

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。なお、操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント(動画)]、並びに[Q&A]をご参照ください。また、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® Der fII ELISA Kit 』 取扱説明書

1.使用目的

本キットはダニアレルゲンであるコナヒョウヒダニ(*Dermatophagoides farinae*)の Der fII 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2時間20分です。
- 微量な試料で測定可能です。
- 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、希釈検体を抗 Der fII 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します。1時間のインキュベーションと洗浄後、HRP (ペルオキシダーゼ) 結合抗 Der fII 抗体を加え、1時間インキュベートします。再度の洗浄後、ウェルに残った HRP (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 Der fII 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℃～8℃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製造月から6ヵ月(外箱のラベルに記載)までは安定です。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 50 μL～500 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)、100 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)または噴射ピン □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) 抗体固相化 96 ウェルプレート(乾燥プレート)	洗浄後使用	96 wells(8×12)/1枚
(B) Der fII 標準溶液(500 ng/mL)	希釈後使用	200 μL/1本
(C) 緩衝液(青色)	そのまま使用	60 mL/1本
(D) HRP 結合抗 Der fII 抗体	希釈後使用	200 μL/1本
(F) 発色液(TMB)	そのまま使用	12 mL/1本
(G) 抽出用緩衝液	そのまま使用	100 mL/1本
(H) 反応停止液(1 M H ₂ SO ₄) ※取扱注意	そのまま使用	12 mL/1本
(I) 濃縮洗浄液(10×)	希釈後使用	100 mL/1本
プレートシール		3枚
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℃~25℃)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)Der f II 標準溶液(500 ng/mL)] ; 標準曲線作成用

(B)Der f II 標準溶液(500 ng/mL) (原液) と(C)緩衝液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	緩衝液	濃度(ng/mL)
標準溶液原液 50 µL	450 µL	50
50 ng/mL 溶液 250 µL	250 µL	25
25 ng/mL 溶液 250 µL	250 µL	12.5
12.5 ng/mL 溶液 250 µL	250 µL	6.25
6.25 ng/mL 溶液 250 µL	250 µL	3.13
3.13 ng/mL 溶液 250 µL	250 µL	1.56
1.56 ng/mL 溶液 250 µL	250 µL	0.78
0(Blank)	250 µL	0

[(D)HRP 結合抗 Der f II 抗体]

200 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)濃縮洗浄液(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)抗体固相化 96 ウェルプレート

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)Der f II 標準溶液(500 ng/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)緩衝液、(F)発色液(TMB) 及び(G)抽出用緩衝液

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)HRP 結合抗 Der f II 抗体

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)反応停止液(1 M H₂SO₄)

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)濃縮洗浄液(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

- 収集した試料を、(G)抽出用緩衝液を用い前処理(抽出)を行ってください。

収集した試料に対し、(G)抽出用緩衝液を 20 倍量(W/V)になるように添加し室温で 30 分間攪拌し抽出します。その後、フィルターろ過(0.45 µm)、または遠心分離等で不溶解物を除去し抽出検体とします。抽出検体は(C)緩衝液を用いて標準曲線範囲内に入るように希釈調製し、100 µL/ウェル用いてください。

(G)抽出用緩衝液で抽出した状態のままでの測定はできません。必ず(C)緩衝液を用いて希釈したものを検体としてください(10 倍希釈以上を推奨)。

* 試料の収集には、収集用フィルター等の市販品をご使用ください。(本キット構成には、試料収集用フィルター等は含まれておりません。)

希釈検体調製例	10 倍	100 倍	200 倍	400 倍・・・
抽出検体	50 μ L	*50 μ L	*250 μ L	* 250 μ L
緩衝液(C)	450 μ L	450 μ L	250 μ L	250 μ L

(注) *ひとつ低倍率の希釈検体

- 別売りの精製ダニ抗原 Der f II (AGDF2-010)を用いて測定する場合は精製水で溶解後測定範囲に入るよう(C)緩衝液を用いて希釈してください。

【検体の取扱い】

- 検体の抽出には、添付の(G)抽出用緩衝液の使用を推奨します。
- 検体の希釈は(C)緩衝液を用いて用時調製してください。
- 濁り及び不溶解物のある検体は除去後、測定に使用してください。
- 添付の(G)抽出用緩衝液や記載の抽出方法は、全ての試料に対し完全な抽出を保障するものではありません。
- 添付の(G)抽出用緩衝液以外で調製した検体は、妨害物質の影響を確認してください。

【検体の保存】

- 抽出した検体は出来るだけ速やかに測定に用いてください。また、長期保存する場合は-20℃以下で凍結保存してください。但し、繰り返しの凍結融解は避けてください。

【妨害物質の影響】

- 疑わしい検体は、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。

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たし、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。
- (2) 検体測定ウェルに緩衝液で希釈した検体を100 μ L ずつ分注します。
- (3) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を100 μ L 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、室温(20℃~25℃)で1時間静置(*③)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たし、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HRP結合抗 Der f II 抗体を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(*②)します。
- (8) プレートシールを貼り、室温(20℃~25℃)で1時間静置(*③)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) 各ウェルに発色液を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(*②)します。
- (11) プレートシールを貼り、室温(20℃~25℃)で20分間静置(*③)します。
- (12) 各ウェルに反応停止液を100 μ L ずつ分注し、発色反応を停止します。
- (13) 攪拌(*②)後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(5ページ)をご参照ください。

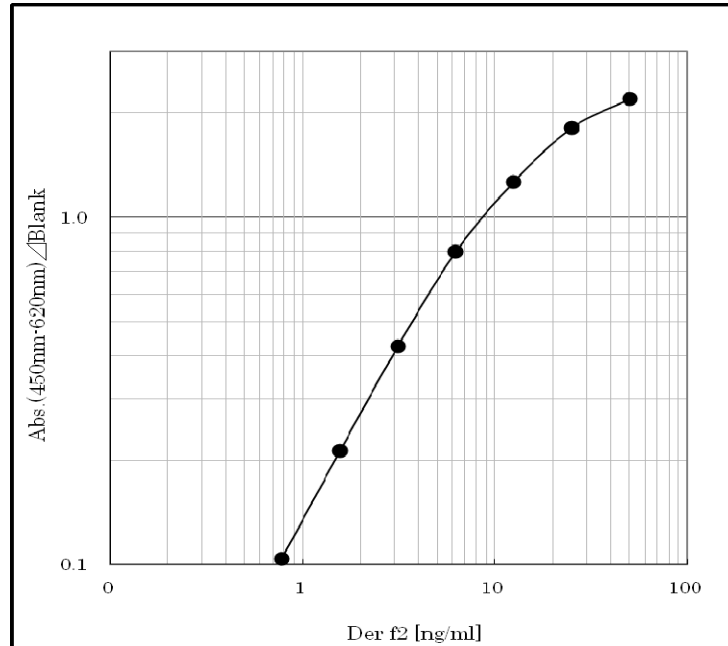
9.計算

- (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(ng/mL)、Y軸を吸光度の標準曲線グラフを作成してください。標準曲線は弊社Webサイト「技術情報」 「ELISAの標準曲線」をご参照ください。
- (2)標準曲線より、検体の吸光度に対応する濃度(ng/mL)を読み取ります。読み取った濃度に検体希釈率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)緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施してください。

* 一番高濃度の標準溶液の吸光度付近の検体は緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定することをお勧め致します。

* 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勧め致します。



*プレートリーダーは SUNRISE RAINBOW(TECAN)を使用。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)。

10.キットの性能

- 測定範囲
0.78 ng/mL~50 ng/mL の範囲で測定できます。
- 特異性
HRP 結合抗体はコナヒョウヒダニの Der f II を特異的に認識します。Der f I との交差反応性はバックグラウンド以下です。
- 精度試験 (アッセイ内変動) (5 重測定、2 検体) 平均 C.V.値は 10 %未満
- 再現性試験 (アッセイ間変動) (2 重測定、3 検体、4 日間) 平均 C.V.値は 10 %未満
- 添加回収試験
2 検体に異なる 3 濃度の Der f II を添加し測定した結果、回収率は 95.1 %から 104 %
- 希釈直線性
2 検体を連続的に希釈用緩衝液で 3 段階希釈し測定した結果、直線回帰の R² は 0.9959 と 0.9996

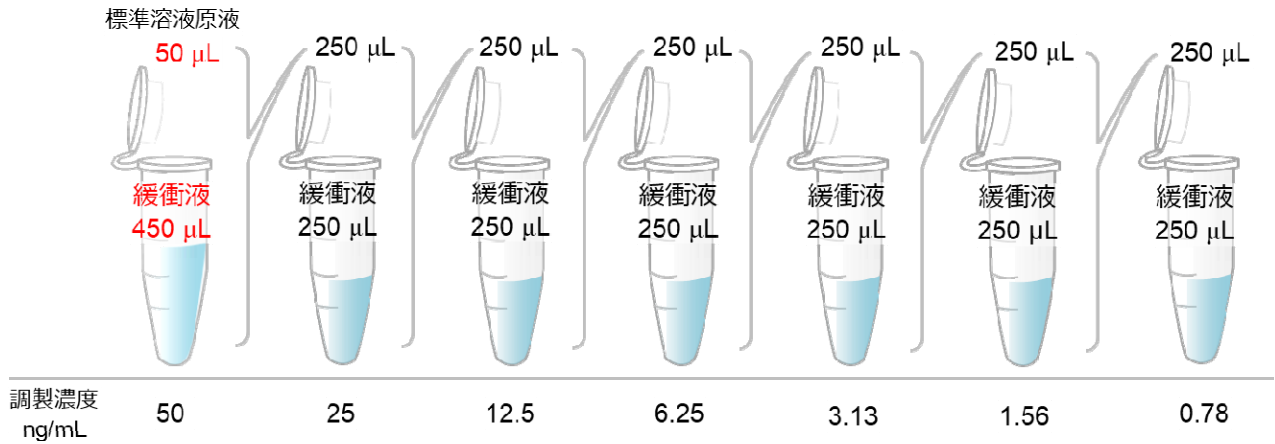
11.トラブルシューティングと Q&A

- 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)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(0.78 ng/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。
(ペルオキシダーゼ標識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に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何も入っていませんでしたが大丈夫ですか?
A-2: 大丈夫です。このキットは乾燥プレートタイプとなっております。
- 更に詳しいトラブルシューティングや Q&A は弊社ホームページをご覧ください。

【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。
 操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント (動画)] 並びに「Q&A」をご参照ください。

- 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(C)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 (乾燥プレート)		
<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"/> 希釈検体または Der f II 標準溶液	100 µL	* ④
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20 °C~25 °C)、1 時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> HRP 結合抗 Der f II 抗体の希釈。室温化された(C)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"/> HRP 結合抗 Der f II 抗体	100 µL	* ④
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20 °C~25 °C)、1 時間反応、静置		* ② * ③
<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"/> 発色液(TMB) TMB が室温化されていることを確認 分注後、濃度により青色に変色	100 µL	* ④
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20 °C~25 °C)、20 分間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> 反応停止液(1 M H ₂ SO ₄) 強酸性につき取扱注意 分注後、濃度により黄褐色に変色	100 µL	* ④
<input type="checkbox"/> ↓攪拌 (直ちに攪拌)		* ②
<input type="checkbox"/> 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(0.78 ng/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、ペロオキシダーゼ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。「洗浄操作」の動画をご参照ください。

(* ②)攪拌の目安は 600 rpm~1200 rpm-10 秒間、3 回。「攪拌操作」の動画をご参照ください。

(* ③)攪拌終了後プレートシールを貼って静置してください。「反応条件」の動画をご参照ください。

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。

(* ④)ピペッティングに関する注意事項は「ピペッティング」の動画をご参照ください。

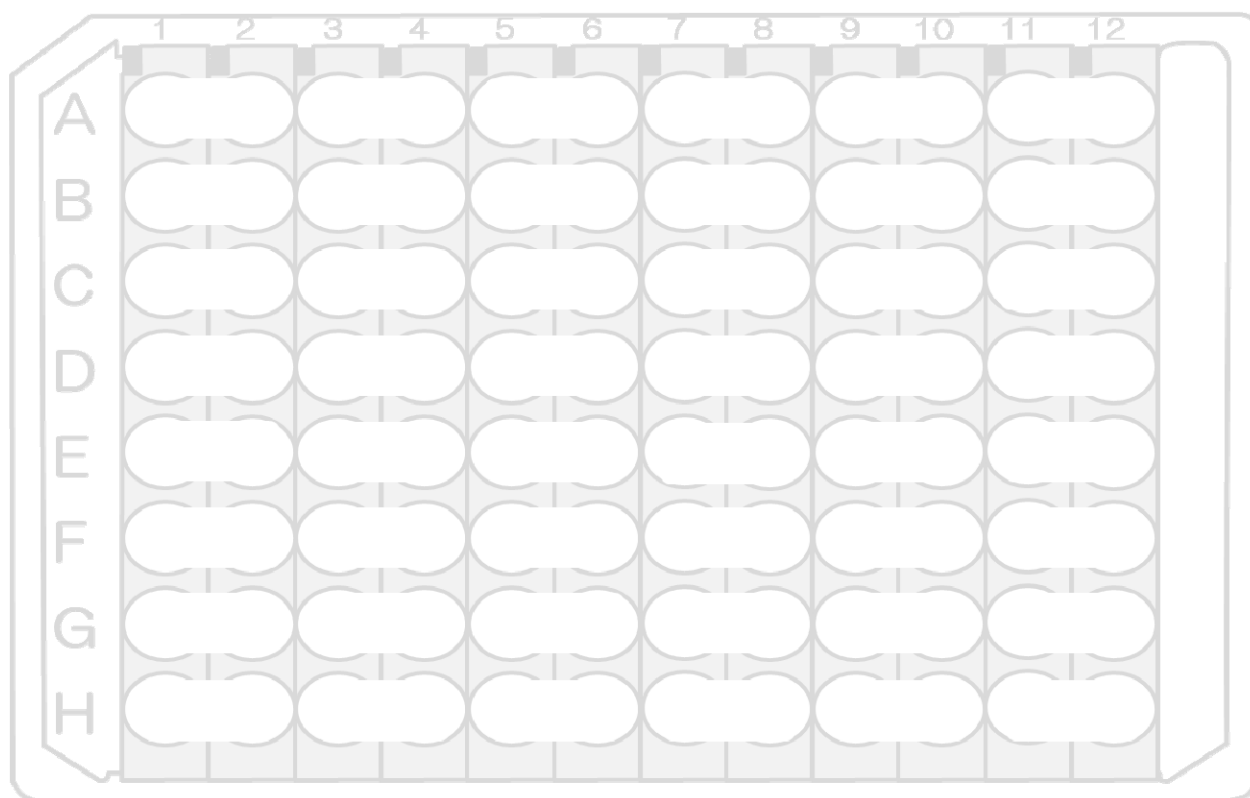
レビス® Der f II ELISA Kit (AKDF2-020)

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	50 ng/mL	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	25 ng/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	12.5 ng/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	6.25 ng/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	3.13 ng/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	1.56 ng/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	0.78 ng/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

- 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ください。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。
- 標準溶液、試料はアレルギー性があるものとして充分注意して取り扱ってください。
- 使用済みの検体、使用した消耗品等は1%ホルマリン、2%グルター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。
- 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。
- 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。
- 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、詳細を弊社Webサイトの動画「反応条件」でご確認ください。
- 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ほぼ無色です。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。



【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® Der f II ELISA Kit

【シバヤギコード】 AKDF2-020

【和光コード】 634-14291

【英語表記】 LBIS Der f II ELISA Kit

(AKDF2-020, FUJIFILM Wako Shibayagi, Gunma, Japan)

【お問い合わせ先】

製造

富士フイルムワコーシバヤギ株式会社

〒377-0007 群馬県渋川市石原 1062-1 TEL.0279-25-0279 FAX.0279-23-0313

<E-mail>wksb-info@fujifilm.com

<URL><http://www.shibayagi.co.jp>

販売

富士フイルム 和光純薬株式会社