

LBIS™ Der f 2 ELISA Kit

Please, read this instruction carefully before use.

1. Intended use

LBIS™ Der f 2 ELISA Kit is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of Der f 2 (*Dermatophagoides farina*). This is intended for research use only.

2. Assay principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS™ Der f 2 ELISA Kit, standards or diluted samples are incubated in monoclonal antibody coated wells to capture Der f 2. After 1 hour incubation and washing, Peroxidase-conjugated anti-Der f 2 antibody is added and incubated for 1 hour. After washing, HRP-complex remaining in wells is reacted with a TMB Solution for 20 minutes, and reaction is stopped by addition of acidic solution, and absorbance of yellow product is measured spectrophotometrically at 450 nm. The absorbance is nearly proportional to Der f 2 concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against standard Der f 2 concentrations. Der f 2 concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

3. Performance characteristics

- Assay range

The assay range of the kit is 0.78 ng/mL - 50 ng/mL.

- Specificity [(D) Peroxidase conjugated Antibody Solution]

The kit uses two monoclonal antibodies specific to Der f 2.

Sample	Cross reaction
Der f 1	less than the detection limit.

- Precision of assay

Within assay variation (2 samples, 5 replicates assay) Mean CV was within 10%.

- Reproducibility

Between assay variation (3 samples, 4 days, duplicate assay) Mean CV was within 10%.

- Recovery test

Der f 2 was added in 3 concentrations to 2 samples and was assayed.

The recoveries were 95.1% - 104%

- Dilution test

2 samples were serially diluted by 3 steps.

The dilution curves showed excellent linearity. ($R^2=0.9959\&0.9996$)

4. Precautions / Technical tips

- For professional use only. Beginners are advised to use this kit under the guidance of experienced person.
- Wear gloves and laboratory coats when handling assay materials.
- Use clean laboratory glassware.
- Do not drink, eat or smoke in the areas where assays are carried out.
- Handle the standard solution and assay samples with great care as ones potentially containing allergenic substances.
- This kit contains components of animal origin. These materials should be handled as potentially infectious.
- Be careful not to allow the reagent solutions of the kit to touch the skin, eyes and mucus membranes. Especially be careful for the stop solution because it is 1 M sulfuric acid. The stop solution and the substrate solution may cause skin/eyes irritation. In case of contact with these wash skin/eyes thoroughly with water and seek medical attention, when necessary.
- Avoid contact with the acidic stop solution and TMB Solution, which contains hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine. Wear gloves and eye and clothing protection when handling these reagents.
- The materials must not be pipetted by mouth.
- Residual samples and used tips should be rinsed in 1% formalin, 2% glutal aldehyde, or more than 0.1% sodium hypochlorite solution for more than 1 hour, or be treated by an autoclave before disposal.
- Dispose consumable materials and unused contents in accordance with applicable regional / national regulatory requirements.
- In order to avoid dryness of wells, contamination of foreign substances and evaporation of dispensed reagents, never forget to cover the well plate with a plate seal supplied, during incubation.

- ELISA can be easily affected by your laboratory environment. Room temperature should be at 20°C - 25°C strictly. Avoid airstream velocity over 0.4 m/sec. (including wind from air conditioner), and humidity less than 30%.
- In manual operation, proficiency in pipetting technique is recommended.
- The reagents are prepared to give accurate results only when used in combination within the same box. Therefore, do not combine the reagents from kits with different lot numbers. Even if the lot number is the same, it is best not to mix the reagents with those that have been preserved for some period.
- Be careful to avoid any contamination of assay samples and reagents. We recommend the use of disposal pipette tips, and 1 tip for 1 well.
- Optimally, the reagent solutions of the kit should be used immediately after reconstitution. Otherwise, store them in a dark place at 2°C - 10°C.
- Time the reaction from the pipetting of the reagent to the first well.
- Prepare a standard curve for each assay.
- Dilution of the assay sample must be carried out using the buffer solution provided in the kit.
- The TMB Solution should be almost clear pale blue before use. It turns blue during reaction, and gives yellowish color after addition of stop solution. Greenish color means incomplete mixing.
- To avoid denaturation of the coated antibody, do not let the plate go dry.
- As the antibody-coated plate is module type of 8 wells × 12 strips, each strip can be separated by cutting the cover sheet with a knife and used independently.
- When ELISA has to be done under the airstream velocity over 0.4 m/sec. and the humidity less than 30%, seal the well plate with a plate seal and place the well plate in an incubator or a styrofoam box in each step of incubation.

5. Reagents supplied

Components	Use Status	Amount
(A) Antibody-coated plate	Use after washing	96 wells/1 plate
(B) Der f 2 Standard	Concentrated. Use after dilution	200 μ L/1 vial
(C) Buffer	Ready for use.	60 mL/1 bottle
(D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution	Concentrated. Use after dilution.	200 μ L/1 vial
(F) TMB Solution	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(G) Buffer solution for extraction	Ready for use.	100 mL/1 bottle
(H) Stop Solution	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(I) Wash Solution (10 \times)	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle
(J) Plate seal	—	3 sheets

[Storage and stability]

[(A) Antibody-coated Plate]

If seal is not removed, put the strip back in a plastic bag with zip-seal originally used for well-plate container and store at 2°C - 10°C. The strip will be stable until expiration date.

[(B) Der f 2 Standard]

Standard solutions prepared above should be used as soon as possible, and should not be stored.

[(C) Buffer] & [(F) TMB Solution] & [(G) Buffer solution for extraction]

If not opened, store at 2°C - 10°C. It maintains stability until expiration date. Once opened, we recommend using them as soon as possible to avoid influence by environmental condition.

[(D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution]

Unused working solution (already diluted) should be disposed.

[(H) Stop Solution]

Close the stopper tightly and store at 2°C - 10°C. It maintains stability until expiration date.

[(I) Wash Solution (10 \times)]

The rest of undiluted buffer : if stored tightly closed at 2°C - 10°C, it is stable until expiration date.

Dispose any unused diluted buffer.

6. Equipments or supplies required but not supplied ☐ Use as a check box

- ☐ Deionized water (or Distilled water) ☐ Test tubes for preparation of standard solution series.
- ☐ Glassware for dilution of Wash Solution (10 \times) (a graduated cylinder, a bottle)
- ☐ Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 10 μ L - 50 μ L precisely, and another for 50 μ L - 500 μ L.
- ☐ Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipipette plus which can dispense 100 μ L.
- ☐ Paper towel to remove washing buffer remaining in wells. ☐ A vortex-type mixer.
- ☐ A shaker for 96 well-plate (600 rpm - 1200 rpm) ☐ An automatic washer for 96 well-plate (if available), or a wash bottle

with a jet nozzle (refer to our web movie [Washing of microplate]).

☐ A 96 well-plate reader (450 nm \pm 10 nm, 620 nm : 600 nm - 650 nm) ☐ Software for data analysis.

7. Preparation of samples

- Perform pretreatment (extraction) of the collected assay sample using (G) Buffer solution for extraction.

Dilute the collected assay sample 20 folds (W/V) with (G) Buffer solution for extraction, and stir at room temperature for 30 minutes. Then, remove insoluble matters from the diluted assay sample with centrifugal filtration tube (0.45 μ m) or centrifugation, and use the clarified sample as the extracted sample. Dilute the extracted sample with (C) Buffer so that the result can fall within the standard curve, and use 100 μ L of the diluted extracted sample for each well.

* To collect the sample, use commercially available collection filter, etc.

(no filters for sample collection supplied in this kit)

Make sure to dilute samples more than 1 : 10. Dilution should be carried out with the (C) Buffer solution of the kit using small test tubes before assay.

Example of dilution :	Rate	1 : 10	1 : 100	1 : 200	1 : 400	...
Extracted sample :		50 μ L	* 50 μ L	* 250 μ L	* 250 μ L	
(C)Buffer :		450 μ L	450 μ L	250 μ L	250 μ L	

*one rank higher diluted sample

[Handling of samples]

- For extraction of samples, use of (G) Buffer solution for extraction supplied in this kit is recommended.
- Samples should be diluted with (C) Buffer before use. Sample dilution should be carried out with the (C) Buffer using small test tube such as PP, PE or glass, before assay.
- Turbid samples or ones containing insoluble matters should be clarified before use.
- Either (G) Buffer solution for extraction supplied in this kit or the extraction method described here, or both do not guarantee complete extraction for all the samples.
- For samples diluted without using (G) Buffer solution for extraction supplied in this kit, effects of interfering substances should be checked.
- If presence of interfering substance is suspected, linearity of dilutions should be confirmed using at least 2 different dilution levels.

[Storage of samples] [Storage and stability]

- Use extracted samples for measurement as soon as possible. Freeze the extracted samples at -20°C or lower for long-term storage. Repeated freezing and thawing should be avoided. Extracted samples should be immediately assayed or stored below -20°C for several days. If you have to store assay samples for a longer period, snap-freeze samples and keep them below -20°C . Defrosted samples should be mixed thoroughly for best results. Avoid repeated freezing and thawing.

8. Preparation of Reagents

- Bring all reagents of the kit to room temperature (20°C - 25°C) before use.
- Prepare reagent solutions in appropriate volume for your assay. Do not store the diluted reagents.

[Concentrated reagents]

[(B) Der f 2 Standard (500 ng/mL)]

Make a serial dilution of original standard solution to prepare each standard solution. An example is shown below.

Volume of standard solution	(C) Buffer	Concentration (ng/mL)
Original solution : 50 μ L	450 μ L	50
50 ng/mL solution : 250 μ L	250 μ L	25
25 ng/mL solution : 250 μ L	250 μ L	12.5
12.5 ng/mL solution : 250 μ L	250 μ L	6.25
6.25 ng/mL solution : 250 μ L	250 μ L	3.13
3.13 ng/mL solution : 250 μ L	250 μ L	1.56
1.56 ng/mL solution : 250 μ L	250 μ L	0.78
0 (Blank)	250 μ L	0

[(D) Peroxidase conjugated Antibody Solution]

Prepare working solution by dilution of (D) with the (C) Buffer to **1 : 100**.

[(I) Wash Solution (10×)]

Dilute 1 volume of the concentrated (I) Wash Solution (10×) to **10 volume** with deionized water (or distilled water) to prepare working solution. Example : 100 mL of concentrated (I) Wash Solution (10×) and 900 mL of deionized water (or distilled water).

9. Assay procedure

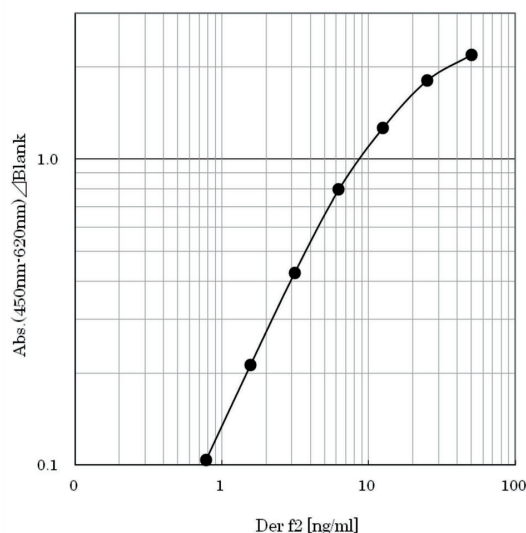
Remove the cover sheet of the Antibody-coated Plate after bringing up to room temperature.

- (1) Wash the Antibody-coated Plate (A) by filling the well with washing buffer and discard 3 times (*①), then strike the plate upside-down onto several sheets of paper towel to remove residual buffer in the wells.
- (2) Pipette 100 μ L of diluted samples to the designated sample wells.
- (3) Pipette 100 μ L of standard solution to the wells designated for standards.
- (4) Shake the plate gently on a plate shaker (*②)
- (5) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate for 1 hour at 20°C - 25°C.
- (6) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (7) Pipette 100 μ L of Peroxidase-conjugated Antibody Solution to all wells, and shake as step (4).
- (8) Stick a plate seal (*③) on the plate and incubate the plate for 1 hour at 20°C - 25°C.
- (9) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (10) Pipette 100 μ L of TMB solution to wells, and shake as step (4).
- (11) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate the plate for 20 minutes at 20°C - 25°C.
- (12) Add 100 μ L of the Stop Solution to all wells and shake as step (4).
- (13) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620 nm*) using a plate reader within 30 minutes.

*Refer to 12. Summary of Assay Procedure for notes on *①, *② and *③.

10. Calculations

- (1) Prepare a standard curve using two-way logarithmic section paper by plotting absorbance (Y-axis) against standard concentration (ng/mL) on X-axis.
- (2) Using the standard curve, read the Der f 2 concentration of a sample at its absorbance, and multiply the assay value by dilution factor if the sample has been diluted. Though the assay range is wide enough, in case the absorbance of some samples is higher than that of the highest standard, please repeat the assay after proper dilution of samples with the buffer solution. We recommend the use of 3rd order regression curve for log-log plot, or 4 parameters method for log-normal plot in computer calculation.



11. Trouble shooting

- Low absorbance in all wells

Possible explanations :

- 1) The standard or samples might not be added.
- 2) Reagents necessary for coloration such as Peroxidase-conjugated Antibody Solution, or TMB Solution might not be added.
- 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of Biotin-conjugated Antibody Solution or Peroxidase-conjugated Antibody Solution.
- 4) Contamination of enzyme inhibitor(s).
- 5) Influence of the temperature under which the kits had been stored.
- 6) Excessive hard washing of the well plate.

7) Addition of TMB Solution soon after taking out from a refrigerator might cause poor coloration owing to low temperature.

- Blank OD is higher than that of the lowest standard concentration (0.78 ng/mL)

Possible explanations :

Improper or inadequate washing. (Change washing repetition from 3 times to 4 - 6 times after the reaction with Peroxidase-conjugated Antibody Solution.)

- High coefficient of variation (CV)

Possible explanation :

- 1) Improper or inadequate washing.
- 2) Improper mixing of standard or samples.
- 3) Pipetting at irregular intervals.

- Q-1 : Can I divide the plate to use it for the other testing?

A-1 : Yes, cut off the clear seal on the plate with cutter along strip. Put the residual plate, which is still the seal on, in a refrigerator soon.

- Q-2 : I found 96 well-plate is empty when I opened the box.

A-2 : As this kit is dried type.

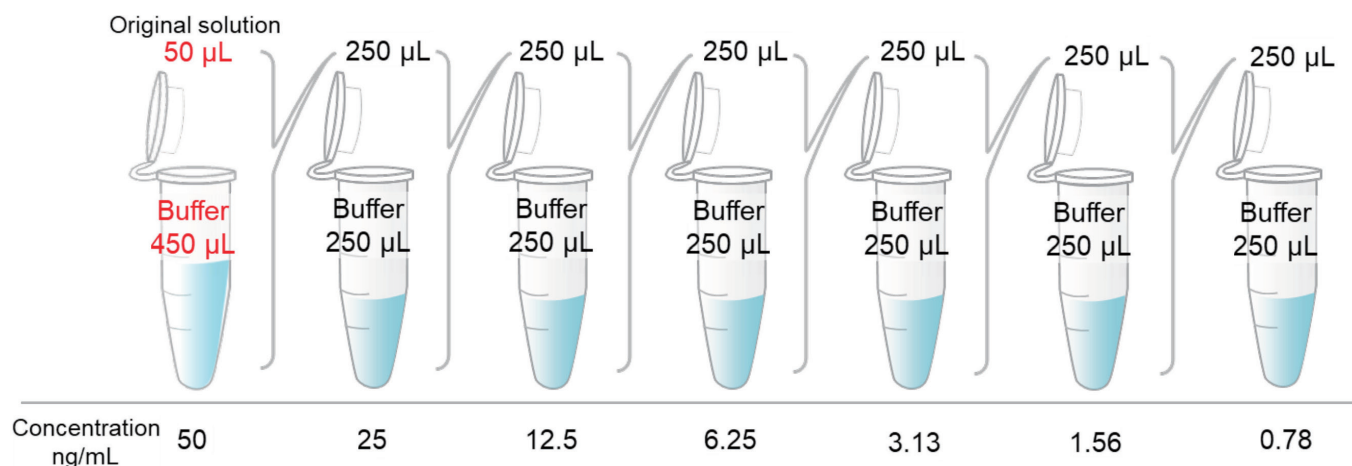
Summary of Assay Procedure ☐ : Use as a check box

*First, read this instruction manual carefully and start your assay after confirmation of details.

- ☐ Bring the well-plate and all reagents back to 20°C - 25°C for 2 hours.

- ☐ Wash Solution (10×) concentrate must be diluted to 10 times by deionized water (or distilled water) that returned to 20°C - 25°C.

- ☐ Der f 2 Standard dilution example :



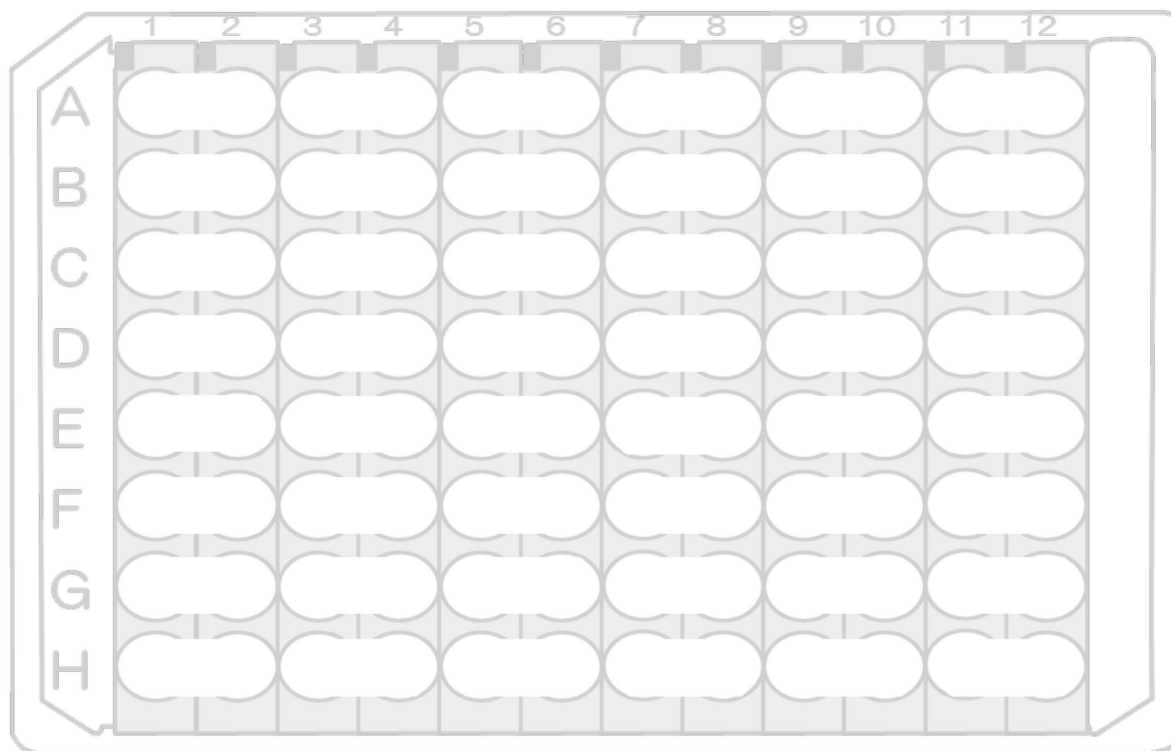
- ☐ Antibody-coated Plate
- ☐ ↓ Washing 3 times (*①) (*⑤)
- ☐ Diluted Samples or Standards 100 µL
- ☐ ↓ Shaking (*②), Incubation for 1 hour at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- ☐ Peroxidase-conjugated Antibody Solution (D) Dilute to 1 : 100 by using Buffer (C) and use. Dilute reagents during the first reaction.
- ☐ ↓ Washing 3 times (*②)
- ☐ Peroxidase-conjugated Antibody Solution 100 µL
- ☐ ↓ Shaking (*②), Incubation for 1 hour at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- ☐ ↓ Washing 3 times (*①) (*⑤)
- ☐ TMB Solution 100 µL
(After dispense, the color turns to blue depending on the concentration.)
- ☐ ↓ Shaking (*②), Incubation for 20 minutes at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- ☐ Stop Solution 100 µL
(After dispense, the color turns to yellow depending on the concentration.)
- ☐ ↓ Shaking (*②) (Immediately shake.)
- ☐ Measurement of absorbance (450 nm, Ref 620 nm (*④))
(Ref. wave cancels the dirt in the back of plate.)

- *① After dispensing wash buffer to wells, lightly shake the plate on your palm for 10 seconds and remove the buffer. Guideline of washing volume : 300 μ L/well for an automatic washer and for a pipette if the washing buffer is added by pipette. In case of washing by using 8 channel pipette, sometimes the back ground tends to be high. If so, change washing frequency from 3 times to 4 - 6 times at the constant stroke after the reaction with Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution.
- Standard of plate-washing pressure: 5 mL/min - 25 mL/min. (Adjust it depending on the nozzle's diameter.)
- *② Guideline of shaking : 600 rpm - 1200 rpm for 3 times for 10 seconds.
- *③ Seal the plate during the reaction after shaking. Peel off the protective paper from the seal and stick the seal on the plate. Do not reuse the plate seal used once.
- *④ 600 nm - 650 nm can be used as reference wavelength.
- *⑤ After removal of wash buffer, immediately dispense the next reagent.

Worksheet example

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	50 ng/mL	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
B	25 ng/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
C	12.5 ng/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
D	6.25 ng/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
E	3.13 ng/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
F	1.56 ng/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
G	0.78 ng/mL	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39
H	0 (Blank)	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32	Sample 40

Assay worksheet



LBIS™ Der f 2 ELISA Kit

- [Storage] Store the kit at 2°C - 10°C (Do not freeze).
- [Expiration data] Indicated on the container.
- [Package] For 96 tests
- [Cat #] 290-86901

レビス™ Der f 2 ELISA キット

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 farina*) の Der f 2 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下さい。

◆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 f 2 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 f 2 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 TMB 溶液と反応させます。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 450nm (副波長 620nm) で比色測定されます。吸光度は Der f 2 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. キットの性能

- ・測定範囲
0.78ng/mL ~ 50ng/mL の範囲で測定できます。
- ・特異性
ペルオキシダーゼ結合抗体はコナヒョウヒダニの Der f 2 を特異的に認識します。Der f 1 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 2 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 R^2 は 0.9959 と 0.9996

4. 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 法の研修を修了した方、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ッ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充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。
- ・標準溶液、試料はアレルゲン性があるものとして充分注意して取り扱って下さい。
- ・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。
- ・試薬類は口でピペッティングしないで下さい。
- ・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内温度) を厳守して下さい。また、風速 (エアコンの風も含む)：0.4m/sec 以上、湿度 30% 未満の環境下での測定は避けて下さい。やむを得ず、測定操作を風速：0.4m/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下さい。
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下さい。
- ・検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけて下さい。1ウェル / 1チップのご使用をお勧めします。

5. 構成品

構 成 品	状 態	容 量
(A) 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12) / 1 枚
(B) Der f 2 標準品	希釈後使用	200 μ L / 1 本
(C) 緩衝液	そのまま使用	60mL / 1 本
(D) ペルオキシダーゼ結合抗体溶液	希釈後使用	200 μ L / 1 本
(F) TMB 溶液	そのまま使用	12mL / 1 本
(G) 抽出用緩衝液	そのまま使用	100mL / 1 本
(H) 反応停止液	そのまま使用	12mL / 1 本
(I) 洗浄液 (10×)	希釈後使用	100mL / 1 本
(J) プレートシール	-	3 枚

【試薬の安定性と保存方法】

(A) 抗体固相化プレート

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パックに戻し、そのまま 2℃～10℃で保存して下さい。

(B) Der f 2 標準品 (500ng/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℃～10℃で保存して下さい。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。

(C) 緩衝液、(F) TMB 溶液 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℃～10℃で保存して下さい。

(D) ペルオキシダーゼ結合抗体溶液

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ないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(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℃～10℃で保存して下さい。

(I) 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。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

6. 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・ピーカー・瓶）
- ☐ チップ交換型ピペット（使い捨てチップで 10 μ L ～ 50 μ L を正確にピペッティングできるもの、及び 50 μ L ～ 500 μ L 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 μ 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 600rpm ～ 1200rpm）
- ☐ 96 ウェルプレート用洗浄機（あれば好ましい）または噴射ビン
- ☐ 96 ウェルプレートリーダー（450nm \pm 10nm、620nm：600nm ～ 650nm）
- ☐ データ計算用ソフトウェア

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）を行って下さい。

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 μ m）、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 μ L / ウェル用いて下さい。

(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下さい（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下さい。（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
(C) 緩衝液	450 μ L	450 μ L	250 μ L	250 μ L

註) *ひとつ低倍率の希釈検体

- ・別売りの精製ダニ抗原 Der f 2 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下さい。

【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下さい。
- ・濁り及び不溶解物のある検体は除去後、測定に使用して下さい。
- ・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下さい。

【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下さい。また、長期保存する場合は -20°C 以下で凍結保存して下さい。但し、繰り返しの凍結融解は避けて下さい。

【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下さい。

8. 試薬の調製

- *キットの試薬は使用前に必ず室温 ($20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$) に戻して下さい (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下さい。
- *測定に必要な分だけ試薬を調製して下さい (ご不明な際にはお問い合わせ下さい)。

【濃縮された試薬類】

[(B) Der f 2 標準品 (500ng/mL)] ; 標準曲線作成用

- (B) Der f 2 標準品 (500ng/mL) (原液) と (C) 緩衝液を使って標準溶液を調製して下さい。
下記は一例です。

標準溶液の容量	(C) 緩衝液	濃度 (ng/mL)
標準溶液原液 50 μ L	450 μ L	50
50ng/mL 溶液 250 μ L	250 μ L	25
25ng/mL 溶液 250 μ L	250 μ L	12.5
12.5ng/mL 溶液 250 μ L	250 μ L	6.25
6.25ng/mL 溶液 250 μ L	250 μ L	3.13
3.13ng/mL 溶液 250 μ L	250 μ L	1.56
1.56ng/mL 溶液 250 μ L	250 μ L	0.78
0 (Blank)	250 μ L	0

[(D) ペルオキシダーゼ結合抗体溶液]

200 μ L 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** に希釈して下さい。

[(I) 洗浄液 (10 \times)]

洗浄液 (10 \times) を室温化された精製水 (蒸留水) で **10 倍** に希釈して下さい。

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)

9. 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下さい。

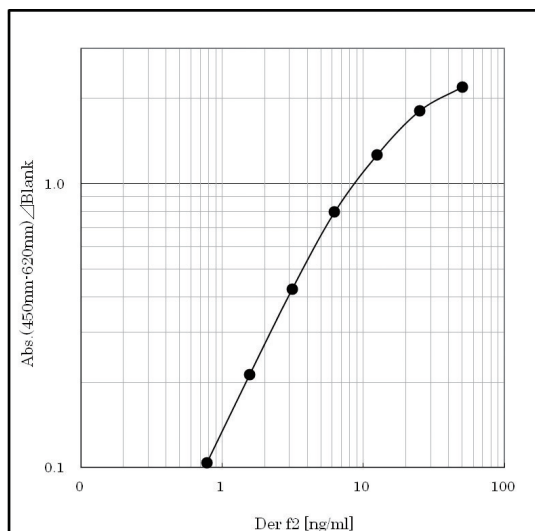
抗体固相化プレートのシールは、プレートが十分に室温に戻ってから剥がして下さい。

- (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) 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 ($20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$) 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) 各ウェルにペルオキシダーゼ結合抗体溶液を 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。
 - (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 TMB 溶液を 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、直ちにマイクロプレート用分光光度計で 450nm（副波長 620nm）での吸光度を測定します。副波長は 600nm～650nm の範囲で使用できます。
- （＊①）、（＊②）、（＊③）は、12. 測定手順概要とチェックリストをご参照下さい。

10. 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下さい。
 - (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下さい。
- ＊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。



＊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。）

11. トラブルシューティングと Q&A

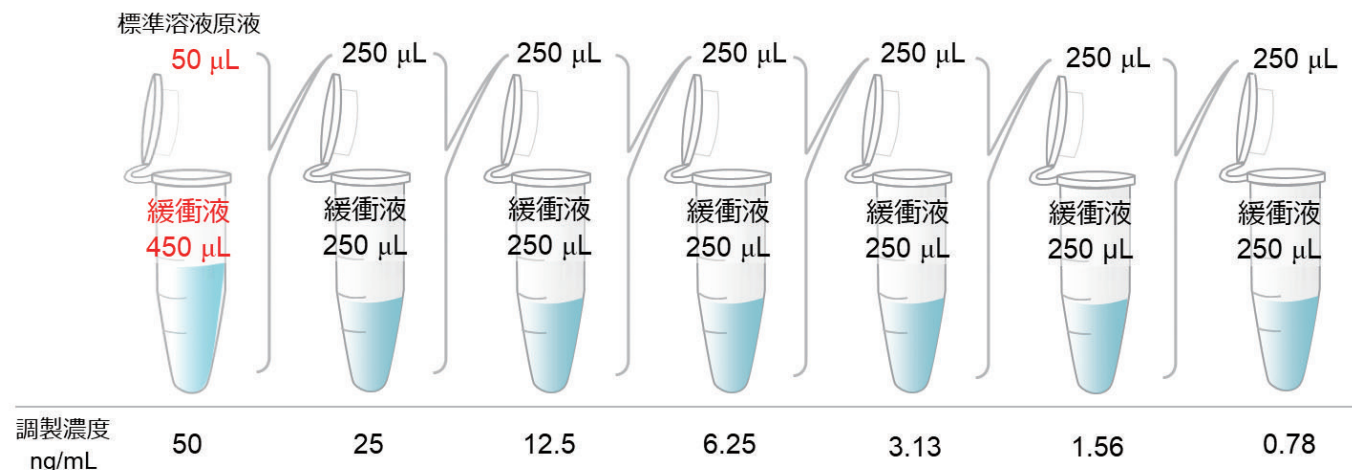
- ・すべてのウェルでの反応が弱い
原因として考えられること
 - 1) 標準品や検体の入れ忘れ。
 - 2) 発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
 - 3) 発色に関連する試薬溶液の取り違いや希釈調製不良。
 - 4) 酵素阻害剤の混入。
 - 5) キット保管温度の影響（凍結した場合）。
 - 6) プレートの過剰な洗浄。
 - 7) TMB 溶液の温度が低かった。
- ・最小標準溶液濃度（0.78ng/mL）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。
原因として考えられること
洗浄が不適当、不完全であった。
（ペルオキシダーゼ標識物と反応後の洗浄回数3回を同じ流速で4回～6回に増やして下さい。）
- ・変動係数（CV）が大きい
原因として考えられること
 - 1) 洗浄が不適当、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下さい）。
 - 3) ピペッ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下さい。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下さい。
- ・ 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。

12. 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下さい。

- ☐ ウェルプレート、試薬類を十分に室温（20℃～25℃）に戻して下さい。**室温化には2時間位必要**
- ☐ (I) 洗浄液（10×）の希釈：室温化された精製水で、**10倍**に希釈して下さい。
- ☐ 標準品の希釈（例）：室温化された（C）緩衝液で、希釈して下さい。



各操作注意事項並びに関連情報

- | | |
|---|--------|
| <input type="checkbox"/> 抗体固相化プレート（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 2 標準品 | 100 µL |
| <input type="checkbox"/> ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、1 時間反応、静置 | *② *③ |
| <input type="checkbox"/> ペルオキシダーゼ結合抗体溶液の希釈。室温化された（C）緩衝液で 100 倍 に希釈して下さい。
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"/> ペルオキシダーゼ結合抗体溶液 | 100 µL |
| <input type="checkbox"/> ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、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 TMB 溶液分注） | *① |
| <input type="checkbox"/> TMB 溶液 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℃）、20 分間反応、静置 | *② *③ |
| <input type="checkbox"/> 反応停止液 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 |
| <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 450nm、副波長 620nm：600nm～650nm）
副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします | |

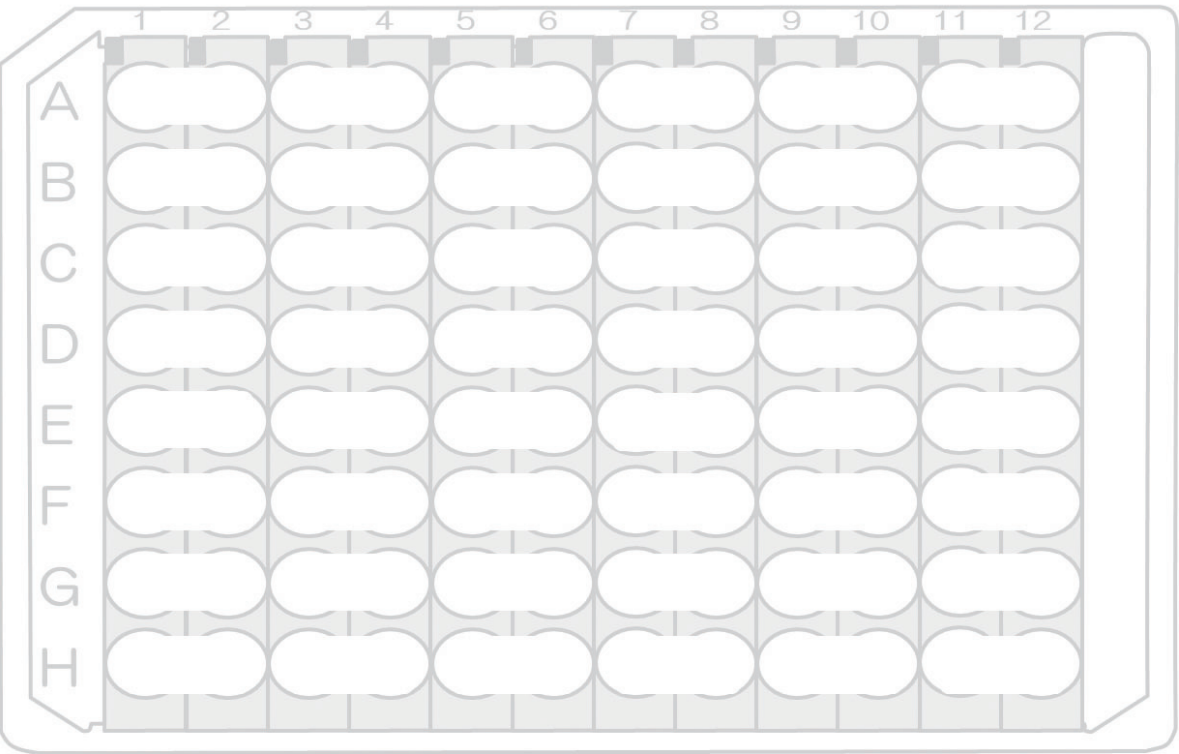
（*①）洗浄液をウェルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。3 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後の乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300 µL / ウェルです。万一、最小標準溶液濃度（0.78ng/mL）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる場合は解決方法の 1 つとして、ペルオキシダーゼ結合物と反応後の洗浄回数 3 回を同じ流速で 4 回～6 回に増やして下さい。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5mL / 分～25mL / 分（ノズルの径により異なります）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下さい。

（*②）攪拌の目安は 600rpm～1200rpm-10 秒間、3 回。

(※③) 攪拌終了後プレートシールを貼って静置して下さい。
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。

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



13. キットの保存と使用期限

キットは2℃～10℃で保存して下さい（凍結厳禁）。使用期限の過ぎた試薬は使用しないで下さい。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。

【測定名】	
【所属】	
【測定者】	【測定日】
【ロット番号】	【使用期限】
【備考】	

【製品名】	レビス TM Der f 2 ELISA キット
【和光コード】	290-86901
【英語表記】	LBIS TM Der f 2 ELISA Kit
【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