

## High Molecular Amyloid $\beta$ Oligomer ELISA Kit Wako Ver.2

### 【Introduction】

Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) is a peptide consisting of about 40 amino acids and accumulates in the brain of Alzheimer disease patients forming a structure known as senile plaques. Therefore,  $A\beta$  is considered as a causal factor of Alzheimer disease. In recent years, an  $A\beta$  oligomer hypothesis has been focused. The hypothesis is that soluble aggregates called  $A\beta$  oligomers resulting from polymerization of  $A\beta$  monomers, causes synaptic failure in nerve cells, not insolubilized and accumulated  $A\beta$  fibrils. There are several types of  $A\beta$  oligomers due to the difference in molecular weight, and low molecular  $A\beta$  oligomers (such as low-n oligomer) and high molecular  $A\beta$  oligomers (such as ADDL,  $A\beta$  \*56, proto-fibril) have been reported. This product is an ELISA kit that can specifically measure high molecular  $A\beta$  oligomers.

### 【Performance】

Standard curve range	Human cerebrospinal fluid (CSF) : 0.41 ~ 100 pM Human plasma (EDTA), serum : 0.16 ~ 40 pM *Based on 16-mer MAP peptide
Reactive $A\beta$ oligomers	$\geq$ 9-mer $A\beta$ oligomer
Sample	Human CSF Human plasma (EDTA) Human serum in vitro $A\beta$ oligomer
Sample volume	Human CSF : 25 $\mu$ L (4 times dilution) Human plasma (EDTA) or serum : 50 $\mu$ L (2 times dilution)
Assay time	4.5 hours
Detection method	Luminescence method

### 【Reagents supplied】

Components	Condition	Volume
(1) Antibody (BAN50)-coated Plate	Use as it is.	1 plate, 96 wells (8 $\times$ 12)
(2) Standard Solution (10 nM)	Use after preparation.	100 $\mu$ L/1 vial
(3) Buffer	Use as it is.	60 mL/1 bottle
(4) Biotin-conjugated Antibody (BAN50) Solution	Use after preparation.	100 $\mu$ L/1 vial
(5) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Use after preparation.	100 $\mu$ L/1 vial
(6) Luminescent Reagent 1	Use as it is.	6 mL/1 bottle
(7) Luminescent Reagent 2	Use as it is.	6 mL/1 bottle
(8) Wash Solution (10 $\times$ )	Use after preparation.	100 mL/1 bottle
(9) Sample Buffer for Serum/Plasma	Use as it is.	50 mL/1 bottle
(10) Plate Seal	Use as it is.	4 sheets
Instruction manual		1 copy

The microplate is coated with anti A $\beta$  antibody (BAN50). The standard solution or a sample is added in a well to bind A $\beta$  monomer and A $\beta$  oligomer to the antibody. Then, the biotin-conjugated anti A $\beta$  monoclonal antibody (BAN50) is allowed to react to bind only to the high molecular A $\beta$  oligomer in the well. In addition, the peroxidase-conjugated streptavidin is reacted. Finally, the peroxidase activity in the well is measured to determine the concentration of high molecular A $\beta$  oligomer in the sample. As a standard, a 16-mer MAP peptide with 16 epitopes of anti-A $\beta$  antibody (BAN50) is used and the measured value is the value calculated on the basis of 16-mer MAP peptide.

[illegible]

- ☐ Purified water (distilled water)
- ☐ Tubes for dilution of the standard solution/sample
- ☐ Glass apparatuses (volumetric cylinders, beakers) for dilution of the wash solution
- ☐ Tip replaceable pipets (pipets with a disposable tip that can accurately pipet 10  $\mu\text{L}$ , and in the range between 200 and 500  $\mu\text{L}$ )
- ☐ Continuous dispensing pipet that can dispense 100  $\mu\text{L}$  continuously
- ☐ Water absorbent paper towel (to eliminate liquid remaining in plates after washing)
- ☐ Agitator (vortex type)
- ☐ Microplate shaker (about 600 - 800 rpm)
- ☐ 96-well plate washer (preferred if available) or washing bottle
- ☐ 96-well plate reader (for luminescence measurement)
- ☐ Data processing software

(2) Standard Solution (10 nM)  
Mix the Standard Solution (10 nM) and the Buffer as described below to prepare the standard solutions.

Concentration (pM) of standard solution	Volume of the standard solution	Buffer
100	Standard Solution (10 nM) : 10 $\mu$ L	990 $\mu$ L
40.0	100 pM standard solution : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
16.0	40.0 pM standard solution : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
6.40	16.0 pM standard solution : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L

<b>2.56</b>	6.40 pM standard solution : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>1.02</b>	2.56 pM standard solution : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>0.41</b>	1.02 pM standard solution : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>0.00</b>	—	300 $\mu$ L

For human plasma (EDTA) or serum

Concentration (pM) of standard solution	Volume of the standard solution	Buffer
<b>100</b>	Standard Solution (10 nM) : 10 $\mu$ L	990 $\mu$ L
<b>40.0</b>	100 pM standard solution : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>16.0</b>	40.0 pM standard solution : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>6.40</b>	16.0 pM standard solution : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>2.56</b>	6.40 pM standard solution : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>1.02</b>	2.56 pM standard solution : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>0.41</b>	1.02 pM standard solution : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>0.16</b>	0.41 pM standard solution : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>0.00</b>	—	300 $\mu$ L

- (4) Biotin-conjugated Antibody (BAN50) Solution  
Dilute the solution 100 times with the Buffer.
  - (5) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution  
Dilute the solution 100 times with the Buffer.
  - (6) Luminescent Reagent 1 and (7) Luminescent Reagent 2  
Mix Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 in 1 : 1 (vol./vol.) 15 to 30 minutes before use. Store the reagent solution away from light until use.  
Example : Mix 6 mL of Luminescent Reagent 1 and 6 mL of Luminescent Reagent 2 (when all of 96 wells are used)
  - (8) Washing Solution (10  $\times$ )  
Dilute the solution 10 times with purified water (distilled water).  
Example : Dilute 100 mL of the concentrated wash solution (10  $\times$ ) with 900 mL of purified water (distilled water) (when all of 96 wells are used)
- ☐ Use other reagents as they are.

#### **[Storage and stability of reagents]**

- (1) Antibody (BAN50)-coated Plate  
Return unused (under a sealed and refrigerated condition) antibody-coated strips in the zip-sealed pack in the container and store at 2 to 10°C. The stability is maintained within the expiration date.
- (2) Standard Solution (10 nM)  
When the kit is divided and used, take out the standard solution from the refrigerator and dilute it immediately before use and keep the remaining stock solution with the cap tightly closed at 2 to 10°C without returning to room temperature. The stability is maintained within the expiration date. Use the respective diluted standard solutions immediately and do not store them after use.
- (3) Buffer  
If a part of the solution is used, transfer a volume slightly greater than the necessary volume in another container. Promptly close the cap of the container containing the remaining solution tightly and store at 2 to 10°C

without returning to the room temperature. The stability is maintained within the expiration date.

(4) Biotin-conjugated Antibody (BAN50) Solution and (5) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

When the kit is divided and used, take out the solutions from the refrigerator and dilute them immediately and keep the remaining stock solutions with the caps tightly closed at 2 to 10°C without returning to room temperature. The stability is maintained within the expiration date. Discard the diluted solutions remaining after use.

(6) Luminescent Reagent 1 and (7) Luminescent Reagent 2

When the kit is divided and used, take out the reagents from the refrigerator and prepare them. Keep the remaining luminescent reagents with the caps tightly closed at 2 to 10°C without returning to room temperature. The stability is maintained within the expiration date.

(8) Washing Solution (10 ×)

Store the Wash Solution (10 ×) at 2 to 10°C with its cap tightly closed. The stability is maintained within the expiration date. Discard the diluted wash solution remaining after use.

(9) Sample Buffer for Serum/Plasma

If a part of the solution is used, transfer a volume slightly greater than the necessary volume in another container. Promptly close the cap of the container containing the remaining solution tightly and store at 2 to 10°C without returning to the room temperature. The stability is maintained within the expiration date.

**[Preparation for sample]**

**[CSF]** dilute 2-4 times CSF with buffer at room temperature.

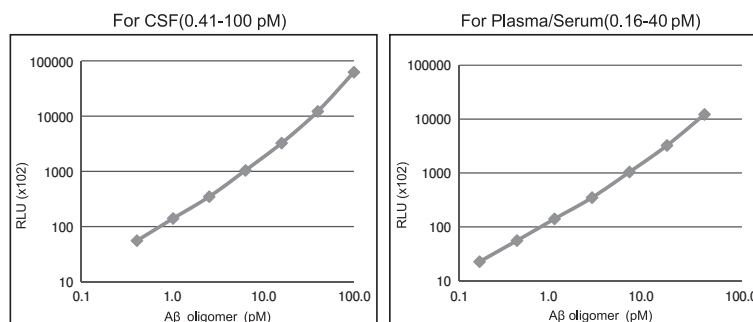
**[Plasma (EDTA) or serum]** dilute 2 times plasma (EDTA) or serum with Sample Buffer for Serum/Plasma and incubate 30 min at room temperature.

**[Measurement procedure]**

1. Wash the Antibody (BAN50)-coated Plate 4 times by filling the wells with the prepared wash solution. Then, invert the plate on a paper towel and pat lightly to eliminate the solution remaining in the wells.
2. Dispense 100  $\mu$ L each of the standard solutions at the respective concentrations in the reference standard measurement wells.
3. Dispense 100  $\mu$ L each of the diluted samples in the wells.
4. Shake the plate using a microplate shaker.
5. Attach the Plate Seal and leave to stand at room temperature (20 to 25°C) for 2 hours.
6. After completion of the reaction, discard the reaction solution, fill the wells with the wash solution, and wash the plate 4 times. Then, invert the plate on a paper towel and pat lightly to eliminate the solution remaining in the wells.
7. Dispense 100  $\mu$ L each of the biotin-conjugated antibody (BAN50) solution to the wells. Shake the plate using the microplate shaker.
8. Attach the Plate Seal and leave to stand at room temperature (20 to 25°C) for 2 hours.
9. After completion of the reaction, discard the reaction solution, fill the wells with the wash solution, and wash the plate 4 times. Then, invert the plate on a paper towel and pat lightly to eliminate the solution remaining in the wells.
10. Dispense 100  $\mu$ L each of the peroxidase-conjugated streptavidin solution to the wells. Shake the plate using the microplate shaker.

11. Attach the Plate Seal and leave to stand at room temperature (20 to 25°C) for 30 minutes.
12. After completion of the reaction, discard the reaction solution, fill the wells with the wash solution, and wash the plate 4 times. Then, invert the plate on a paper towel and pat lightly to eliminate the solution remaining in the wells.
13. Dispense 100  $\mu$ L each of the mixed luminescent reagents to the wells. Shake the plate for 1 minute using the microplate shaker.
14. After agitation, determine the luminescent intensity using the 96-well microplate reader (for luminescence measurement). It is recommended to perform the measurement 10 to 20 minutes after addition of the luminescent reagent.
15. Create a standard curve by plotting the concentrations (pM) of the standard solutions along the X axis and the luminescence intensity along the Y axis. Read the concentration (pM) corresponding to the luminescence intensity of the diluted sample. Multiply the concentration read with the sample dilution factor to obtain a measured value. Convert the measured value to the concentration based on the 16-mer MAP peptide.  
 \* Use of a tertiary polynomial equation with 4 or 5 parameters is recommended for the arithmetic processing using computer software.

#### Calibration curve



The concentration is a value converted on the basis of 16-mer MAP peptide.

#### [Precautions for use]

1. Use polypropylene containers when handling the sample. Storage in a freezer at  $-35^{\circ}\text{C}$  or lower is recommended when a sample is stored for a long period of time. Do not repeat freezing and thawing. Thaw the frozen sample and thoroughly shake just before measurement. Dilute the sample just before use.
2. Do not use a sample with hemolysis or containing high lipid.
3. Centrifuge a sample with opacity and insoluble matter before measurement.
4. With a sample suspected of the influence of an interfering substance, check the linearity of dilution of the same sample using 2 or more different dilution factors. When a sample is diluted, dilute it with the Buffer in advance using test tubes (PP, PE) and dispense in the measurement wells. The dilution factor is 2 ~ 4-time dilution in the standard operating procedure.
5. This kit should be used by a person who has completed the training for the ELISA or under his/her supervision.
6. For measurement by the manual operation, the kit should be used by a person who is well-trained for stable reproducibility of pipetting operation.
7. Wear gloves, goggles and protective gown during preparation and operation

of the kit.

8. Take care not to touch the reagents to the skin. If any of the reagents of this kit has adhered to the eye, mouth, wound or skin by error, promptly take emergent measures such as washing thoroughly with tap water and visit a physician if necessary.
9. Do not eat, drink or smoke at a place where this kit is used.
10. Handle samples with thorough care as a substance with a risk of infection. This kit contains animal-derived ingredients.
11. Immerse used samples and used consumables in 1% formalin, 2% glutaraldehyde or sodium hypochlorite solution at 0.1% or higher for at least 1 hour. Or, autoclave these before disposal. Discard the used consumables and unused drugs in accordance with the rules of the testing site and local regulations.
12. Do not mix the reagent of different lot numbers. Be sure to affix the Plate seal during standing for reaction in each step to prevent well drying, contamination of foreign materials, temperature bias and evaporation of the dispensed reagents.
13. The ELISA is affected by the measurement environment. Strictly observe measurement procedure and room temperature of 20 to 25 °C (on the experimental table or incubator) at the place for reaction on standing. Never perform the measurement in an environment with air blowing (including circulation from the air-conditioner) and low humidity.

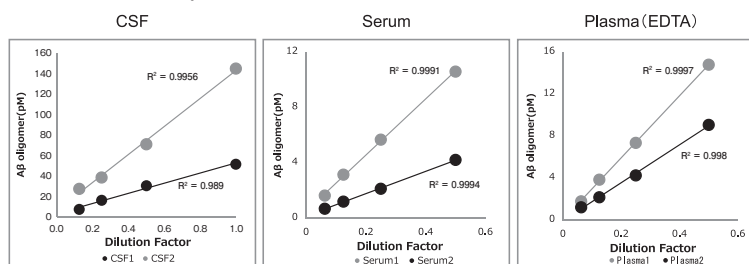
#### 【Example of measurement】

##### ○ Spiked recovery test

	Not spiked	+0.5 pM Std.	+0.1 pM Std.	+5 pM Std.	+30 pM Std.
Human plasma	Assay value	Assay value	Assay value	Assay value	Assay value
	1.85 pM	2.36 pM	2.85 pM	7.11 pM	31.2 pM
		Recovery	Recovery	Recovery	Recovery
		102%	100%	105%	97.8%
Human serum	Assay value	Assay value	Assay value	Assay value	Assay value
	1.58 pM	2.07 pM	2.59 pM	6.64 pM	31.9 pM
		Recovery	Recovery	Recovery	Recovery
		98%	101%	101%	101%

	Not spiked	+3 pM Std.	+6 pM Std.	+15 pM Std.
Human CSF1	Assay value	Assay value	Assay value	Assay value
	5.16 pM	8.01 pM	10.6 pM	18.1 pM
		Recovery	Recovery	Recovery
		95%	91%	86%
Human CSF2	Assay value	Assay value	Assay value	Assay value
	29.1 pM	38.8 pM	44.0 pM	59.9 pM
		Recovery	Recovery	Recovery
		97%	99.3%	88%

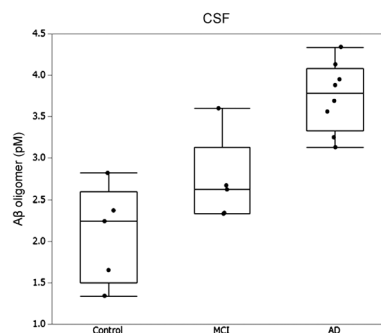
##### ○ Dilution linearity



##### ○ Assay of clinical samples

Cerebrospinal fluid samples from subjects without Alzheimer's disease (non-AD), patients with mild cognitive impairment (MCI), and those with Alzheimer's disease (AD) were assayed using this ELISA kit.

	Age	Sex	MMSE	CSF A $\beta$ oligomer (pM)
Control	69	M	30	2.37
	60	F	30	1.65
	59	M	30	2.82
	46	M	28	2.24
	60	F	29	1.34
MCI	69	F	24	3.6
	76	M	23	2.62
	82	M	26	2.33
	69	F	23	2.67
	73	F	25	2.34
AD	79	F	10	3.56
	88	M	24	3.13
	62	M	16	4.13
	78	M	13	3.95
	63	M	14	3.88
	74	F	16	3.25
	76	M	19	3.69
	84	M	16	4.34



#### 【Outline of the measurement procedure】

- ☐ Return the plate and reagents thoroughly to room temperature (20 - 25°C).
- ☐ Dilution of the concentrated wash solution : Dilute 10 times with purified water returned to room temperature.
- ☐ Dilute CSF 2-4 times with buffer at room temperature (example : sample (60  $\mu$ L) + Buffer (180  $\mu$ L)).
- ☐ Dilute serum or plasma (EDTA) 2 times with Sample Buffer for Serum/Plasma and incubate 30 min at room temperature (example : sample (120  $\mu$ L) + Sample Buffer for Serum/Plasma (120  $\mu$ L)).
- ☐ Dilution of the standard solution (example) : Dilute with the Buffer returned to room temperature.

For CSF									
Concentration (pM)	100	40.0	16.0	6.40	2.56	1.02	0.41	0	
Standard solution ( $\mu$ L)	10nM: 10	200*	200*	200*	200*	200*	200*	200*	0
Buffer ( $\mu$ L)	990	300	300	300	300	300	300	300	300

For plasma (EDTA) or serum									
Concentration (pM)	100	40.0	16.0	6.40	2.56	1.02	0.41	0.16	0
Standard solution ( $\mu$ L)	10nM: 10	200*	200*	200*	200*	200*	200*	200*	0
Buffer ( $\mu$ L)	990	300	300	300	300	300	300	300	300

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

- ☐ **Antibody (BAN50)-coated Plate**
- ☐ ↓ Washing 4 times (\* (i))
- ☐ **Sample or standard solution** **100  $\mu$ L/well**
- ☐ ↓ Shake (\* (ii)), 2-hour reaction at room temperature (20 - 25°C), standing (\* (iii))
- ↓
- ☐ \*Preparation of the biotin-conjugated antibody (BAN50) solution (dilute 100 times with the Buffer returned to room temperature)
- ☐ ↓ Washing 4 times (\* (i))
- ☐ **Biotin-conjugated antibody (BAN50) solution** **100  $\mu$ L/well**
- ☐ ↓ Shake (\* (ii)), 2-hour reaction at room temperature (20 - 25°C), standing (\* (iii))
- ↓

- ☐ \*Preparation of the peroxidase-conjugated streptavidin solution (dilute 100 times with the Buffer returned to room temperature)
- ☐ ↓ Washing 4 times (\* (i))
- ☐ **Peroxidase-conjugated streptavidin solution** **100  $\mu$ L/well**
- ☐ ↓ Shake(\* (ii)), 30-minute reaction at room temperature (20 - 25°C), standing (\* (iii))

↓

- ☐ \*Preparation of the luminescent reagent (mix Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 in 1 : 1 (vol./vol.))
- ☐ ↓ Washing 4 times (\* (i))
- ☐ **Luminescent reagent** **100  $\mu$ L/well**
- ☐ ↓ Shake for 1 minute at room temperature (20 - 25°C)
- ☐ **Measurement of luminescence intensity (to be measured between 10 and 20 minutes)**

(\* (i)) In each washing, dispense the wash solution in the wells, shake lightly for 10 seconds on the palm and discard. After 4 consecutive washings, invert the plate on a paper towel and pat to eliminate the wash solution completely. After elimination of the wash solution, promptly dispense the subsequent solution taking care not to dry the wells. The volume of the wash solution to be pipetted to the plate is about 300  $\mu$ L/well.

(\* (ii)) Shake 3 times each at about 600 - 800 rpm for 10 seconds.

(\* (iii)) After completion of agitation, attach a Plate Seal and leave to stand. Peel the protective paper from the Plate Seal and attach the adhesive side to the plate. Never re-use the Plate Seal used once.

**[Storage condition]** Store at 2 to 10°C.  
**[Expiration date]** Indicated on the label  
**[Packaging]** For 96 tests

#### **[References]**

- 1) Fukumoto, H., *et al.*: *FASEB J.*, 24, 2716 (2010).
- 2) Kasai, T., *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 422, 3, 375 (2012).
- 3) Kasai, T., *et al.*: *Neurosci. Lett.*, 551, 17 (2013).
- 4) Chambers, J. K., *et al.*: *Acta. Neuropathol. Commun.*, 3, 78 (2015).
- 5) Kasai, T., *et al.*: *PLoS One*, 12, 4, e0174630 (2017).

---

## **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://ffwk.fujifilm.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 : + 49-2131-3111-100  
<http://www.wako-chemicals.de>



## 高分子アミロイドβオリゴマー ELISA キットワコー Ver.2

### 【はじめに】

アミロイドβ (Aβ) は、約 40 アミノ酸から成るペプチドで、アルツハイマー病患者の脳内に蓄積して、老人斑という構造を形成します。そのため Aβ はアルツハイマー病の原因因子として考えられています。近年、不溶化、蓄積した Aβ Fibril ではなく、Aβ モノマーが重合した Aβ オリゴマーと呼ばれる可溶性凝集体が神経細胞にシナプス障害を与えるという Aβ オリゴマー仮説が注目されています。

Aβ オリゴマーには、分子量の違いからいくつか種類があり、低分子の Aβ オリゴマー (Low-n oligomer など) と高分子の Aβ オリゴマー (ADDL、Aβ<sup>\*</sup>56、proto-fibril など) が報告されています。本品は、9 量体以上の高分子 Aβ オリゴマーを特異的に測定可能な ELISA キットです。

### 【キット性能】

検量線範囲	ヒト脳脊髄液検体 (CSF) : 0.41 ~ 100pM ヒト血清・血漿 (EDTA) 検体 : 0.16 ~ 40pM ※ 16 量体 MAP ペプチド換算
反応する Aβ オリゴマー	≥ 9mer Aβ オリゴマー
測定対象検体	ヒト脳脊髄液 ヒト血清・血漿 (EDTA) in vitro Aβ オリゴマー
必要検体量	ヒト脳脊髄液 : 25 μL (4 倍希釈時) ヒト血清・血漿 (EDTA) : 50 μL (2 倍希釈時)
測定時間	4 時間 30 分
検出法	発光系

### 【キット内容】

構 成 品	状 態	容 量
(1) Antibody (BAN50)-coated Plate 抗体 (BAN50) 固相化プレート	そのまま使用	1 プレート 96wells (8×12)
(2) Standard Solution (10nM) / 標準溶液 (10nM)	調製後使用	100 μL / 1 本
(3) Buffer / 緩衝液	そのまま使用	60mL / 1 本
(4) Biotin-conjugated Antibody (BAN50) Solution ビオチン結合抗体 (BAN50) 溶液	調製後使用	100 μL / 1 本
(5) 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 μL / 1 本
(6) Luminescent Reagent1 / 発光試薬 1	そのまま使用	6mL / 1 本
(7) Luminescent Reagent2 / 発光試薬 2	そのまま使用	6mL / 1 本
(8) Wash Solution (10×) / 洗浄液 (10×)	調製後使用	100mL / 1 本
(9) Sample Buffer for Serum/Plasma 血漿血清用検体調製液	そのまま使用	50mL / 1 本
(10) プレートシール	そのまま使用	4 枚
取扱説明書		1 部

測定プレートの中には抗 A $\beta$  抗体 (BAN50) 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入れて抗体に A $\beta$  モノマーおよび A $\beta$  オリゴマーを結合させます。その後、ビオチン標識抗 A $\beta$  モノクローナル抗体 (BAN50) を反応させて、ウェル内的高分子 A $\beta$  オリゴマーのみ結合させます。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、検体中の高分子 A $\beta$  オリゴマーの濃度を求めることができます。なお標準品には抗 A $\beta$  抗体 (BAN50) のエピトープが 16 本結合した 16 量体 MAP ペプチドを使用しており、測定値は 16 量体 MAP ペプチドで換算した値になります。

A phylogenetic tree showing the evolutionary relationships between 15 different CGGGS gene sequences. The tree is rooted on the left with a node labeled 'K'. It branches out to the right, with each terminal node labeled 'K' and corresponding to a specific species name. The species names are: CGGGGSGDAEFRHDSGY, CGGGGSGDAEFRHDSGY, CGGGGSGDAEFRHDSGY, CGGGGSGDAEFRHDSGY, CGGGGSGDAEFRHDSGY, CGGGGSGDAEFRHDSGY, CGGGGSGDAEFRHDSGY, CGGGGSGDAEFRHDSGY, CGGGGSGDAEFRHDSGY, CGGGGSGDAEFRHDSGY, CGGGGSGDAEFRHDSGY, CGGGGSGDAEFRHDSGY, CGGGGSGDAEFRHDSGY, CGGGGSGDAEFRHDSGY, and CGGGGSGDAEFRHDSGY. The tree structure indicates that these sequences are highly similar, with many branches showing very close relationships.

- ☐ 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PETTING できるもの、および 200 ～ 500  $\mu$ L を正確にピPETTING 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

(2) 標準溶液 (10nM)  
標準溶液 (10nM) と緩衝液を下記のように混合して標準溶液を調製して下さい。

標準溶液濃度 (pM)	標準溶液の容量	緩衝液
100	原液 (10nM) : 10 $\mu$ L	990 $\mu$ L
40.0	100pM の標準溶液 : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
16.0	40.0pM の標準溶液 : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
6.40	16.0pM の標準溶液 : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
2.56	6.40pM の標準溶液 : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
1.02	2.56pM の標準溶液 : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
0.410	1.02pM の標準溶液 : 200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
0.00	—	300 $\mu$ L

・ヒト血清・血漿（EDTA）検体用

標準溶液濃度（pM）	標準溶液の容量	緩衝液
<b>100</b>	原液（10nM）：10 $\mu$ L	990 $\mu$ L
<b>40.0</b>	100pM の標準溶液：200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>16.0</b>	40.0pM の標準溶液：200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>6.40</b>	16.0pM の標準溶液：200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>2.56</b>	6.40pM の標準溶液：200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>1.02</b>	2.56pM の標準溶液：200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>0.410</b>	1.02pM の標準溶液：200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>0.164</b>	0.410pM の標準溶液：200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>0.00</b>	—	300 $\mu$ L

- (4) ビオチン結合抗体（BAN50）溶液  
緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。
- (5) 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) 発光試薬 1 および (7) 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.）で混合して下さい。  
使用するまで遮光しておいてください。  
例：発光試薬 1（6mL）：発光試薬 2（6mL）の混合（96 ウェル全て使用する場合）
- (8) 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 の濃縮洗浄液（10 $\times$ ）+ 900mL の精製水（蒸留水）（96 ウェ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（BAN50）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℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。
- (2) 標準溶液（10nM）  
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。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。
- (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（BAN50）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。

- (6) 発光試薬 1 および (7) 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  
保存してください。有効期限内安定性を保ちます。
- (8) 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。
- (9) 血漿血清用検体調製液  
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。

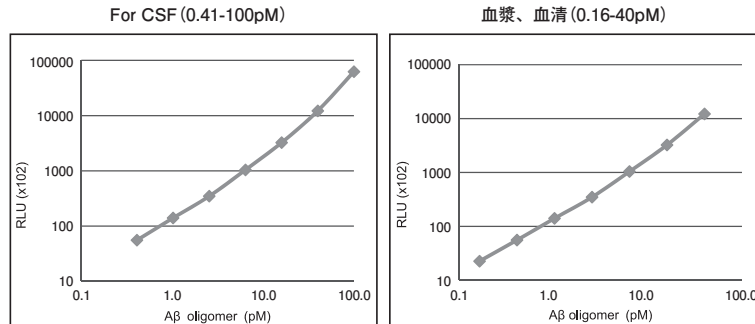
#### 【検体調製方法】

1. 定法により採取したヒト脳脊髄液は、室温化した緩衝液で 2～4 倍に希釈後、  
測定を行ってください。
2. 定法により採取したヒト血清、血漿 (EDTA) は、室温化した血漿血清用検  
体調製液で 2 倍に希釈して室温で 30 分静置後、測定を行ってください。

#### 【測定操作】

1. 抗体 (BAN50) 固相化プレートに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. 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 100  $\mu$ L ずつ分注します。
3. 検体測定ウェルに緩衝液または検体調製液で希釈調製した検体を 100  $\mu$ 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撹拌します。
5. プレートシールを貼り、室温 (20～25℃) で 2 時間静置します。
6. 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし、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  
うにしてウェルに残った液を取り除きます。
7. 各ウェルにビオチン結合抗体 (BAN50) 溶液 100  $\mu$ 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撹拌します。
8. プレートシールを貼り、室温 (20～25℃) で 2 時間静置します。
9. 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし 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  
うにしてウェルに残った液を取り除きます。
10. 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 100  $\mu$ 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撹拌します。
11. プレートシールを貼り、室温 (20～25℃) で 30 分間静置します。
12. 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。
13. 各ウェルに混和調製した発光試薬を 100  $\mu$ 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、撹拌します。
14. 撹拌後、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。
15. X 軸を標準溶液濃度 (pM)、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 (pM) を読み取ります。読み取った濃度  
に検体希釈率をかけて測定値とします。測定値は 16 量体 MAP ペプチド換  
算での濃度となります。  
\* 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。

#### 標準曲線例



※濃度は 16 量体 MAP ペプチドの換算値

#### 【注意事項】

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。検体を長期に保管する場合は、 $-35^{\circ}\text{C}$  以下での凍結保管を推奨します。繰り返しの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。また検体の希釈は用時調製して下さい。
2. 溶血した検体や高脂質検体は使わないで下さい。
3. 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。
4. 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。検体を希釈する場合は、あらかじめ試験管 (PP、PE) 等を用いて緩衝液または検体調製液で希釈し測定ウエルに分注して下さい。
5. 本キットは 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。
6. 用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。
7. 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。
8. 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。
9. 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。
10. 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。
11. 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。
12. 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。
13. 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： $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$  (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。

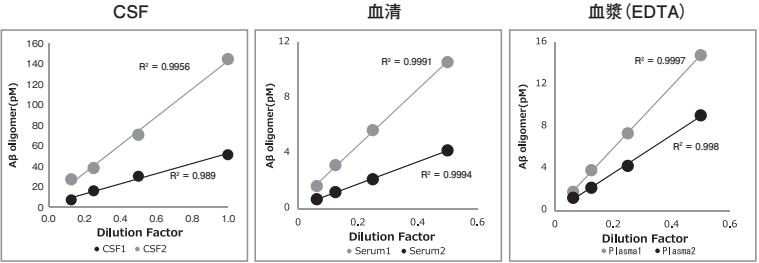
【測定例】

○添加回収試験

ヒト血漿 検体	未添加	+0.5pM 標準溶液		+1pM 標準溶液		+5pM 標準溶液		+30pM 標準溶液	
	測定値	測定値	Recovery	測定値	Recovery	測定値	Recovery	測定値	Recovery
	1.85pM	2.36pM	102%	2.85pM	100%	7.11pM	105%	31.2pM	97.8%
ヒト血清 検体	未添加	+0.5pM 標準溶液		+1pM 標準溶液		+5pM 標準溶液		+30pM 標準溶液	
	測定値	測定値	Recovery	測定値	Recovery	測定値	Recovery	測定値	Recovery
	1.58pM	2.07pM	98%	2.59pM	101%	6.64pM	101%	31.9pM	101%

ヒト脳脊 髄液①	未添加	+3pM 標準溶液		+6pM 標準溶液		+15pM 標準溶液	
	測定値	測定値	Recovery	測定値	Recovery	測定値	Recovery
	5.16pM	8.01pM	95%	10.6pM	91%	18.1pM	86%
ヒト脳脊 髄液②	未添加	+10pM 標準溶液		+15pM 標準溶液		+35pM 標準溶液	
	測定値	測定値	Recovery	測定値	Recovery	測定値	Recovery
	29.1pM	38.8pM	97%	44.0pM	99.3%	59.9pM	88%

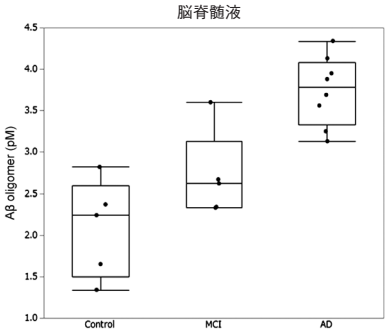
○希釈直線性



○臨床検体での測定

非認知症者 (Control)、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。

	年齢	性別	MMSE	脳脊髄液
				Aβ オリゴマー (pM)
Control	69	M	30	2.37
	60	F	30	1.65
	59	M	30	2.82
	46	M	28	2.24
	60	F	29	1.34
MCI	69	F	24	3.6
	76	M	23	2.62
	82	M	26	2.33
	69	F	23	2.67
	73	F	25	2.34
AD	79	F	10	3.56
	88	M	24	3.13
	62	M	16	4.13
	78	M	13	3.95
	63	M	14	3.88
	74	F	16	3.25
	76	M	19	3.69
	84	M	16	4.34



【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。
- ☐ CSF 検体を室温化した緩衝液で 2～4 倍希釈（例 検体：60  $\mu$ L + 緩衝液：180  $\mu$ L）
- ☐ 血漿（EDTA）もしくは血清検体を室温化した血漿血清用検体調製液で 2 倍希釈して 30 分静置。  
（例 検体：120  $\mu$ L + 血漿血清用検体調製液：120  $\mu$ L）
- ☐ 標準溶液の希釈（例）：室温化した緩衝液で、希釈して下さい。

希釈例：ヒト脳脊髄液検体用									
濃度（pM）	100	40.0	16.0	6.40	2.56	1.02	0.41	0	
標準溶液（ $\mu$ L）	原液：10	200*	200*	200*	200*	200*	200*	0	
緩衝液（ $\mu$ L）	990	300	300	300	300	300	300	300	

希釈例：血漿（EDTA）、血清検体用									
濃度（pM）	100	40.0	16.0	6.40	2.56	1.02	0.41	0.16	0
標準溶液（ $\mu$ L）	10nM: 10	200*	200*	200*	200*	200*	200*	200*	0
緩衝液（ $\mu$ L）	990	300	300	300	300	300	300	300	300

\*：ひとつ高濃度の標準溶液

- ☐ **抗体（BAN50）固相化プレート**
- ☐ ↓ 洗浄 4 回（\*①）
- ☐ **検体または標準溶液** **100  $\mu$ L/ ウエル**
- ☐ ↓ 攪拌（\*②）、室温（20～25℃）、2 時間反応、静置（\*③）
- ↓
- ☐ \* ビオチン結合抗体（BAN50）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）
- ☐ **ビオチン結合抗体（BAN50）溶液** **100  $\mu$ L/ ウエル**
- ☐ ↓ 攪拌（\*②）、室温（20～25℃）、2 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  $\mu$ L/ 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  $\mu$ L/ 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。洗浄液をビベットで添加する際の液量目安は 300  $\mu$ L / ウエルです。

（\*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

【参考文献】

- 1) Fukumoto, H., *et al.*: *FASEB J.*, 24, 2716 (2010).
- 2) Kasai, T., *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 422, 3, 375 (2012).
- 3) Kasai, T., *et al.*: *Neurosci. Lett.*, 551, 17 (2013).
- 4) Chambers, J. K., *et al.*: *Acta. Neuropathol. Commun.*, 3, 78 (2015).
- 5) Kasai, T., *et al.*: *PLoS One*, 12, 4, e0174630 (2017).

製造発売元

**富士フイルム 和光純薬株式会社**  
大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
Tel : 06-6203-3741