

Human/Rat β Amyloid (40) ELISA Kit Wako**TABLE OF CONTENTS**

1. Introduction	2
2. Kit Contents	2
3. Required Apparatuses	2
4. Principle	2
5. Assay Method	
5-1. Preparation of reagents to be used	2
5-2. Test sample preparation	3
5-3. Assay procedure	3
5-4. Standard curve	4
6. Test performance	
6-1. Sensitivity	4
6-2. Reproducibility	5
6-3. Specificity	5
6-4. Linearity of dilution	5
6-5. Spike recovery	5
7. Troubleshooting	5
8. Method of sample preparation	6
9. References	8
10. Assay Summary	9

1. Introduction

Alzheimer's Disease (AD) is characterized by the presence of extracellular senile plaques (SPs) and intracellular neurofibrillary tangles (NFT) in the brain. The major protein component of SPs is β Amyloid peptide (A β). The peptide is 40 or 42(43) amino acid peptide cleaved from the Amyloid Precursor Protein (APP) by β -Secretase and γ -Secretase. A β 42 is more prone to aggregate than A β 40. Therefore the initial A β deposition begins with A β 42(43) but not with A β 40. A β 42(43)-positive and A β 40-negative plaques may represent early-stage diffuse type SPs, and A β 40-positive plaque appears in the advanced stage, especially more often in cored portion of the mature plaque.¹⁾

Additionally, in patients with AD, reduced levels of A β 42 in cerebrospinal fluid(CSF) and the ratio of A β 42 to total A β (A β 42 and A β 40) in CSF have been described as a diagnostic marker of AD.

In this kit, we use the monoclonal antibody BNT77, which epitope is A β (11-28) and the monoclonal antibody BA27, which specifically detects the C-terminal portion of A β 40. Therefore this kit is designed to be used for the quantitative determination not only Human or Rat A β (1-40) but also A β 40 with a truncated or modified N-terminus in samples such as tissue culture medium, tissue homogenate, CSF and plasma.

2. Kit Contents

① Antibody (BNT77)-coated Microtiter Plate (Anti Human A β (11-28) MoAb (Clone No.BNT77))	1 plate
② Standard Solution (Human β Amyloid (1-40), 100pmol/L)	2 mL \times 2 vials
③ Standard Diluent	30 mL \times 1 vial
④ Wash Solution (20 \times)	50 mL \times 1 vial
⑤ HRP-conjugated Antibody (BA27) Solution (Anti Human A β (1-40) MoAb (Clone No.BA27) Fab'-HRP)	12 mL \times 1 vial
⑥ TMB Solution	12 mL \times 1 vial
⑦ Stop Solution	12 mL \times 1 vial
⑧ Plate Seal	3 sheets

Storage : Keep at 2–10°C.

Expiration date : Printed on the package

Package : 96 tests

3. Required Apparatuses

1. A Microplate Reader
2. A Micropipette
3. A Microplate Washer

4. Principle

This kit is constructed as a sandwich ELISA format with two kinds of antibodies. The monoclonal antibody BNT77, which epitope is A β (11-28), is coated on 96 well surfaces of a separable micro plate and acts as a capture antibody for A β (x-40). Captured A β (x-40) is recognized by another antibody, BA27 (Fab' fragment), which specifically detects the C-terminal portion of A β 40, labeled with HRP. After addition of TMB solution, positive samples will develop a blue color. The reaction is terminated by the addition of stop solution, which produces a yellow color. The absorbance is then measured at 450 nm.

5. Assay Method

5-1. Preparation of reagents to be used

Number	Reagent Name	Preparation
①	Antibody (BNT77)-coated Microplate	Ready to use
②	Standard Solution (Human β Amyloid (1-40), 100pmol/L)	Dilute the Standard with Standard Diluent. (e.g. 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1 (pmol/L))

③	Standard Diluent	Ready to use
④	Wash Solution (20×)	Working solution is prepared by dilution of 50 mL of the Wash Solution(20×) with distilled deionized water to 1000 mL.
⑤	HRP-conjugated Antibody (BA27)	Ready to use
⑥	TMB Solution	Ready to use
⑦	Stop Solution	Ready to use
⑧	Plate Seal	Ready to use

5-2. Test sample preparation

Test samples, containing A β at more than 100 pmol/L, should be diluted with the Standard Diluent. If the concentration of A β in samples cannot be estimated in advance, a pre-assay with several different dilutions is recommended to determine the proper dilution of samples. Additionally, in the case of plasma samples, they should be diluted 2-4 times with the Standard Diluent to disrupt interaction of A β with masking proteins. In the case of culture medium with FCS, A β like substances in FCS may be measured. Therefore negative control should be taken.

5-3. Assay procedure

- ① Take the aluminium package, containing the antibody-coated microplate, from a refrigerator which is maintained at 2-10°C, and leave it until it reaches room temperature. Separate the required wells from the microplate, and seal the remaining wells in the aluminium package and store them in the refrigerator.
- ② Dispense 100 μ L standard diluent into zero blank well (*See Note 1*).
- ③ In the assays of standard solution and test samples (e.g. tissue culture medium, tissue homogenate, cerebrospinal fluid (CSF) and plasma) dispense 100 μ L of solution into each well (*See Note 2,3*).
- ④ Seal the wells with the plate seal, and leave refrigerated overnight.
- ⑤ After removal of the plate seal from the plate, discard the solutions from the wells, and then wash 5 times with wash solution (*See Note 4,5*).
- ⑥ Dispense 100 μ L HRP-conjugated antibody solution into the wells, seal them with the plate seal, and let the microplate stand in the refrigerator or cold room for 1 hour.
- ⑦ After removal of the plate seal, remove the antibody solution from the wells and wash them 5 times with wash solution.
- ⑧ Add 100 μ L TMB solution to the wells within a short interval, thus starting the HRP reaction at room temperature in the dark (*See Note 6*).
- ⑨ Add 100 μ L stop solution to the wells, 30 minutes after addition of the TMB solution, in order to terminate the reaction (*See Note 7*).
- ⑩ Read the absorbance of each well at 450 nm having blank the plate reader against a TMB solution blank. Read the plate within 30 minutes after adding the stop solution.
- ⑪ Read the Human or Rat β Amyloid (x-40) concentrations for unknown samples and controls from the standard curve.

Notes

1. All reagents except for the wash solution should be used only after returning to room temperature.
2. At least more than duplicate assays are recommended for each sample.
3. The standard curve should be made at each study.
4. Try to complete washing within 2 or 3 minutes in total. The temperature of the wash solution should be equal to or lower than room temperature. And differences in soaking time (i.e., time taken for pouring the wash solution into wells) between the wells in the washing process may cause inconsistent results. Try to perform the washing process in such a way as to ensure that the soaking time for each well is as similar as possible (e.g., start washing from the right row of the plate for the first wash and from the left row in the second wash).
5. If using an aspirator for removal of the solutions from microplate wells, pay attention to not touch and damage the surfaces of the wells.

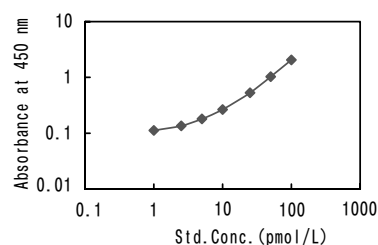
6. The vessels and apparatus should be well cleaned, prior to use. Contamination results in color development of the solutions.
7. When handling many samples, systematic dispensing of the solutions should be required in order to attain a constant reaction time in each sample assay.
8. The kit is constructed with well-adjusted combinations of the antibody preparations and biological reagent solutions for each lot. Combining the biological reagent solutions and the plate from different lots may cause unexpected results.
9. The quantitation may indicate abnormally high measurements caused by the cross reaction of mouse IgG1 antibodies to unidentified components in human plasma. In that case, the plasma sample should be absorbed with a column which fixes refined mouse IgG. Then you can minimize the phenomenon. (see Reference 8,9)
10. This kit is for research use only, and not for use in diagnostic procedures.

Assay procedure table

	Test Sample	Standard	Test Sample Blank
Reagents	Test Sample 100 μ L	Diluted standard 100 μ L	Standard Diluent 100 μ L
Incubate for overnight in the refrigerator with plate seal			
Washing 5 times			
HRP-conjugated Antibody	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubate for 1 hour in the refrigerator with plate seal			
Washing 5 times			
TMB Solution	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubate for 30 minutes at room temperature in the dark with plate seal			
Stop Solution	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Read the absorbance of each well at 450 nm with a microplate reader.			

5-4. Standard curve

Standard (pmol/L)	Mean (OD at 450 nm)
0.0	0.095
1.0	0.112
2.5	0.136
5.0	0.181
10.0	0.265
25.0	0.529
50.0	1.034
100.0	2.060



6. Test performance

6-1. Sensitivity

- 1) Dynamic range.....1.0-100 (pmol/L)
- 2) Sensitivity.....0.25 (pmol/L)

※The sensitivity was determined by adding two standard deviations to the mean absorbance obtained when the zero standard was assayed 24 times.

6-2. Reproducibility

1) Intra-assay (n=24)

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (pmol/L)	82.11	37.47	17.10
SD	1.30	0.74	0.43
CV(%)	1.59	1.97	2.53

SD = Standard Deviation, CV = Coefficient of Variation

2) Inter-assay (n=6)

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (pmol/L)	79.80	34.25	15.98
SD	4.14	2.22	1.27
CV (%)	5.19	6.49	7.92

6-3. Specificity (n=4)

	Cross-reaction (%)
Human β Amyloid (1-40)	100.0
Human β Amyloid (1-42)	≤ 0.1
Human β Amyloid (1-43)	≤ 0.1
Rat (mouse) β Amyloid (1-40)	137.0
Rat (mouse) β Amyloid (1-42)	0.2

6-4. Linearity of dilution (n=4)

	Plasma (EDTA2K)			Culture medium (DMEM, 10%FCS)		
	Measured (pmol/L)	Expected (pmol/L)	%	Measured (pmol/L)	Expected (pmol/L)	%
1/2	85.32	80.54	105.9	74.27	57.67	128.8
1/4	42.49	41.21	103.1	36.36	29.10	124.9
1/8	22.24	20.22	110.0	19.07	14.89	128.0
1/16	11.24	10.11	111.2	9.07	7.25	125.1

6-5. Spike recovery (n=3)

Spiked (pmol/L)	Plasma ($\times 4$) (EDTA2K)			Culture medium ($\times 4$) (DMEM, 10%FCS)			Cerebrospinal fluid ($\times 50$) (CSF)		
	Measured (pmol/L)	Expected (pmol/L)	%	Measured (pmol/L)	Expected (pmol/L)	%	Measured (pmol/L)	Expected (pmol/L)	%
25.00	40.23	38.98	103.2	33.01	28.09	117.5	53.01	51.23	103.5
12.50	26.74	26.48	101.0	18.03	15.59	115.6	40.10	38.73	103.6
6.25	20.08	20.23	99.3	10.57	9.34	113.2	33.28	32.48	102.5

7. Troubleshooting

Q1 : The OD in the standard solution is too low to draw a calibration curve. Why does this happen ?

A1 : It is possible that more time than necessary was taken for washing. Try to complete washing within 2 or 3 minutes in total. The temperature of the wash solution should be equal to or lower than room temperature. If you do not use a microplate washer, discard the solution in the wells first by decanting (be careful not to cause inter-well contamination at this time), fill the wells with the wash solution using a bottle washer, etc. and discard the solution again. Repeat the procedure 5 times. The total washing time in this case should also be no more than 2 to 3 minutes.

Q2 : The absorbance of 0 pmol/L is higher than standards with the low concentration range, so the calibration curve cannot be drawn. Why does this happen ?

A2 : There is a possibility of insufficient washing. Samples, standard solutions, or HRP conjugated antibody solutions can attach to the upper part of the sides of the wells, and may not be removed by the washing operation. Be careful to avoid touching the sides of the wells when adding the solution. During the movement of the plate be careful not to drop or tilt it. During the reaction time, the plate should remain still.

In case of manual washing operations, make sure at least 300 μ L of the wash solution is dispensed into each well. When dispensing the first two times, do not overflow the wash solution from the wells in order to avoid well-to-well contamination. The third time, thoroughly wash by overflowing of the wash solution. When using a plate washer, we recommend washing with the maximum amount that can be set.

Q3 : Does A β peptide in the standard solution aggregate ?

A3 : The standard solution is designed not to aggregate. It is stable when stored in a refrigerator.

Q4 : The measurement values are not consistent. What are the possible causes of this ?

A4 : Differences in soaking time (i.e., time taken for pouring the wash solution into wells) between the wells in the washing process may cause inconsistent results. Manual washing using a pipet is particularly prone to variations in timing. Try to perform the washing process in such a way as to ensure that the soaking time for each well is as similar as possible (e.g., start washing from the right row of the plate for the first wash and from the left row in the second wash).

Q5 : Storage method

A5 : Human specimens such as cerebral tissues and cerebrospinal fluid can be stored in a freezer, although measurement values for some specimens may decrease even after such storage. If the concentration of A β is low, then freeze-thawing of the specimen should be avoided. For a culture supernatant, mix it with 0.2% cow serum albumin and 0.075% CHAPS (final concentrations for both) to minimize losses by adhesion to the vial wall, etc. before storage in a freezer.

Q6 : Is it possible to measure a serum sample ?

A6 : Yes. However, it is not recommended because the value in serum is often lower than that in plasma that is collected simultaneously. The serum sample also tends to deteriorate to a greater degree on refrigeration.

Q7 : Which anticoagulant can I use for plasma samples ?

A7 : We recommend EDTA2K. EDTA2Na and heparin have also been used.

Q8 : Can I use concentrations for dilution of the standard solution other than those illustrated ?

A8 : No problem at all. You can prepare a series of dilutions suitable for your experimental system.

Q9 : Is a calibration curve of a type other than log-log acceptable ?

A9 : No problem at all.

Q10 : While it is recommended that the assays be performed at least in duplicate, is it also necessary to perform duplicate assays for standard samples ?

A10 : We recommend that the assays are at least duplicated for standard samples, but you may decide the number of standard samples, such as n = 1, to suit to each experimental system.

Q11 : How should we store the reagent after opening ?

A11 : The reagent is stable in a refrigerator provided that the microplates are returned to the aluminum packs properly with a desiccating agent.

8. Method of sample preparation

Following methods are examples of how to prepare the sample.

◆ Brain tissue sample

1. Aggregated A β (brain tissue in patients with Alzheimer's disease) (see Reference 6)

① Mince about 1 g of brain tissue, add 5 volumes of TBS* and homogenize (10 strokes) using a Teflon homogenizer. Centrifuge this homogenate at 500,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C for 20 minutes.

* (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, protease inhibitors [0.1 mmol/L diisopropyl fluorophosphate, 0.5 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 g/mL Na-P-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, 1 g/mL antipain, 0.1 g/mL leupeptin])

- ② Suspend the precipitate in 5 volumes of TBS/protease inhibitors (containing 1.0 mol/L sucrose) and centrifuge at $500,000 \times g$, 4°C for 20 minutes.
- ③ Add 3 volumes of 1% Triton X-100/TBS/protease inhibitors to the precipitate and homogenize (10 strokes). Incubate this homogenate at 37°C for 15 minutes and centrifuge at $500,000 \times g$ for 20 minutes.
- ④ Add 3 volumes of 2% sodium dodecyl sulfate (SDS)/TBS/protease inhibitors to the precipitate and homogenize. Incubate the homogenate at 37°C for 15 minutes and centrifuge at $500,000 \times g$, 25°C .
- ⑤ Add 1 mL of 70% formic acid to the precipitate, ultrasonicate and centrifuge at $500,000 \times g$, 4°C .
- ⑥ Collect the supernatant and dry by Speed Vac. Add $100 \mu\text{L}$ of DMSO and perform ultrasonic disintegration for a short time for suspension. Store this DMSO-dissolved, formic acid-extracted $\text{A}\beta$ at -80°C until use.
- ⑦ For measurement, dissolve the sample in the Standard Diluent in the kit as necessary and follow the instructions in the package insert. The recommended dilution is 1,000 times for $\text{A}\beta$ 40 and 100 times for $\text{A}\beta$ 42.

2. Soluble $\text{A}\beta$ (normal brain tissue)

We recommend the following methods of 2-1 and 2-2 in the case of soluble $\text{A}\beta$ in the normal brain tissues. Because we can detect the difference between soluble $\text{A}\beta$ and aggregated $\text{A}\beta$ clearly compared with the methods of 2-3.

2-1. The method using RIPA buffer

- ① Homogenize (25 strokes) about 100 mg the brain tissue in 1 mL of RIPA buffer (250 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris HCl, pH=8.0) with protease inhibitors. Centrifuge this homogenate at $100,000 \times g$, 4°C , for 20 min.
- ② Dilute the supernatant with the Standard Diluent in the kit, if necessary, and measure as directed in the package insert.

2-2 The method using Tris buffer

- ① Homogenize (25 strokes) about 100 mg the brain tissue in 1 mL of Tris buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, pH=7.6) with protease inhibitors. Centrifuge this homogenate at $100,000 \times g$, 4°C , for 20 min.
- ② Dilute the supernatant with the Standard Diluent in the kit, if necessary, and measure as directed in the package insert.

2-3. The method using 70% formic acid (see Reference 7)

- ① Homogenize (6 strokes) about 150 mg of tissue in 1 mL of 70% formic acid. Centrifuge this homogenate at $100,000 \times g$ for 1 hour.
- ② Dilute the supernatant 20-fold with 1 mol/L Tris Base to neutralize.
- ③ After neutralization, dilute the sample with the Standard Diluent in the kit, if necessary, and measure as directed in the package insert.

◆ Culture supernatant sample

- ① To measure, dilute the sample with the Standard Diluent in the kit as necessary and follow the instructions in the package insert. The recommended dilution is 5-fold for $\text{A}\beta$ 40 and no dilution for $\text{A}\beta$ 42.

◆ Cerebrospinal fluid sample

- ① To measure, dilute the sample with the Standard Diluent in the kit as necessary and follow the instructions in the package insert. The recommended dilution is 50-fold.

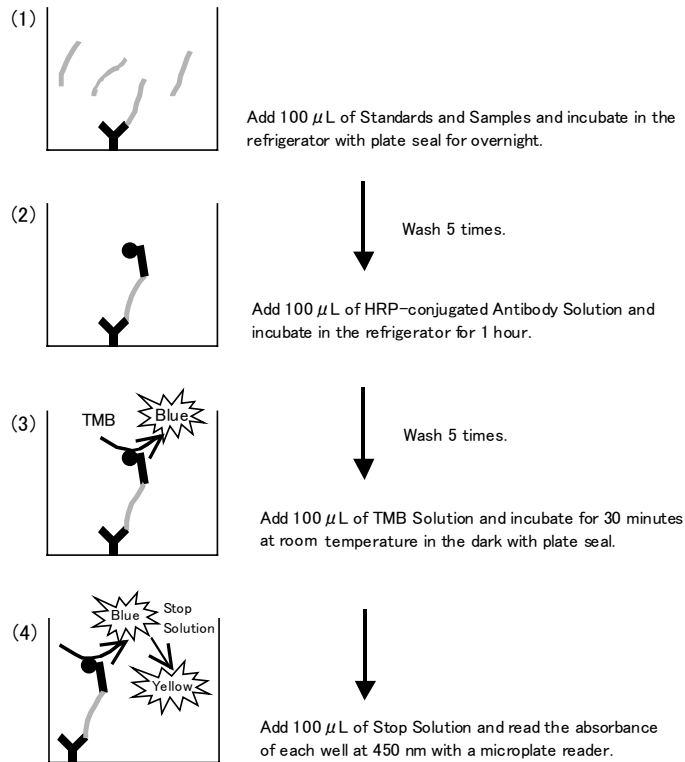
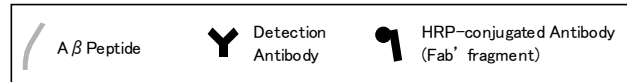
◆ Plasma sample

- ① Centrifuge the blood collected in a vacuum blood collection tube with EDTA2K at $5,000 \times g$, 4°C for 15 minutes to separate the plasma, which is then stored at -80°C until use.
- ② To measure, dilute the plasma sample 4-fold with the Standard Diluent in the kit to avoid the effect of interfering substances in the plasma and follow the instructions in the package insert.

9. References :

- 1) Suzuki, N., Cheung, TT., Cai, XD., Odaka, A., Otvos, L. Jr., Eckman, C., Golde, TE. and Younkin, SG. : *Science*, **264**, 1336 (1994)
- 2) Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, N. and Ihara, Y. : *Neuron*, **13**, 45 (1994)
- 3) Asami-Odaka, A., Ishibashi, Y., Kikuchi, T., Kitada, C. and Suzuki, N. : *Biochemistry*, **34**, 10272 (1995)
- 4) Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Birb, TD., Hardv, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levv-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkai, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S. : *Nature Med.* **2**, 864 (1996)
- 5) Kosaka, T., Imagawa, M., Seki, K., Arai, H., Sasaki, H., Tsuji, S., Asami-Odaka, A., Fukushima, T., Imai, K. and Iwatsubo, T. : *Neurology* **48**, 741 (1997)
- 6) Hosoda, R., Saido, TC., Otvos, L., Jr., Arai, T., Mann, DMA., Lee, VM-Y, Trojanowski, JQ. and Iwatsubo, T. : *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **57**, 1089 (1998)
- 7) Borchelt, D., R., *et al.* : *Neuron*, **17**, 1005 (1996)
- 8) Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, TD., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S. : *Nat Med.*, **2**, 864 (1996)
- 9) Kosaka, T., Imagawa, M., Seki, K., Arai, H., Sasaki, H., Tsuji, S., Asami-Odaka, A., Fukushima, T., Imai, K. and Iwatsubo, T. : *Neurology*, **48**, 741 (1997)

10. Assay Summary



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 : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

ヒト/ラットβアミロイド(40) ELISA キットワコー

目 次

1. はじめに	11
2. キット内容	11
3. キット以外に必要な試薬・器材	11
4. 測定原理	11
5. 操作法	
5-1. 試薬の調製	11
5-2. 検体の調製	12
5-3. 測定操作法	12
5-4. 標準曲線例	13
6. 性能	
6-1. 感 度	13
6-2. 再現性	13
6-3. 特異性	14
6-4. 希釈試験	14
6-5. 添加回収試験	14
7. トラブルシューティング	14
8. 検体前処理方法	15
9. 参考文献	17
10. 測定概要	18

1. はじめに

アルツハイマー病は、神経細胞内に出現する神経原線維変化と細胞外に出現する老人斑などの病変が特徴です。この老人斑の成分は、主にアミノ酸残基数が40または42(43)の β アミロイドペプチド(A β)です。これらのA β は、アミロイド前駆体蛋白質(APP)から β -セクレターゼと γ -セクレターゼによって切り出されます。切り出されたA β 42は、A β 40と比較して凝集しやすい性質があるため、初期の老人斑ではA β 40ではなくA β 42が蓄積し、アルツハイマー病の進行過程でA β 42の比率が増加すると報告されています。¹⁾

また、アルツハイマー病の生化学的診断マーカーとして、脳脊髄液中のA β 42量の低下が報告されています。また、アルツハイマー病の初期変化として、血漿A β の比率の変化を示唆する報告もあります。

本キットでは、ヒトおよびラットのA β (11-28)を抗原として作成したモノクローナル抗体BNT77とA β 40のC末端に特異的なモノクローナル抗体BA27により、検体(細胞培養上清、組織抽出液、脳脊髄液、血漿など)中のヒトやラットのA β (1-40)およびN末端が切断もしくは修飾されたA β 40(A β (11-40))を高感度に定量できます。

2. キット内容

① 抗体(BNT77)固相化マイクロプレート (抗ヒトA β (11-28)MoAb(Clone No.BNT77)固相)	1枚
② スタンダード溶液(ヒト β アミロイド(1-40)、100pmol/L)	2 mL × 2本
③ スタンダード希釈液	30 mL × 1本
④ 洗浄液(20×)	50 mL × 1本
⑤ HRP標識抗体(BA27)溶液 (抗ヒトA β (1-40)MoAb(Clone No.BA27)Fab'-HRP)	12 mL × 1本
⑥ TMB溶液	12 mL × 1本
⑦ 停止液	12 mL × 1本
⑧ プレートシール	3枚

保存条件 2~10℃保存

使用期限 ラベルに記載

包装 96回用

3. キット以外に必要な試薬・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

4. 測定原理

本キットは、ヒトおよびラットのA β (11-28)を抗原として作成したモノクローナル抗体BNT77とA β 40のC末端に特異的なモノクローナル抗体BA27(Fab'フラグメント)を用いたサンドイッチ型の固相ELISA法に基づいています。マイクロプレートには、BNT77抗体が固相化されており、検体および標準液中のA β を捕捉します。さらにHRP標識されたBA27(Fab'フラグメント)抗体を反応させると固相化抗体-抗原-標識抗体のサンドイッチ複合体が形成されます。抗体により捕捉されたA β (x-40)は、HRPにより触媒される発色反応により定量されます。

5. 操作法

5-1. 試薬の調製

番号	試薬名	調製方法
①	抗体(BNT77)固相化マイクロプレート	そのまま使用します
②	スタンダード溶液 (ヒト β アミロイド(1-40)、100pmol/L)	スタンダード希釈液で希釈し、希釈系列を作製します。 (例: 100、50、25、10、5、2.5、1(pmol/L))
③	スタンダード希釈液	そのまま使用します
④	洗浄液(20×)	脱イオン水で20倍に希釈します
⑤	HRP標識抗体(BA27)溶液	そのまま使用します
⑥	TMB溶液	そのまま使用します
⑦	停止液	そのまま使用します
⑧	プレートシール	そのまま使用します

5-2. 検体の調製

検体中のA β 濃度が100 pmol/L以上の場合には、スタンダード希釈液で希釈して下さい。もし、検体中のA β 濃度が予測できない場合には、希釈列を作成してプレアッセイし、検体の希釈倍率を決定することをお勧めします。また、検体が血漿の場合には、血漿中の妨害物質の影響を防ぐため、2~4倍希釈することをお勧めします。検体がFCS等を含む培養上清の場合には、FCS中のA β 様物質を検出することがありますので、陰性コントロールを測定することをお勧めします(検体の前処理は、検体調製方法を参照下さい)。

5-3. 測定操作法

1. マイクロプレートは、アルミシートから取り出す前に室温に戻して下さい。使用するウェルだけ取り出し、使用しないウェルは直ちにアルミシート内にシールし、冷蔵保存して下さい。
2. 検体ブランクのウェルにスタンダード希釈液を100 μ L加えます(注意 1)。
3. ウェルにスタンダードおよび検体(培養上清、組織抽出液、髄液、血漿など)を100 μ Lずつ加えます(注意 2,3)。
4. プレートシールして、冷蔵(4 $^{\circ}$ C)で一晩反応させます。
5. プレートシールを取り外し、ウェル内の液をアスピレーターで吸引除去もしくはデカントし溶液を捨てます。各ウェルに洗浄液を少なくとも300 μ Lずつ分注し、吸引除去します。この洗浄操作をさらに4回繰り返します(注意 4,5)。
6. 各ウェルに標識抗体を100 μ Lずつ加え、冷蔵(4 $^{\circ}$ C)で1時間反応させます。
7. 上記5と同様にして洗浄操作を5回行ないます(注意 4,5)。
8. 各ウェルにTMB溶液を100 μ Lずつ加え、室温暗所で30分間反応させます(注意 6)。
9. 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(注意 7)。
10. 30分以内に450 nmにおける検体、標準、検体ブランクの吸光度を測定します。
11. 標準曲線よりヒトまたはラットの β アミロイド(x-40)の濃度を算出します。

<注 意>

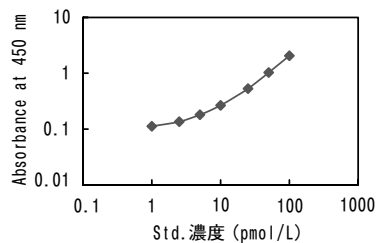
1. 洗浄液以外の試薬は室温に戻してから使用して下さい。
2. 測定は、全て2重測定(n=2)以上で行って下さい。
3. 標準曲線は、測定毎に作成して下さい。
4. 洗浄液の温度は室温以下とし、洗浄時間はトータルで2~3分としてください。また、各ウェルのsoaking時間(各ウェルに洗浄液を加えている時間)の差が測定値のバラツキとなる恐れがあります。出来るだけsoaking時間が一定となるように洗浄操作を行って下さい。
5. 反応液をアスピレーターで吸引除去する場合には、ウェルに傷がつかないように注意して下さい。
6. 発色液を調製する器具は、良く洗浄したものを使用してください。器具の汚れで発色することがあります。
7. 検体数が多い場合は、各検体の発色反応時間が同じになるように注意して下さい。
8. キットはロット毎に最適の組み合わせになっていますので、別ロットの試薬を組み合わせたり、混ぜ合わせたりすると誤差の原因となります。
9. ヒト血漿中にはマウスIgG1と非特異的に反応する物質が存在し、異常高値を示す場合があります。そのような場合には、予め精製マウスIgGを固定したカラムで血漿を前吸収し、素通り画分をELISAに供することにより、交差反応を防ぐことができます。具体的方法は参考文献^{8,9}をご参照ください。
10. 本キットは体外診断用ではありません。

<測定操作一覧>

	検体	スタンダード	検体ブランク
試料	検体 100 μ L	Std. 希釈系列 100 μ L	Std. 希釈液 100 μ L
プレートシールして、冷蔵(4℃)・一晩反応			
洗浄5回			
HRP標識抗体(BA27)溶液	100 μ L	100 μ L	100 μ L
プレートシールして、冷蔵(4℃)・1時間反応			
洗浄5回			
TMB溶液	100 μ L	100 μ L	100 μ L
遮光・室温で30分反応			
停止液	100 μ L	100 μ L	100 μ L
マイクロプレートリーダーで450 nmの吸光度を測定			

5-4. 標準曲線例

Standard (pmol/L)	Mean (OD at 450 nm)
0.0	0.095
1.0	0.112
2.5	0.136
5.0	0.181
10.0	0.265
25.0	0.529
50.0	1.034
100.0	2.060



6. 性能

6-1. 感度

- 標準曲線範囲……1.0-100 (pmol/L)
- 検出感度……0.25 (pmol/L)
※検出感度は、Std. 0OD + 2SD (n = 24)の濃度の代表例です。

6-2. 再現性

- 同時再現性 (n = 24)

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (pmol/L)	82.11	37.47	17.10
SD	1.30	0.74	0.43
CV (%)	1.59	1.97	2.53

SD = Standard Deviation, CV = Coefficient of Variation

- 日差再現性 (n = 6)

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (pmol/L)	79.80	34.25	15.98
SD	4.14	2.22	1.27
CV (%)	5.19	6.49	7.92

6-3. 特異性

測定試料	交差反応率(%)
ヒトβアミロイド(1-40)	100.0
ヒトβアミロイド(1-42)	≦ 0.1
ヒトβアミロイド(1-43)	≦ 0.1
ラット(マウス)βアミロイド(1-40)	137.0
ラット(マウス)βアミロイド(1-42)	0.2

6-4. 希釈試験 (n = 4)

	血漿(EDTA2K)			培地(DMEM, 10%FCS)		
	測定値 (pmol/L)	理論値 (pmol/L)	%	測定値 (pmol/L)	理論値 (pmol/L)	%
1/2	85.32	80.54	105.9	74.27	57.67	128.8
1/4	42.49	41.21	103.1	36.36	29.10	124.9
1/8	22.24	20.22	110.0	19.07	14.89	128.0
1/16	11.24	10.11	111.2	9.07	7.25	125.1

6-5. 添加回収試験 (n = 3)

添加量 (pmol/L)	血漿(×4) (EDTA2K)			培地(×4) (DMEM, 10%FCS)			髄液(×50)		
	測定値 (pmol/L)	理論値 (pmol/L)	%	測定値 (pmol/L)	理論値 (pmol/L)	%	測定値 (pmol/L)	理論値 (pmol/L)	%
25.00	40.23	38.98	103.2	33.01	28.09	117.5	53.01	51.23	103.5
12.50	26.74	26.48	101.0	18.03	15.59	115.6	40.10	38.73	103.6
6.25	20.08	20.23	99.3	10.57	9.34	113.2	33.28	32.48	102.5

7. トラブルシューティング

Q1: スタンダードのOD値が低く検量線が引けません。なぜですか？

A1: 洗浄に時間をかけすぎていないでしょうか？ トータルの洗浄時間が2～3分くらいで終了するようにしてください。また、洗浄液の温度は室温以下で使用して下さい。プレート洗浄機を使用しない場合には、まずウェル内の液をデカント(転倒)により捨て(この時ウェル間でコンタミネーションがおきないように注意します)洗瓶等を用いて洗浄液をウェルに満たし、転倒して捨てる操作を5回繰り返します。この場合も洗浄時間の目安はトータルで2～3分です。

Q2: 0 pmol/Lの吸光度が、低濃度域のstandardの吸光度より高く、検量線が引けません。なぜですか？

A2: 洗浄不足の可能性があります。ウェル側面の上部に溶液が付着すると洗浄操作で除去しきれないことがありますので、スタンダード、検体、標識抗体の添加時にウェルの側面に触れないようにしてください。プレートの移動中は傾けたり転倒したりしないように注意し、反応は静置で行ってください。

洗浄操作は手動の場合、洗浄液は最低300μL分注してください。初めの2回はウェル間のコンタミネーションを避けるためにウェルから洗浄液があふれないように注ぎ、3回目以降は洗浄液をオーバーフローさせて十分洗浄することをお勧めします。

プレートウォッシャーの場合、設定可能な最大量での洗浄をお勧めします。

Q3: スタンダード溶液中でAβペプチドの凝集は起こりませんか？

A3: スタンダードは凝集しないように工夫してありますので冷蔵保存すれば安定です。

Q4：測定値にバラツキが見られます。なぜですか？

A4：洗浄操作におけるウェル間のソーキング時間(各ウェルに洗浄液を入れている時間)の差が測定値のバラツキとなっている恐れがあります。特にピペットによるマニュアル洗浄では操作に時間がかかりバラツキが大きくなる可能性があります。出来るだけウェル間のソーキング時間が一定になるように洗浄操作を行ってください。(例：1回目はプレートの右の列から洗浄し、2回目は左から洗浄するなど)

Q5：検体はどのように保存すればよいですか？

A5：人体試料は(脳組織や脳脊髄液など)凍結保存してください。しかし試料によっては凍結保存していても測定値が低下することがあります。また、A β 濃度が薄い場合は凍結融解をさけてください。培養上清は、0.2%ウシ血清アルブミン、0.075% CHAPS(いずれもfinal)を混ぜて管壁への吸着等のロスを最低限に抑える処理を行ってから凍結保存してください。

Q6：血清サンプルは測定できますか？

A6：測定できます。しかし、同時に採血した血清と血漿を比較した場合、血清の方が低い値になる場合が多くお勧めできません。
また、冷蔵保存による値の低下も血漿にくらべて大きいです。

Q7：血漿の抗凝固剤には何を使用すればよいですか？

A7：EDTA2Kをお勧めします。その他、EDTA2Naやヘパリンでの実績もあります。

Q8：スタンダードの希釈系列濃度は、記載例に従わなくても問題ありませんか？

A8：問題ありません。実験系に応じて希釈系列を作成ください。

Q9：検量線タイプは、log-logでなくても問題ありませんか？

A9：問題ありません。

Q10：検体はn=2以上が推奨されていますが、スタンダードもn=2で行うのですか？

A10：スタンダードもn=2以上を推奨します。しかし、サンプル数が多い場合はn=1にするなど、各実験系にあわせて決定してください。

Q11：開封後の試薬の保存方法について教えてください。

A11：マイクロプレートをきちんとアルミバックに戻して乾燥剤を入れ、冷蔵保存すれば安定です。

8. 検体前処理方法

以下は検体の前処理例です。

◆ 脳組織サンプル

1. 蓄積A β (アルツハイマー脳組織)(参考文献6)

- ① 約1gの脳組織を細片化し、5倍量のTBS*を加え、ホモジナイザーでホモジナイズ(10ストローク)する。このホモジネートを500,000×g、4℃、20分間遠心する。
※(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, protease inhibitors [0.1 mmol/L diisopropylfluorophosphate, 0.5 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/mL N α -P-tosyl-L-lysine chrolomethyl ketone, 1 μ g/mL antipain, 0.1 μ g/mL leupeptin])
- ② 沈殿物を5倍量のTBS/protease inhibitors (containing 1.0 mol/L sucrose)で懸濁し、500,000×g、4℃、20分間遠心する。
- ③ 沈殿物に3倍量の1% Triton X-100/TBS/protease inhibitorsを加えてホモジナイズ(10ストローク)する。このホモジネートを37℃で15分間インキュベートし、500,000×gで20分間遠心する。

- ④ 沈殿物に3倍量の2% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)/TBS/protease inhibitorsを加えてホモジナイズする。このホモジネートを37℃で15分間インキュベートし、500,000×g、25℃で遠心する。
- ⑤ 沈殿物に1 mLの70%ギ酸を加えて超音波破碎し、500,000×g、4℃で遠心する。
- ⑥ 上清を集めてSpeed Vacで乾燥し、100 μLのDMSOを加え、短時間の超音波破碎により懸濁する。このDMSO溶解ギ酸抽出Aβは、使用時まで-80℃で保存する。
- ⑦ 測定は、必要に応じてキット付属のスタンダード希釈液で希釈し、説明書に従って行う。希釈の目安は、Aβ40が1,000倍、Aβ42が100倍。

2. 可溶性Aβ (正常脳組織)

可溶性Aβを測定する場合、下記の2-1および2-2の前処理方法を推奨いたします。2-3の前処理方法と比較して、可溶性Aβと凝集Aβの違いをはっきりと検出することができます。

2-1. RIPA bufferを用いる方法

- ① protease inhibitorを添加したRIPA buffer (250 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris HCl, pH=8.0) 1 mL中でマウスの脳組織約100 mgをホモジナイズ(25ストローク)して、4℃ 100,000×gで20分遠心する。
- ② 必要に応じて上清をキットのスタンダード希釈液で希釈して、説明書に従って測定します。

2-2. Tris bufferを用いる方法

- ① protease inhibitorを添加したTris buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, pH=7.6) 1 mL中でマウスの脳組織約100 mgをホモジナイズ(25ストローク)して、4℃ 100,000×gで20分遠心する。
- ② 必要に応じて上清をキットのスタンダード希釈液で希釈して、説明書に従って測定します。

2-3. 70%ギ酸を用いる方法 (参考文献7)

- ① 約150 mgの組織を1 mLの70%ギ酸中でホモジナイズ(6ストローク)する。このホモジネートを100,000×gで1時間遠心する。
- ② 上清を1 mol/L Tris Baseで20倍希釈して中和する。
- ③ 中和後、必要に応じてキット付属のスタンダード希釈液で希釈し、説明書に従って測定する。

◆ 培養上清サンプル

- ① 測定は、必要に応じてキット付属のスタンダード希釈液で希釈し、説明書に従って測定する。希釈の目安は、Aβ40が5倍、Aβ42が1倍。

◆ 脳脊髄液サンプル

- ① 測定は、必要に応じてキット付属のスタンダード希釈液で希釈し、説明書に従って測定する。希釈の目安は、50倍。

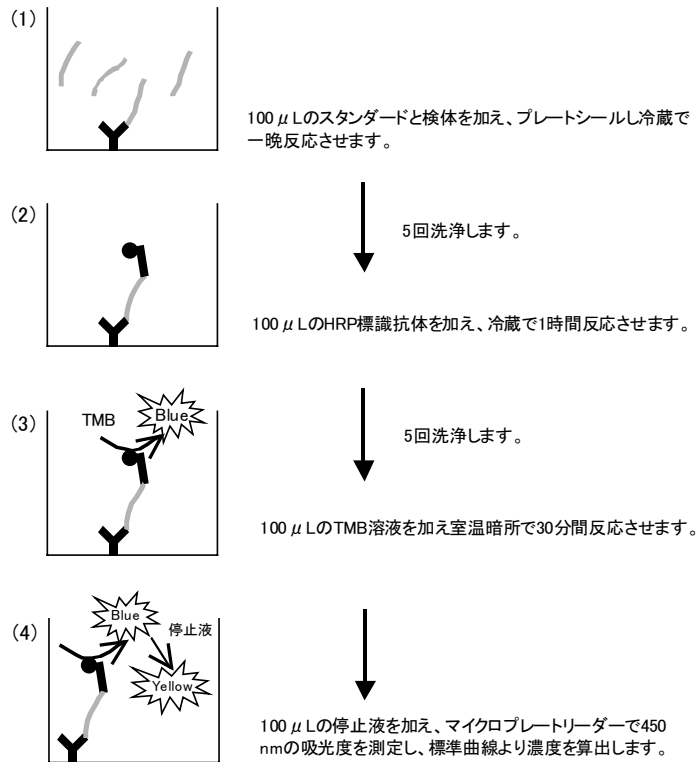
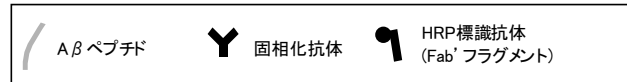
◆ 血漿サンプル (参考文献8,9)

- ① EDTA2K真空採血管を用いて採血した血液を5,000×g、4℃、15分間遠心し血漿を分離する。この血漿は、使用時まで-80℃で保存する。
- ② 測定は、血漿中の妨害物質の影響を避けるためキット付属のスタンダード希釈液で4倍希釈し、説明書に従って行う。

9. 参考文献

- 1) Suzuki, N., Cheung, TT., Cai, XD., Odaka, A., Otvos, L. Jr., Eckman, C., Golde, TE. and Younkin, SG. : *Science*, **264**, 1336 (1994)
- 2) Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, N. and Ihara, Y. : *Neuron*, **13**, 45 (1994)
- 3) Asami-Odaka, A., Ishibashi, Y., Kikuchi, T., Kitada, C. and Suzuki, N. : *Biochemistry*, **34**, 10272 (1995)
- 4) Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Birb, TD., Hardv, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levv-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkai, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S. : *Nature Med.* **2**, 864 (1996)
- 5) Kosaka, T., Imagawa, M., Seki, K., Arai, H., Sasaki, H., Tsuji, S., Asami-Odaka, A., Fukushima, T., Imai, K. and Iwatsubo, T. : *Neurology* **48**, 741 (1997)
- 6) Hosoda, R., Saido, TC., Otvos, L., Jr., Arai, T., Mann, DMA., Lee, VM-Y, Trojanowski, JQ. and Iwatsubo, T. : *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **57**, 1089 (1998)
- 7) Borchelt, D., R., *et al.* : *Neuron*, **17**, 1005 (1996)
- 8) Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, TD., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S. : *Nat Med.*, **2**, 864 (1996)
- 9) Kosaka, T., Imagawa, M., Seki, K., Arai, H., Sasaki, H., Tsuji, S., Asami-Odaka, A., Fukushima, T., Imai, K. and Iwatsubo, T. : *Neurology*, **48**, 741 (1997)

10. 測定概要



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

1901KA2