FUJIFILM

Wako

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Code No. 295-97701 (96 tests)

Mature BDNF ELISA Kit *Wako*

1. Introduction

This ELISA kit is designed for quantitative determination of mature BDNF (mBDNF).
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a member of NGF family of neurotrophic factors. It is known that BDNF is involved in neurogenesis and synaptogenesis. Therefore, BDNF is expected as biomarker for diseases of nervous system. BDNF also has relation to heart failure and heart disease. As above, BDNF is a subject of study in various studies. BDNF has precursor termed proBDNF, which is converted to mBDNF through the proteolytic removal of the N-terminal fragment by specific protease. It is reported that there are different functions between mBDNF and proBDNF. Mature BDNF ELISA Kit *Wako* can specifically detect mBDNF.

2. Assay Principle

The microplate is coated with anti-mature BDNF monoclonal antibody. In each well, the standard solution or sample and biotin-conjugated anti-mature BDNF monoclonal antibody are incubated to proceed with the antigen-antibody reaction. Furthermore, peroxidase-conjugated streptavidin is added to proceed with the biotin-streptavidin binding. Finally, peroxidase activity in each well is Code No. 295-97701 Mature BDNF ELISA Kit *Wako* measured to determine mature BDNF in the sample.

3. Kit Performance

Calibration curve range	4.1 - 1,000 pg/mL
Analyte	Mature BDNF*
Sample	Human : Serum, Plasma (EDTA)
Sample amount required	Human serum : 5 μL (as diluted 20-fold) Human plasma (EDTA) : 10 μL (as diluted 10-fold) (Measurable at n=2)
Assay time	Approx. 4 hours
Detection method	Colorimetry
Measurement wavelength	450 nm/ Ref. 620 nm

* This kit has approximately 1.4% cross-reactivity to recombinant human proBDNF.

4. Precautions for Use

1. It is important to bring the kit reagents to room temperature (20 - 25℃) before use (approximately 2 hours).
2. Prepare the reagents to be used in the next step in advance, before starting each step.
3. Use this kit after completing training in ELISA methods or under the guidance of an instructor.
4. For manual measurements, individuals who have demonstrated consistent reproducibility in pipette operation should perform the assay.
5. Wear gloves, glasses, and protective clothing during preparation and when using this kit.
6. Prevent reagents coming into contact with the skin. In the event the kit's reagents accidentally come into contact with eyes, mouth, wounds, skin, etc., immediately wash thoroughly with running water and seek medical attention from a physician if necessary.
7. Do not eat, drink, or smoke in the area where this kit is being used.
8. Handle samples with particular care as they may pose a risk of infection. This kit contains animal-derived components.
9. Dispose of used specimens, used reagents, consumables, and unused reagents in accordance with your institution's regulations and local laws and regulations.
10. Do not mix reagents from different lots.
11. It is important to cover the plate with a plate seal to prevent drying of the wells, contamination, temperature fluctuations, and evaporation of dispensed reagents during incubation at each step.
12. ELISA methods can be affected by the assay environment. Strictly adhere to the following : Room temperature should be 20 - 25℃ (on the bench or in the incubator) during operation and incubation. Do not perform the assay in environments with wind speeds (including air conditioning) exceeding 0.4 m/sec and humidity levels below 30%.

5. Material Supplied

5-1. Kit Components

Components	Use State	Amount
Antibody-coated Plate	Use after washing	96 wells (8×12)/1 plate
Mature BDNF Standard	Lyophilized/Use after reconstitution	1 bottle
Buffer	Ready-to-use	60 mL/1 bottle
Biotin-conjugated Antibody	Lyophilized/Use after reconstitution	1 bottle
Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Use after dilution	100 μL/1 bottle
TMB Solution	Ready-to-use	6 mL/1 bottle
Stop Solution	Ready-to-use	6 mL/1 bottle
Wash Solution (10×)	Use after dilution	100 mL/1 bottle
Plate Seal	Ready-to-use	4 sheets

5-2. Handling of Unused Reagents

When using the kit in divided portions, refer to the following for the stability and storage of unused reagents.
If unopened, they remain stable through the expiration date.

(1) Antibody-coated Plate
Antibody-coated Plate can be used in divided portions.
Unused antibody-coated strips should be returned into the zip-lock bag provided in the kit and stored at 2 - 10℃.

(2) Mature BDNF Standard
Store unused portion at 2 - 10℃.
Store the prepared standard stock solution (10 ng/mL) at 2 - 10℃, and use within 2 weeks.
Note : Do not store diluted standard solutions.

(3) Buffer
When using a portion of the solutions, transfer a slightly larger amount than necessary to separate containers. The remaining unused solutions should be tightly capped and stored at 2 - 10℃ immediately; do not bring them to room temperature.

(4) Biotin-conjugated Antibody
Store unused portion at 2 - 10℃.
Store the prepared Biotin-conjugated Antibody solution at 2 - 10℃, and use within 2 weeks.
Note : Do not store diluted Biotin-conjugated Antibody solutions.

(5) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution
When using the kit in divided portions, take out the solution from the refrigerator when ready to prepare dilutions.
The remaining undiluted solution should be tightly capped and stored at 2 - 10℃ immediately; do not bring it to room temperature. Discard the remaining diluted solution after use.

(6) TMB Solution
When using a portion of the solutions, transfer a slightly larger amount than necessary to separate containers. The remaining unused solutions should be tightly capped and stored at 2 - 10℃ immediately; do not bring them to room temperature.

(7) Stop Solution
When using a portion of the solutions, transfer a slightly larger amount than necessary to separate containers. The remaining unused solutions should be tightly capped and stored at 2 - 10℃ immediately ; do not bring them to room temperature.

(8) Wash Solution (10×)
When storing the Wash Solution (10×), close the lid tightly, and store at 2 - 10℃. Discard the remaining diluted solution after use.

6. Apparatus, Equipment, and Materials Required

☐ Purified water (distilled water)
☐ Tubes for dilution of standard solutions and samples
☐ Glassware for dilution of Wash Solution (graduated cylinders, beakers)
☐ Micropipettes (for 10 μL disposable tips and 200 to 500 μL disposable tips)
☐ Continuous dispensing pipette, capable of dispensing 100 μL continuously (preferred if available)
☐ Paper towels or other absorbent material (to remove liquid left on the plate after washing)
☐ Vortex-type mixer
☐ Microplate shaker (range approx. 600 to 800 rpm)
☐ Automatic washer for 96-well plate (if available) or washing bottle

☐ Microplate reader for 96-well plates (for absorbance measurement)
☐ Software for data processing

7. Sample Preparation

7-1. Recommendations and Precautions Before Sample Preparation

● Sample storage
・For long-term storage, stored at -35℃ or below is recommended. Avoid repeated freezing and thawing.
・Frozen samples should be thawed just before the assay and thoroughly mixed.
● Sample dilution
・Use test tubes (PP, PE) to dilute the samples.
・Please dilute the sample before the following preparation process (7-2. Sample Preparation).
● Other issues
・When turbidity or insoluble materials are present in the samples, remove them by centrifugation or other methods before the assay.
・If it is suspected that the sample contains an interfering substance, perform a dilution linearity check with two or more different dilutions of the same sample.

7-2. Sample Preparation

Serum : Dilute 20 to 100-fold with Buffer provided in the kit and measure.
Plasma (EDTA) : Dilute 10 to 50-fold with Buffer provided in the kit and measure.

8. Reagent Preparation

Reagents in the kit must be brought to room temperature (20 - 25℃) before use (approximately 2 hours).

8-1. Preparation of Standard Solution

Reconstitute Mature BDNF Standard with purified water in the amount specified in "Reconstitution of standard"* to prepare the original standard solution (10 ng/mL). Then prepare a dilution series using the Buffer included in the kit that has been allowed to warm up to room temperature.

*Find and check "Reconstitution of standard" on this product page. As the amount of purified water to be added varies by lot, be sure to check it for every lot.

Examples :

Concentration (pg/mL)	Volume of the standard solution	Volume of Buffer
1,000	Standard stock solution : 30 μL	270 μL
400	1,000 pg/mL solution : 100 μL	150 μL
160	400 pg/mL solution : 100 μL	150 μL
64	160 pg/mL solution : 100 μL	150 μL
25.6	64.0 pg/mL solution : 100 μL	150 μL
10.2	25.6 pg/mL solution : 100 μL	150 μL
4.10	10.2 pg/mL solution : 100 μL	150 μL
0 (B_0)	–	150 μL

8-2. Biotin-conjugated Antibody Solution

Before starting the procedure, dissolve the lyophilized product in 100 μL of purified water and dilute the required amount 100-fold with Buffer.
The stock solution after dissolution can be stored at 2 - 10℃ for up to 2 week.
Discard any remaining diluted solutions.

8-3. Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

During the 1 hour competitive reaction, dilute 100-fold with room temperature Buffer.

8-4. Wash Solution (10×)

Wash Solution (10×) is diluted 10-fold with purified water (distilled water).
(e.g.) When solution for 96-well reaction is prepared.
Add 100 mL of Wash Solution (10×) to 900 mL of purified water (distilled water) to prepare 1,000 mL of Wash Solution (10×).

・Other reagents are ready-to-use.

9. Assay Procedure

・Prepare the reagents to be dispensed in the next step before starting each step.
・For dispensing reagents in steps (2), (3), (7), (10), (14) and (17), continuous dispensing using a multichannel pipette is recommended.

(1) Fill each well of the Antibody-coated Plate with the diluted Wash Solution and remove. Repeat 4 times. Then, turn the plate upside down on a paper towel and gently tap to remove any remaining liquid in the wells.
(2) Dispense 50 μL of the standard solution at each concentration to each well for standard measurement.
(3) Dispense 50 μL of the sample, previously diluted with Buffer in the optimum ratio, to each sample measurement well.
(4) Agitate the plate using a microplate shaker.
Note : Shaking conditions: 600 - 800 rpm for 10 seconds.
Repeat 3 times.
After each cycle of shaking, stop and then restart again.
(5) Cover with a Plate Seal.
Incubate at room temperature (20 - 25℃) for 2 hours without shaking.
Note : Peel the protective paper off the plate seal and seal with the adhesive side facing the plate.
Do not reuse a plate seal that has already been used.
(6) After the reaction is complete, remove the reaction mixture and fill each well with Wash Solution and wash 4 times. Then, turn the plate upside down on a paper towel and gently tap to remove any remaining liquid in the wells.
(7) Dispense 50 μL of diluted Biotin-conjugated Antibody Solution to each well.
(8) Agitate the plate using a microplate shaker.
Note : Shaking conditions: 600 - 800 rpm for 10 seconds.
Repeat 3 times.
After each cycle of shaking, stop and then restart again.
(9) Cover with a Plate Seal.
Incubate at room temperature (20 - 25℃) for 1 hour without shaking.
Note : Peel the protective paper off the plate seal and seal with the adhesive side facing the plate.
Do not reuse a plate seal that has already been used.
(10) Dispense 100 μL of diluted Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to each well.
(11) Agitate the plate using a microplate shaker.
Note : Shaking conditions : 600 - 800 rpm for 10 seconds.
Repeat 3 times.
After each cycle of shaking, stop and then restart again.
(12) Cover with a Plate Seal.
Incubate at room temperature (20 - 25℃) for 30 minutes without shaking.
Note : Peel the protective paper off the plate seal and seal with the adhesive side facing the plate.
Do not reuse a plate seal that has already been used.
(13) After completion of the reaction, perform the washing procedure described in (6).
(14) Dispense 50 μL of TMB Solution to each well.
(15) Agitate the plate using a microplate shaker.
(16) Cover with a Plate Seal.
Incubate at room temperature (20 - 25℃) for 30 minutes without shaking.
Note : Peel the protective paper off the plate seal and seal with the adhesive side facing the plate.
Do not reuse a plate seal that has already been used.
(17) Dispense 50 μL of Stop Solution to each well.
(18) Measure the absorbance at 450 nm (reference wavelength : 620 nm) using a microplate reader after stirring microplate with microplate shaker. The range of 600 - 650 nm can be used as reference wavelength.

[Supplementary Notes]

Washing Procedure

For each wash, dispense the Wash Solution into the wells, then agitate gently by hand for 10 seconds and discard.
After 4 consecutive washes, place the plate upside down on a paper towel and tap to completely remove the Wash Solution.
After removing the Wash Solution, immediately dispense the next solution to prevent the wells from drying out. The recommended volume of Wash Solution to be dispensed is 300 μL/well.
If foam remains during washing, when manually washing using a wash bottle, allow the Wash Solution to overflow during the final cycle of washing to prevent the formation of foam.

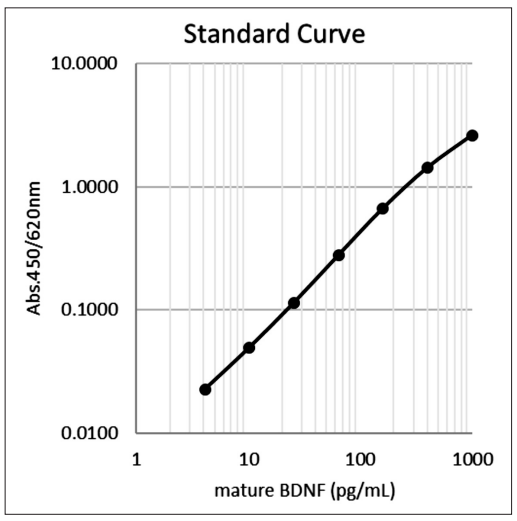
10. Calculation Method

(1) Create a standard curve by plotting the concentration of the standard solution (pg/mL) on the X-axis against the absorbance on the Y-axis.
(2) Read the concentration (pg/mL) corresponding to the absorbance of the diluted sample.
(3) Multiply the read concentration by the sample dilution factor to obtain the measured concentration.

[Note]

・For calculations using computer software, we recommend the use of a cubic polynomial, and 4 or 5 parameters.
・Sample values obtained using this kit can be converted to unit concentrations based on the NIBSC/WHO BDNF (code : 96/534) by multiplying by the conversion factor described in the separate sheet attached to the kit. The conversion factor may vary for each product lot, so please check the conversion factor specified for each product lot before calculating.

11. Typical Standard Curve



12. Assay Procedure Summary

Ensure that you read the instruction manual and check the sample conditions, assay conditions, and assay procedure before beginning the assay.

☐ Plates and reagents must be brought to room temperature (20 to 25℃) before use (approximately 2 hours).
☐ Dilution of Wash Solution (10×) : Dilute 10-fold with purified water pre-equilibrated to room temperature.
☐ Preparation of Standard Solution (e.g.) :
Reconstitute Mature BDNF Standard with purified water in the amount specified in "Reconstitution of standard"* to prepare the original standard solution (10 ng/mL). Then prepare a dilution series using the Buffer included in the kit that has been allowed to warm up to room temperature.
*Find and check "Reconstitution of standard" on this product page. As the amount of purified water to be added varies by lot, be sure to check it for every lot.
The following is an example.

Dilution example

Conc. (pg/mL)		1000	400	160	64.0	25.6	10.2	4.10	0
Standard (μL)	Stock solution:	30	100*	100*	100*	100*	100*	100*	—
Buffer (μL)		270	150	150	150	150	150	150	150

* : Standard solution at 1 step higher concentration

☐	**Antibody-coated Plate**	
☐	↓ Wash 4 times (*①)	
☐	**Sample or standard solution**	**50 μL/well**
☐	↓ Agitate using a microplate shaker (*②), room temperature (20 - 25℃) for 2 hours (*③)	
☐	＊Preparation of Biotin-conjugated Antibody solution (dissolve in 100 μL of purified water, and dilute 100-fold with Buffer, previously adjusted to room temperature)	
☐	↓ Wash 4 times (*①)	
☐	**Biotin-conjugated Antibody solution**	**50 μL/well**
☐	↓ Agitate (*②) and incubate at room temperature (20 - 25℃) for 1 hour (*③)	
☐	＊Preparation of Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution (dilute 100-fold with Buffer, previously adjusted to room temperature)	
☐	↓ Wash 4 times (*①)	
☐	**Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution**	**50 μL/well**
☐	↓ Agitate (*②) and incubate at room temperature (20 - 25℃) for 30 minutes (*③)	
☐	↓ Wash 4 times (*①)	
☐	**TMB Solution**	**50 μL/well**
☐	↓ Agitate (*②) and incubate at room temperature (20 - 25℃) for 30 minutes (*③)	
☐	**Stop Solution**	**50 μL/well**
☐	↓ Agitate (*②)	
☐	**Measure absorbance at 450 nm (Reference wavelength 620 nm : 600 - 650 nm)**	

(＊①) For each wash, dispense the Wash Solution into the wells, then agitate gently by hand for 10 seconds and discard. After 4 consecutive washes, place the plate upside down on a paper towel and tap to completely remove the Wash Solution. After removing the Wash Solution, immediately dispense the next solution to prevent the wells from drying out. The recommended volume of Wash Solution to be dispensed is 300 μL/well. If foam remains during washing, when manually washing using a wash bottle, allow the Wash Solution to overflow during the final cycle of washing to prevent the formation of foam.

(＊②) Shaking should be done at 600 - 800 rpm for 10 seconds. Repeat 3 times.

(＊③) After shaking is complete, cover with a plate seal and incubate without shaking. Peel the protective paper off the plate seal and seal with the adhesive side facing the plate. Do not reuse a plate seal that has already been used.

Mature BDNF ELISA Kit *Wako*

[Storage] Store at 2℃ - 10℃ (Do not freeze).

[Expiration date] Indicated on the label.

[Package] For 96 tests

[Cat #] 295-97701

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

Group Companies Distributors

本品は研究用試薬です。体外診断用として使用できません。

Code No. 295-97701（96回用）

Mature BDNF ELISA キットワコー

1. はじめに

本キットは、Mature BDNF（mBDNF）を定量的に測定するための ELISA キットです。
Brain-derived neurotrophic factor（BDNF）は神経栄養因子のひとつで、神経発生・神経保護作用・シナプス形成などに関与し、脳内で重要な役割を担うことが知られています。そのことから、うつ病をはじめとした精神疾患マーカーとなることが期待されています。また神経関連のみならず、心不全などの心疾患などにも関連することが報告されており、幅広い分野で研究のターゲットとなっています。BDNF には前駆体である proBDNF が存在し、proBDNF はプロセシングを受けることで mBDNF となります。proBDNF と mBDNF は異なる作用を有することが報告されています。本品は検体中の mBDNF 濃度を特異的に測定可能な ELISA キットです。

2. 測定原理

測定プレートの各ウェルには抗 mBDNF 抗体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反応させます。次に、ビオチン標識抗 mBDNF 抗体を入れて反応させます。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 mBDNF の濃度を求めることができます。

3. キット性能

検量線範囲	4.1 ～ 1,000pg/mL
測定対象	Mature BDNF *
測定対象検体	ヒト血清・血漿
必要検体量	ヒト血清：5 μL（20 倍希釈時） ヒト血漿（EDTA）：10 μL（10 倍希釈時） （n＝2 で測定可能な量）
測定時間	約 4 時間
検出法	発色系
測定波長	主波長 450nm/ 副波長 620nm

＊ リコンビナント human proBDNF に対して約 1.4% の交差反応性を示します。

4. 使用上の注意

1. キットの試薬は使用前に必ず室温（20 ～ 25℃）に戻して下さい（約 2 時間程度）。
2. 各操作を始める前に、次の操作で使用する試薬を前もって用意して下さい。
3. 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。
4. 用手法で測定する際には、ピペット操作の再現性が安定した方がご使用下さい。
5. 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。
6. 試薬類を皮膚に付着させないで下さい。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。
7. 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。
8. 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。
9. 使用済みの検体､使用した消耗品等は 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。
10. ロット番号の違う試薬と混ぜて使わないで下さい。
11. 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ため、必ずプレートシールを貼って下さい。
12. 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。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。

5. キット内容

5-1. キット構成品

構　成　品	状　態	容　量
抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells(8×12)／1 枚
Mature BDNF 標準品	凍結乾燥品・溶解後使用	1 本
緩衝液	そのまま使用	60mL ／ 1 本
ビオチン結合抗体	凍結乾燥品・溶解後使用	1 本
ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液	希釈後使用	100 μL ／ 1 本
TMB 溶液	そのまま使用	6mL ／ 1 本
反応停止液	そのまま使用	6mL ／ 1 本
洗浄液（10×）	希釈後使用	100mL ／ 1 本
プレートシール	そのまま使用	4 枚

5-2. 未使用の試薬の取扱い

キットを分割して使用される際、未使用の試薬の安定性と保存方法は、以下を参考にして下さい。

(1) 抗体固相化プレート
　プレートは分割使用可能です。
　未使用の抗体固相化ストリップはジップシールパックに戻し、2 ～ 10℃で保存して下さい。

(2) Mature BDNF 標準品
　未使用の場合、2 ～ 10℃で保存して下さい。
　調製後の標準品原液（10ng/mL）は、2 ～ 10℃で保存し、2 週間以内に使用して下さい。
　＊希釈調製後の各標準溶液は保存しないで下さい。

(3) 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て下さい。
　残りの未使用の溶液は、室温に戻さず直ちに蓋をしっかり閉め、2 ～ 10℃で保存して下さい。

(4) ビオチン結合抗体
　未使用の場合、2 ～ 10℃で保存して下さい。
　調製後のビオチン結合抗体原液は、2 ～ 10℃で保存し、2 週間以内に使用して下さい。
　＊希釈調製後の各標準溶液は保存しないで下さい。

(5) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液
　未使用の場合、2 ～ 10℃で保存して下さい。
　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。
　使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(6) TMB 溶液
　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て下さい。
　残りは、室温に戻さず直ちに蓋をしっかり閉め、2 ～ 10℃で保存して下さい。

(7) 反応停止液
　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て下さい。
　使用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。

(8) 洗浄液（10×）
　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. 器具及び装置

□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 μL を正確にピペッティングできるもの、及び 200 ～ 500 μL を正確にピペッティングできるもの）
□連続分注ピペット、100 μL を連続分注できるもの（あれば好ましい）
□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（吸光測定用）
□データ処理ソフトウェア

7. 検体の調製方法

7-1. 検体調製前の推奨・注意事項

●検体保管時

・長期に保管する場合は、－35℃以下での凍結保管を推奨します。なお、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充分に攪拌して下さい。

●検体希釈時

・希釈容器は、試験管（PP、PE）を用いて下さい。

・検体を希釈する際は、用時調製として下さい。

●その他

・濁り及び不溶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。

・妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、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。

7-2. 検体調製方法

血清サンプル：キット添付の緩衝液で 20 ～ 100 倍希釈し測定して下さい。

血漿（EDTA）サンプル：キット添付の緩衝液で 10 ～ 50 倍希釈し測定して下さい。

8. 試薬類の調製方法

キットの試薬は使用前に必ず室温（20 ～ 25℃）に戻して下さい（2 時間程度）。

8-1. 標準溶液

Mature BDNF 標準品に別紙記載の指定量*の精製水を加え溶解し、標準品原液（10ng/mL）を調製して下さい。

その後室温化されたキット添付の標準品検体調製液で各濃度の標準溶液を下記のように混合して、標準溶液を調製して下さい。

＊ロットにより精製水を添加する量が異なりますので、別紙に記載の指定量をご確認下さい。

下記は一例です。

濃度（pg/mL）	標準溶液の容量	緩衝液
1,000	標準品原液：30 μL	270 μL
400	1,000pg/mL 溶液：100 μL	150 μL
160	400pg/mL 溶液：100 μL	150 μL
64	160pg/mL 溶液：100 μL	150 μL
25.6	64pg/mL 溶液：100 μL	150 μL
10.2	25.6pg/mL 溶液：100 μL	150 μL
4.10	10.2pg/mL 溶液：100 μL	150 μL
0（B_0）	－	150 μL

8-2. ビオチン結合抗体溶液

操作を始める前に凍結乾燥品を 100 μL の精製水で溶解し、必要量を緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。

溶解後の原液は、2 ～ 10℃で 2 週間まで保存できます。

希釈溶液が残った場合は保存せず、廃棄して下さい。

8-3. ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

ビオチン結合抗体溶液を 1 時間反応させている間に、室温化させた緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。

8-4. 洗浄液（10×）

精製水（蒸留水）で 10 倍に希釈し使用して下さい。

・その他の試薬はそのまま使用します。

9. 測定操作

・各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。

・(2)、(3)、(7)、(10)、(14)、(17) の試薬分注操作は、マルチチャネルピペットでの連続分注を推奨します。

(1) 抗体固相化プレートを、あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし取り除く操作を 4 回実施します。
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 50 μL ずつ分注します。

(3) 検体測定ウェルに標準品検体調製液で希釈調製した測定用検体を 50 μL ずつ分注します。

(4) マイクロプレート振とう器を用いて軽く攪拌します。
＊攪拌：600 ～ 800rpm － 10 秒間／回を 3 回繰り返して下さい。

(5) プレートシールを貼り、室温（20 ～ 25℃）で 2 時間静置します。

＊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。

(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溶液を 50 μL ずつ分注します。

(8) マイクロプレート振とう器を用いて攪拌します。
＊攪拌：600 ～ 800rpm －10 秒間／回を 3 回繰り返して下さい。

(9) プレートシールを貼り、室温（20 ～ 25℃）で 1 時間静置します。
＊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。

(10) 各ウェルに調製したペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を 50 μL ずつ分注します。

(11) マイクロプレート振とう器を用いて攪拌します。
＊攪拌：600 ～ 800rpm －10 秒間／回を 3 回繰り返して下さい。

(12) プレートシールを貼り、室温（20 ～ 25℃）で 30 分間静置します。
＊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。

(13) 反応終了後、ステップ (6) の洗浄操作を行います。

(14) 各ウェルに調製し TMB 溶液を 50 μL ずつ分注します。

(15) マイクロプレート振とう器を用いて攪拌します。

(16) プレートシールを貼り、室温（20 ～ 25℃）で 30 分間静置します。
＊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。

(17) 各ウェルに反応停止液を 50 μL ずつ分注し、発色反応を停止します。

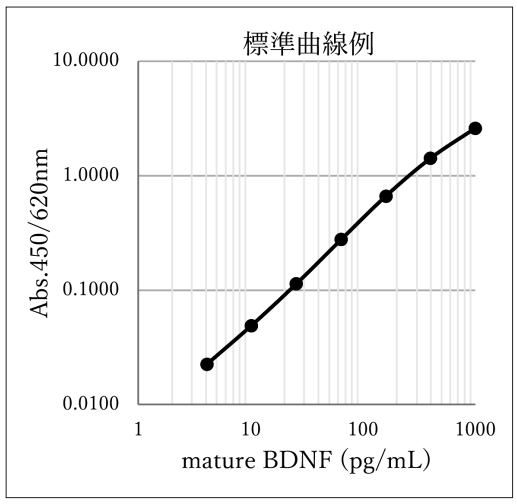
(18) 攪拌後マイクロプレート用分光光度計で 450nm（副波長 620nm）での吸光度を測定します。
副波長は 600 ～ 650nm の範囲で使用できます。

［操作補足］
<u>洗浄方法</u>
洗浄毎に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。
洗浄液除去後はウェルの乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300 μL/ウェルです。
洗浄時に泡が残る場合、洗瓶等のマニュアル洗浄であれば、最終回数の洗浄時のみ洗浄液をオーバーフローさせ、泡を回避する方法をお試し下さい。

10. 計算方法
(1) X 軸が標準溶液濃度（pg/mL）、Y 軸が吸光度の検量線を作成します。
(2) 検量線より、希釈検体の吸光度に対応する濃度（pg/mL）を読み取ります。
(3) 読み取った濃度に検体希釈率をかけて測定値とします。

［備考］
・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薦めします。
・本キットによって得られた測定値は、キット添付の別紙に記載の換算係数をかけることで NIBSC/WHO 標準品 BDNF（code：96/534）を基準にしたユニット濃度に換算することができます。換算係数は製品ロットごとに変動する場合がありますので、製品ロットごとに定められた換算係数を確認してから計算して下さい。

11. 標準曲線例



12. 測定手順概要

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。

□プレート、試薬類を充分に室温（20 ～ 25℃）に戻して下さい（約 2 時間）。

□洗浄液（10×）の調製：室温化された精製水で、10 倍に希釈して下さい。

□標準溶液の調製（例）：Mature BDNF 標準品（凍乾品）に精製水を別紙に記載の指定量*加え溶解し、標準品原液（10ng/mL）を調製して下さい。その後、室温化したキット添付の標準品検体調製液で調製して下さい。加える精製水の量は別紙をご参照下さい。

＊ロットにより精製水を添加する量が異なるため、別紙に記載の指定量をご確認下さい。
下記は一例です。

調製例	濃度(pg/mL)		1000	400	160	64.0	25.6	10.2	4.10	0
	標準溶液 (μL)	原液：	30	100*	100*	100*	100*	100*	100*	—
	緩衝液 (μL)		270	150	150	150	150	150	150	150

＊：ひとつ高濃度の標準溶液

□ **抗体固相化プレート**

□ ↓洗浄 4 回（*①）

□ **検体または標準溶液** **50μL/ウェル**

□ ↓マイクロプレート振とう機で攪拌（*②）、室温（20 ～ 25℃）で 2 時間反応、静置（*③）

□ ＊ビオチン結合抗体溶液の調製（精製水 100μL で溶解後、室温化した緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。）

□ ↓洗浄 4 回（*①）

□ **ビオチン結合抗体溶液** **50μL/ウェル**

□ ↓攪拌（*②）、室温（20 ～ 25℃）、1 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 倍に希釈して下さい）

□ ↓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** **50μL/ウェル**

□ ↓攪拌（*②）、室温（20 ～ 25℃）、30 分間反応、静置（*③）

□ ↓洗浄 4 回（*①）

□ **TMB 溶液** **50μL/ウェル**

□ ↓攪拌（*②）、室温（20 ～ 25℃）、30 分間反応、静置（*③）

□ **反応停止液** **50μL/ウェル**

□ ↓攪拌（*②）

□ **吸光度測定（主波長 450nm、副波長 620nm：600 ～ 650nm）**

（＊①）洗浄毎に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。洗浄液除去後はウェルの乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300 μL/ウェルです。洗浄時に泡が残る場合、洗瓶等のマニュアル洗浄であれば、最終回数の洗浄時のみ洗浄液をオーバーフローさせて泡を回避する方法をお試し下さい。
（＊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。

【製品名】　Mature BDNF ELISA キットワコー
【和光コード】　295-97701
【英語表記】　Mature BDNF ELISA Kit *Wako*
【貯法】　2 ～ 10℃で保存
【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
大阪市中央区道修町三丁目１番２号
Tel：06-6203-3741

2512KA1