

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。本キットには管理試料（QC 試料）が2濃度添付されています。各 QC 試料の濃度につきましては、お問い合わせください。

## 『レビス® ELISA スキルチェック』取扱説明書

### ■キット使用目的

ELISA の手技は一見易しそうですが、proficiency；熟練が要求される手技が必要とされます。ELISA 測定精度評価／技能評価を定期的実施することで、ELISA 測定従事者の技能を客観的に評価することができます。また、測定環境の改善点を見出す機会にすることもできます。

精度評価

技術研修

技能評価

- ELISA 測定に関する測定者（室）の継続的な技能評価
- 測定者（室）の問題点の把握また改善のチャンス（不適切な操作手順，使用機器，設備の校正不良）
- 測定室の付加的な信頼性の担保
- 測定室間差の把握
- 測定者への研修の機会

### 1. 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 測定法を熟知された指導者のもとでご使用ください。
- 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。
- 本キットは動物由来の成分を含んでいます。充分注意して取り扱ってください。
- 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薄い青色澄明です。光を避けて保存してください。
- 反応停止液は 96 ウェルプレートに使用するまでは無色です。測定過程で反応停止液をウェルに入れるとすぐに青から黄色に変わります。
- 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、詳細はお問い合わせください。
- 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。
- 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。
- 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。また、使用した消耗品や未使用

## レビス® ELISA スキルチェック

の薬品類は所属先施設の規定並びに各地域の法令にしたがって廃棄してください。

### 2. キット以外に必要な器具 □チェックリスト

- 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 無ければ Excel でも簡易的には計算できます
- 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
- 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 を正確にピペッティングできるもの、及び 100 µL ~ 200 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)
- 精製水 (蒸留水)

### 3. 構成品

構成品	状態	容量
(A) 抗体固相化 96 ウェルプレート	洗浄後使用	96 wells(8×12)/1 枚
(B) 標準溶液(200 ng/mL)	希釈後使用	50 µL/1 本
(C) 緩衝液	そのまま使用	60 mL/1 本
(D) ビオチン結合抗体	希釈後使用	20 µL/1 本
(E) ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	希釈後使用	40 µL/1 本
(F) 発色液(TMB)	そのまま使用	12 mL/1 本
(H) 反応停止液	※取扱注意	12 mL/1 本
(I) 濃縮洗浄液(10×)	希釈後使用	100 mL/1 本
(J) プレートフレーム		2 個
●管理試料 (QC 試料) 1	そのまま使用	200 µL/1 本
●管理試料 (QC 試料) 2	そのまま使用	200 µL/1 本
●プレートシール		3 枚
●取扱説明書		1 部

トレーニングキットは一つのキットを 3 人で使用することもできます。そのため、プレートフレームが 2 個同梱されています。

### 4. キットの保存と使用期限

キットは 2 °C ~ 8 °C 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外箱のラベルに記載された有効期限内安定です。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。

### 5. 試薬の調製

- \* キットの試薬は使用前に必ず室温(20 °C ~ 25 °C)に戻してください (2 時間位が目安です)。複数回に渡って測定する場合は箱ごと室温化せずに、必要な試薬だけ取り出して室温化を行ってください。
- \* 3. 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。

レビス® ELISA スキルチェック

\* 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）。

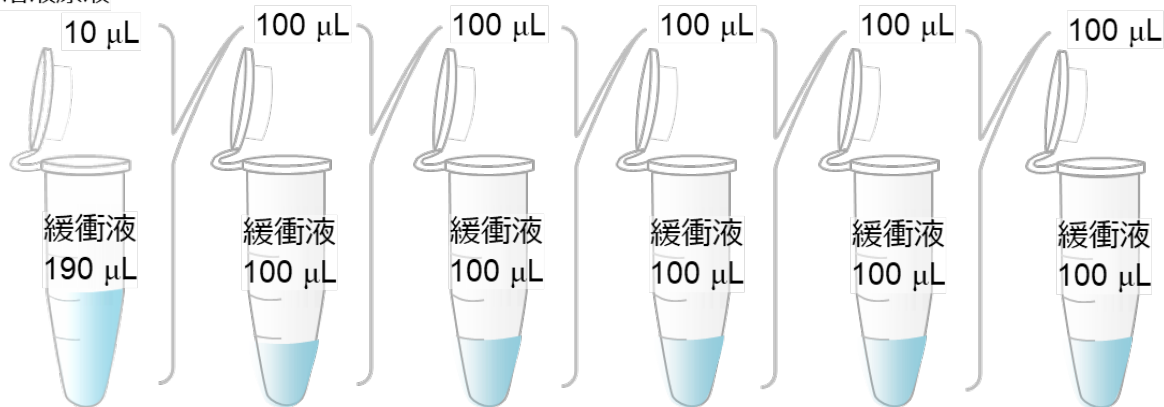
【濃縮された試薬類】

【(B)標準溶液(200 ng/mL)】 ; 標準曲線作成用

(B)標準溶液(200 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 10 μL	190 μL	10
10 ng/mL 溶液 100 μL	100 μL	5.0
5.0 ng/mL 溶液 100 μL	100 μL	2.5
2.5 ng/mL 溶液 100 μL	100 μL	1.25
1.25 ng/mL 溶液 100 μL	100 μL	0.625
0.625 ng/mL 溶液 100 μL	100 μL	0.313
0(Blank)	100 μL	0

標準溶液原液



調製濃度  
ng/mL

10

5.0

2.5

1.25

0.625

0.313

※標準溶液原液を採取する際はキャップの裏側に付着している場合がございますので、軽く遠心してから採取してください。

【(D)ビオチン結合抗体】

20 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 **4000 倍** に希釈してください。

2 段階希釈をお勧めします。例えば、第 1 段階として 40 倍、第 2 段階として 100 倍。

【(E)ペルオキシダーゼ・アビジン結合物】

40 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 **2000 倍** に希釈してください。

2 段階希釈をお勧めします。例えば、第 1 段階として 20 倍、第 2 段階として 100 倍。

【(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 °C ~ 8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(B)標準溶液(200 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

## レビス® ELISA スキルチェック

に蓋をしっかりと閉め、2 °C ~ 8 °C 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)緩衝液及び(F)発色液(TMB)

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 °C ~ 8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

### (D)ビオチン結合抗体及び(E)ペルオキシダーゼ・アビジン結合物

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 °C ~ 8 °C 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

使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2 °C ~ 8 °C 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 °C ~ 8 °C 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。

### 管理試料 (QC 試料) 1、2

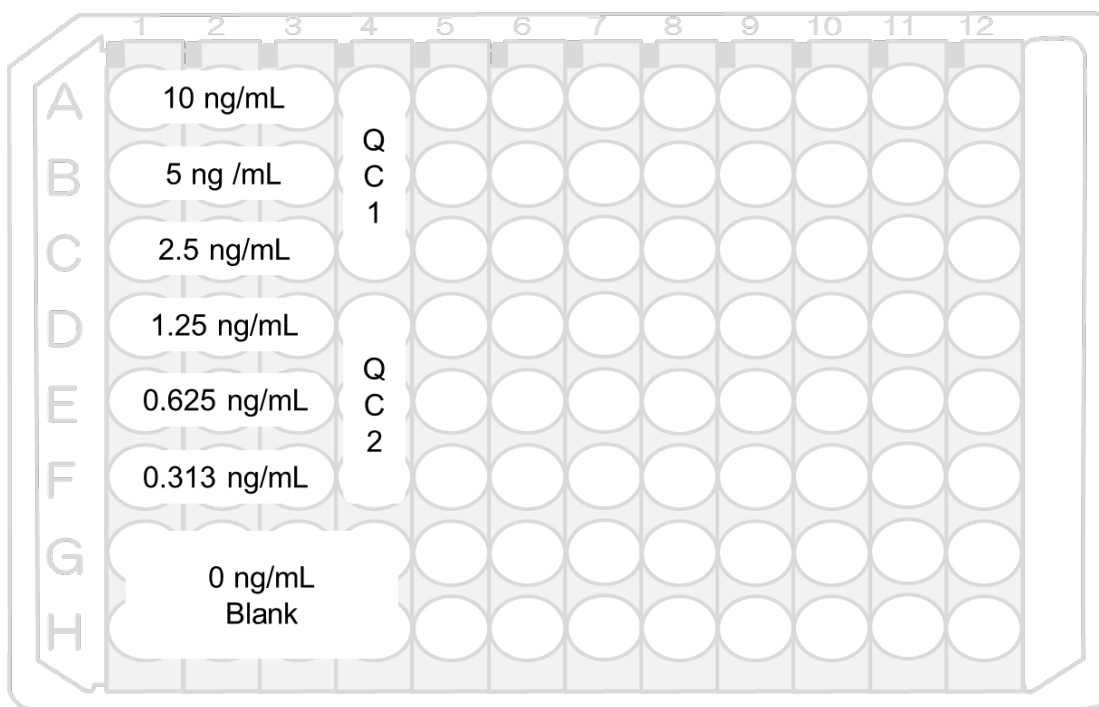
キットを分割して使用する際は使用する直前に冷蔵庫より取り出し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2 °C ~ 8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

## 6.測定操作法

抗体固相化プレートのシールはプレートが室温に戻ってから剥がしてください。温度が低く、シールが硬いうちに剥がすと、きれいに剥がれないことがあります。キットは室温に戻してから作業を開始してください。測定は必ず3重測定（1試料あたり3ウェルを使用して測定する）で行ってください。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。

- (1) 保護液を捨て、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。
- (2) 各ウェルにビオチン結合抗体を 100 µL 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。
- (3) 管理試料 (QC 試料) 測定ウェルに管理試料 (QC 試料) 1、2 をそれぞれのウェルに 10 µL 添加します。
- (4) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 10 µL 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(\*②)します。
- (6) プレートシールを貼り、室温(20 °C ~ 25 °C)で 2 時間静置(\*③)します。
- (7) 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。
- (8) 各ウェルにペルオキシダーゼ・アビジン結合物を 100 µL 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。
- (9) プレートシールを貼り、室温(20 °C ~ 25 °C)で 30 分間静置(\*③)します。
- (10) 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。
- (11) 各ウェルに発色液を 100 µL 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。
- (12) プレートシールを貼り、室温(20 °C ~ 25 °C)で 30 分間静置(\*③)します。
- (13) 各ウェルに反応停止液を 100 µL ずつ分注し、発色反応を停止します。
- (14) 攪拌(\*②)後、直ちに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 (6、7 ページ) をご参照ください。



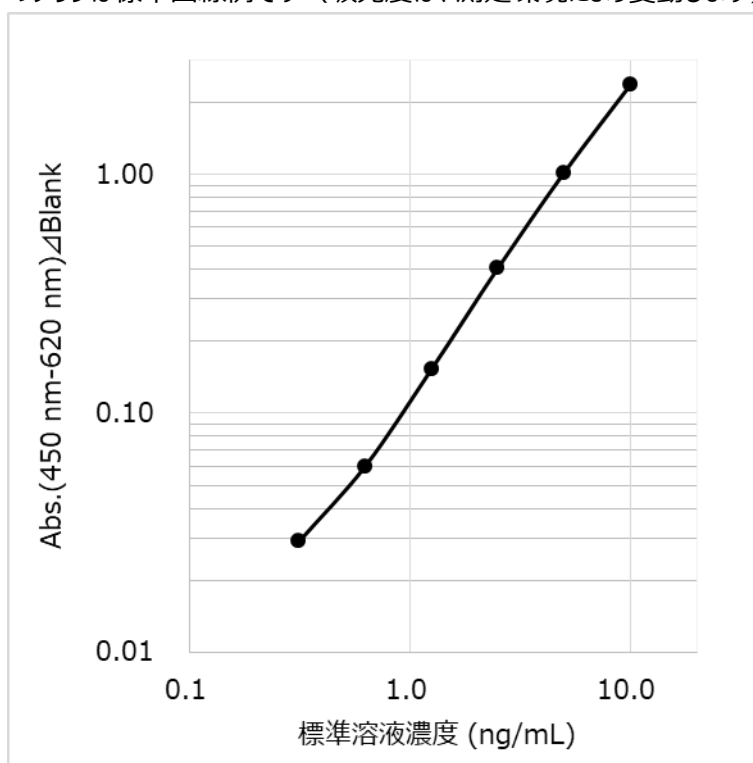
### 7.計算

(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。

(2)標準曲線より、QC 試料の吸光度に対応する濃度(ng/mL)を読み取ります。

\* 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。

下の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)。



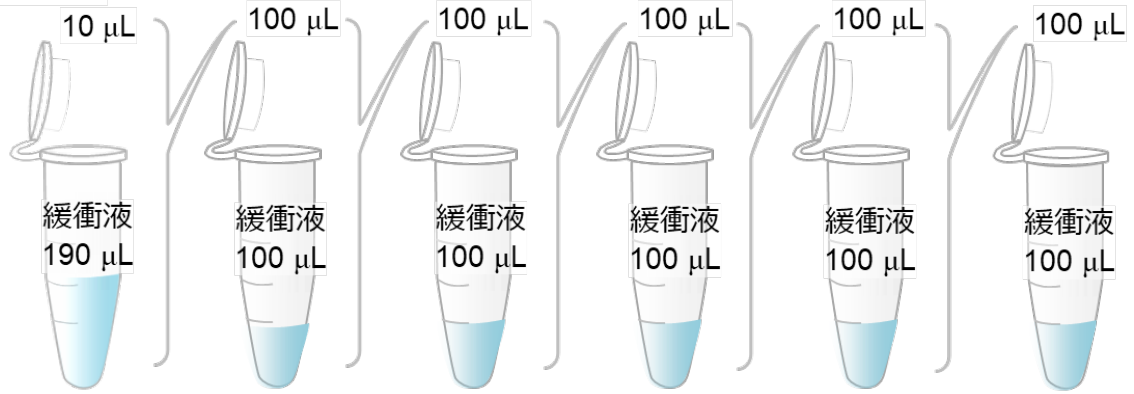
\* プレートリーダーは SUNRISE RAINBOW(TECAN)を使用

【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。

- ウェルプレート、試薬類を十分に室温(20℃～25℃)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)：室温化された緩衝液で、希釈してください。

標準溶液原液



調製濃度 ng/mL	10	5.0	2.5	1.25	0.625	0.313
---------------	----	-----	-----	------	-------	-------

- ビオチン結合抗体の希釈  
室温化された緩衝液で **4000倍**に希釈してください。2段階希釈をお薦めします。

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		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> ビオチン結合抗体	100 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌		* ②
<input type="checkbox"/> 管理試料 (QC 試料) または 標準溶液	10 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、2時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> ペルオキシダーゼ・アビジン結合物の希釈。室温化された緩衝液で、 <b>2000倍</b> 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。2段階希釈をお薦めします。		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	100 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、30分間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに発色液分注)		* 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	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、30分間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> 反応停止液 <span style="color: red;">強酸性につき取扱注意</span> 分注後、濃度により黄褐色に変色	100 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌 (直ちに攪拌)		* ②
<input type="checkbox"/> 直ちに吸光度測定 (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。4 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆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

## レビス® ELISA スキルチェック

をピペットで添加する際の液量目安は 300  $\mu$ L/ウェルです。万一、最小標準溶液濃度(0.313 ng/mL)の OD 値よりプレート OD 値が高くなる場合は解決方法の 1 つとして、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5 回~8 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。

(\* ②) 攪拌の目安は 600 rpm ~ 1200 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。

### 測定値の観察と検討

#### a. 検出限界について

Blank の吸光度平均値と標準偏差 (SD) を計算しましょう。

Blank の吸光度平均値 + 3.3 SD を計算しましょう。(ICH 合意による検出限界、detection limit, DL を計算するため) (正確な判定には Blank のウェル数をかなり多くすることが必要です)

この値を先ほどの検量線から濃度に換算しましょう。この値が今回測定した測定感度、および検出限界と考えられます。

#### b. 定量下限について

Blank の吸光度平均値と標準偏差 (SD) を計算しましょう。

Blank の吸光度平均値 + 10 SD を計算しましょう。(ICH 合意による定量下限(quantitation limit, QL)を計算するため)。

#### c. 検量線の真度について

定量値 (逆回帰濃度) と理論値 (調製濃度) との一致の程度を確認しましょう。標準溶液の調製濃度 (名目濃度) を 100 % としたとき、検量線の回帰式に標準溶液を測定したときの吸光度を当てはめ求めた濃度を百分率表記で表します。

#### d. 管理試料 (QC 試料) に関して

##### d.1. 測定精度の検討

平均値と標準偏差を求め、平均値に対する百分率、即ち変動係数(Coefficient of Variation, CV)を計算してください。この値が測定精度を示します。下の表を完成してください。吸光度は  $\Delta$ Blank (濃度ゼロの吸光度との差) を記入。

検体	ウェル 1 測定値	ウェル 2 測定値	ウェル 3 測定値	平均値	標準偏差	変動係数 CV (%)
管理試料 1						
管理試料 2						

$$\text{変動係数 CV (\%)} = \text{標準偏差} / \text{平均値} \times 100$$

##### d.2. 乖離度の検討

同じ試料を用いて行った定量値間の相違の程度。

$$\text{乖離度 (\%)} = \{ (\text{比較する分析の定量値}) - (\text{基準となる分析の定量値}) \} / (\text{両者の平均値}) \times 100$$

【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® ELISA スキルチェック

【和光コード】

639-46471

【お問い合わせ先】

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

Fax : 06-6201-5964

<https://www.fujifilm.com/ffwk/ja>