シナプス形成などに関与し、脳内で重要な役割を担うことが知られています。そのことから、うつ病をはじめとした精神疾患マーカーとなることが期待されています。また神経関連のみならず、心不全などの心疾患などにも関連することが報告されており、幅広い分野で研究のターゲットとなっています。BDNF には前駆体である proBDNF が存在し、proBDNF はプロセッシングを受けることで Mature BDNF (mBDNF) となります。proBDNF と mBDNF は異なる作用を有することが報告されています。本品は検体中の mBDNF 濃度を特異的に測定可能な ELISA キットです。発光検出系を用いることで通常品（和光コード：296-83201 Mature BDNF ELISA キットワコー）の約 35 倍の感度を実現しました。また、proBDNF との交差性も既存品より低く抑えられているため、mBDNF を特異的かつ高感度に測定することができます。

### 2. キット性能

検量線範囲	0.116 ~ 50pg/mL
測定対象	mature BDNF
測定対象検体	マウス血清・血漿・脳破砕液 ラット血清・血漿 ヒト血清・血漿・唾液
必要検体量	13 $\mu$ L (4 倍希釈時)
測定時間	約 4 時間
検出法	発光系

\*リコンビナント human proBDNF に対して約 1.30%、リコンビナント mouse pro BDNF に対して約 0.32% の交差反応性を示します。

### 3. キット内容

構 成 品	状 態	容 量
Antibody-coated Plate/ 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8 × 12)/1 枚
Mature BDNF Standard/ Mature BDNF 標準品	凍結乾燥品・ 溶解後使用	1 本
Buffer/ 緩衝液	そのまま使用	60mL/1 本
Biotin-conjugated Antibody/ ビオチン結合抗体	凍結乾燥品・ 溶解後使用	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	希釈後使用	100 $\mu$ L/1 本
Luminescent Reagent 1/発光試薬1	そのまま使用	6mL/1 本
Luminescent Reagent 2/発光試薬2	そのまま使用	6mL/1 本
Wash Solution (10×)/洗浄液(10×)	調製後使用	100mL/1 本
Plate Seal/ プレートシール	そのまま使用	4 枚
取扱説明書	-	1 部

### 4. 測定原理

測定プレートの各ウェルには抗 mature BDNF 抗体が固相化されています。このウェルに標準溶液または検体を反応させます。次に、ビオチン標識抗 mature BDNF 抗体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。最後にウェ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 mature BDNF の濃度を求めることができます。

### 5. 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・ビーカー)
- チップ交換型ピペット (使い捨てチップで 10  $\mu$ L を正確にピペティングできるもの、および 200 ~ 500  $\mu$ L を正確にピペティングできるもの)
- 連続分注ピペット、100  $\mu$ 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 ~ 800rpm)
- 96 ウェルプレート用洗浄機 (あれば好ましい) または洗浄瓶
- 96 ウェ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

### 6. 試薬類の調製法

キットの試薬は使用前に必ず室温 (20 ~ 25 $^{\circ}$ C) に戻して下さい (2 時間程度)。

【3. キット内容】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。「溶解後使用」、「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で測定に必要な分だけ試薬を調製して下さい。

#### 6-1. 標準溶液の調製

Mature BDNF 標準品に別紙記載の指定量<sup>\*1</sup>の精製水を加え溶解し、標準品原液 (10.0ng/mL) を調製して下さい。その後室温化された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。

※1 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下さい。下記は一例です。

標準溶液濃度 (pg/mL)	標準溶液の容量	緩衝液
500.0	標準品原液 (10.0ng/mL) : 20 $\mu$ L	380 $\mu$ L
↓		
50.0	500.0pg/mL 溶液 : 50 $\mu$ L	450 $\mu$ L
18.2	50.0pg/mL 溶液 : 100 $\mu$ L	175 $\mu$ L
6.61	18.2pg/mL 溶液 : 100 $\mu$ L	175 $\mu$ L
2.40	6.61pg/mL 溶液 : 100 $\mu$ L	175 $\mu$ L
0.874	2.40pg/mL 溶液 : 100 $\mu$ L	175 $\mu$ L
0.318	0.874pg/mL 溶液 : 100 $\mu$ L	175 $\mu$ L
0.116	0.318pg/mL 溶液 : 100 $\mu$ L	175 $\mu$ L
0 (Blank)	-	175 $\mu$ L

## 6-2. ビオチン結合抗体

精製水を 100  $\mu$ L 加え溶解し、緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。

## 6-3. 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。

## 6-4. 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、遮光保存して下さい。

例：発光試薬 1 (6mL)：発光試薬 2 (6mL) の混合 (96 ウェル全てを使用する場合)

## 6-5. 洗浄液 (10 $\times$ )

精製水 (蒸留水) で 10 倍に希釈し使用して下さい。

例：100mL の洗浄液 (10 $\times$ ) + 900mL の精製水 (蒸留水) (96 ウェル全てを使用する場合)

○その他の試薬はそのまま使用します。

## 7. 試薬の安定性と保存方法

### 7-1. 抗体固相化プレート

未使用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。有効期限内は安定です。

### 7-2. Mature BDNF 標準品

調製した標準品原液 (10.0ng/mL) は 2 ~ 10 $^{\circ}$ C で保存し、2 週間以内に使用して下さい。希釈調製した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

凍結乾燥状態では、有効期限内は安定性です。

### 7-3. 緩衝液

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、残りは室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2 ~ 10 $^{\circ}$ C で保存して下さい。有効期限内は安定です。

### 7-4. ビオチン結合抗体

精製水を加え溶液化したビオチン結合抗体は 2 ~ 10 $^{\circ}$ C で保存し、2 週間以内に使用して下さい。緩衝液で希釈調製した溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

凍結乾燥状態では、有効期限内は安定性です。

### 7-5. 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 $^{\circ}$ C で保存して下さい。有効期限内は安定です。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

### 7-6. 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し、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 $^{\circ}$ C で保存して下さい。有効期限内は安定です。

### 7-7. 洗浄液 (10 $\times$ )

洗浄液 (10 $\times$ ) を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2 ~ 10 $^{\circ}$ C で保存して下さい。有効期限内は安定です。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

## 8. 検体調製方法

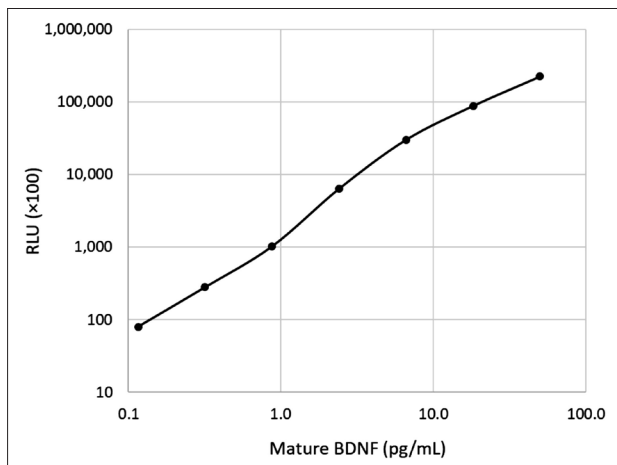
キット添付の緩衝液で検体を希釈後、室温で 15 分静置してから測定して下さい。検量線範囲内に収まるように適切な希釈倍率を検討されることをお勧めします。

検体	希釈倍率
マウス血漿、血清	4 倍
マウス脳破砕液 抽出 buffer：RIPA buffer+Protease inhibitor	2 ~ 320 倍(目安)
ラット血漿	30 倍(目安)
ラット血清	50 倍(目安)
ヒト血漿	10 ~ 80 倍(目安)
ヒト血清	10 ~ 800 倍(目安)
ヒト唾液	2 ~ 8 倍(目安)

## 9. 測定操作

- プレート保護液を除去し、あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし、4 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。
- 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 50  $\mu$ L ずつ分注します。
- 検体測定ウェルに緩衝液で至適倍率に希釈調製した検体を 50  $\mu$ 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。
- プレートシールを貼り (\*③)、室温 (20 ~ 25 $^{\circ}$ C) で 2 時間静置します。
- 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし、4 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。
- 各ウェルにビオチン結合抗体溶液を 50  $\mu$ 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。
- プレートシールを貼り (\*③)、室温 (20 ~ 25 $^{\circ}$ C) で 1 時間静置します。
- 反応終了後、(6) の洗浄操作を行います。
- 各ウェルにペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を 50  $\mu$ 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。
- プレートシールを貼り (\*③)、室温 (20 ~ 25 $^{\circ}$ C) で 30 分間静置します。
- 反応終了後、(6) の洗浄操作を行います。
- 各ウェルに混和調製した発光試薬を 50  $\mu$ L ずつ分注します。マイクロプレート振とう器を用いて 1 分間攪拌します。
- 攪拌後、96 ウェ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。
- X 軸を標準溶液濃度 (pg/mL)、Y 軸を発光強度の標準曲線を作成します。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 (例えば、マウス血漿/血清の場合は 4 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。  
(\*①)、(\*②)、(\*③) 測定手順概要をご参照下さい。

## 10. 検量線 (例)



## 11. 使用上の注意

- 本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の下でご使用下さい。
- 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下さい。
- 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下さい。
- 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、必要な場合は医師の手当てを受けて下さい。
- 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下さい。
- 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下さい。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。
- 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下さい。
- 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ー内温度）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。反応させるプレートの近くに熱源となるもの（パソコン、インキュベーター等）を置かないで下さい。

## 12. 測定手順概要

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、測定操作を行って下さい。

プレート、試薬類を十分に室温（20～25℃）に戻して下さい（約 2 時間）。

洗浄液（10×）の調製：室温化された精製水で、10 倍に希釈して下さい。

標準溶液の調製（例）：Mature BDNF 標準品に精製水を別紙に記載の指定量\* 加え溶解し、標準品原液（10.0ng/mL）を調製して下さい。その後、室温化したキット添付の緩衝液で調製して下さい。加える精製水の量は別紙をご参照下さい。

\* ロットにより精製水を添加する量が異なるため、別紙に記載の指定量をご確認下さい。下記は一例です。

調製例	濃度 (pg/mL)	500.0	50.0	18.2	6.61	2.40	0.874	0.318	0.116	0
標準溶液 (μL)	原液	20	50	100*	100*	100*	100*	100	100	100
緩衝液 (μL)		380	450	175	175	175	175	175	175	175

\*：ひとつ高濃度の標準溶液

**抗体固相化プレート**

↓ 洗浄 4 回 (\*①)

**検体または標準溶液** 50 μL / ウェル

↓ 攪拌 (\*②)、室温（20～25℃）、2 時間反応、静置 (\*③)

\* ビオチン結合抗体の調製（精製水 100 μL で溶解後、室温化した緩衝液で 100 倍希釈して下さい。）

↓ 洗浄 4 回 (\*①)

**ビオチン結合抗体** 50 μL / ウェル

↓ 攪拌 (\*②)、室温（20～25℃）、1 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** 50 μL / ウェル

↓ 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** 50 μL / ウェル

↓ 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。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。洗浄液除去後はウェ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 / ウェルです。

(\*②) 攪拌の目安は 600～800rpm-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