

Caffeine ELISA Kit Wako

[1. Introduction]

Caffeine is a type of alkaloid found in coffee beans and tea leaves. It has excitatory effects on the central nervous system and can stimulate the motor center and medullary respiratory center. It also exhibits vasoconstrictive, cardiotonic, diuretic, and gastric secretion-promoting effects. Due to these properties, caffeine has been reported to be associated with various diseases including dementia, Parkinson's disease, migraines, and angina. This product is an ELISA kit that can measure caffeine in human saliva, serum or plasma and mouse/rat serum or plasma.

[2. Assay Principle]

Each well of the assay plate is coated with an anti-caffeine antibody.

A standard solution or a sample is added to a well along with peroxidase-conjugated caffeine, and the mixture is allowed to react.

Finally, by measuring the peroxidase activity (absorbance) in the well, the concentration of caffeine in the sample can be determined.

[3. Kit Performance]

Calibration curve range	0.244 ~ 1,000 ng/mL
Analyte	Caffeine
Sample	Mouse serum/plasma Rat serum/plasma Human saliva/serum/plasma (EDTA and Hep)
Sample amount required	55 μ L (2-fold dilution, duplicate)
Assay time	about 2 hours and 20 minutes
Detection method	Colorimetry
Measurement wavelength	450 nm/Ref, 620 nm

[4. Precautions for Use]

1. It is important to bring the kit reagents to room temperature (20-25°C) 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. Used specimens and consumables should be soaked in a sodium hypochlorite solution ($\geq 0.1\%$) for at least one hour, or autoclaved and disposed of. Used consumables and unused chemicals should be disposed of in accordance with the regulations of the facility and local laws.
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°C (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. Materials supplied]

5-1. Kit Components

Item	State	Amount
Antibody-coated Plate	Use after washing	96 wells (8 \times 12)/1 plate
Caffeine Standard	Use after preparation	100 μ L/1 vial
Buffer	Ready-to-use	60 mL/1 vial
Peroxidase-conjugated Caffeine Solution	Use after preparation	50 μ L/1 vial
TMB Solution	Ready-to-use	12 mL/1 vial
Stop Solution	Ready-to-use	12 mL/1 vial
Wash Solution (10 \times)	Use after preparation	100 mL/1 vial
Plate Seal	—	4 seals
Instruction Manual	—	1 copy

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
The 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°C.
- (2) Caffeine Standard
Store unused portion at 2-10°C.
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°C immediately ; do not bring them to room temperature.

(4) Peroxidase-conjugated Caffeine 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°C immediately ; do not bring it to room temperature.

Discard any remaining diluted solutions.

(5) TMB Solution

When using a portion of the solution, transfer a slightly larger amount than necessary to another container.

The remaining unused solutions should be tightly capped and stored at 2-10°C immediately ; do not bring them to room temperature.

(6) Stop Solution

Store remaining unused solution at 2-10°C.

(7) Wash Solution (10×)

Cap tightly and store at 2-10°C.

Discard any remaining diluted Wash Solution.

[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 μ L disposable tips and 200 to 500 μ L disposable tips)
- ☐ Continuous dispensing pipette, capable of dispensing 100 μ L 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]

As per the standard procedure, dilute the samples with the buffer solution provided in the kit and use for the assay.

It is recommended that you optimize the dilution ratio to fall within the range of standard curve concentrations.

Sample	Dilution ratio
Mouse serum/plasma	2-fold
Rat serum/plasma	
Human serum/plasma	
Human saliva	4-fold

Recommendations and precautions before sample preparation

- Sample collection
 - Samples should be human/mouse/rat serum and plasma

collected and separated according to the standard method.

- The passive drool method is recommended for the collection of saliva samples. (the passive drool method requires subjects to salivate into a vial or tube.)

It has been confirmed that samples collected using cotton swabs or inert polymer swabs can be used similarly to samples collected by the passive drool method.

Note : caution should be taken because some swab materials may absorb target analytes.

- Sample storage

- For long-term storage, samples should be frozen at -80°C or below. Avoid repeated freezing and thawing.

- Frozen samples should be thawed just before the assay and thoroughly mixed.

- Sample dilution

- Use the buffer solution provided in the kit as the dilution solvent.

- Use test tubes (PP, PE) to dilute the samples.

- Dilute the samples just before use.

- 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.

- When using a serum-separating agent, check for compatibility in advance.

- Do not use hemolyzed or high-lipid samples.

[8. Reagent Preparation]

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

8-1. Preparation of Standard Solution

Before starting the procedure, Prepare a caffeine standard stock solution (15 μ g/mL) with the buffer solution supplied with the kit pre-equilibrated to room temperature.

The following is an example.

Concentration (ng/mL)	Volume of Standard Solution	Buffer
1,000	Standard stock solution : 30 μ L	420 μ L
250	1,000 ng/mL Solution : 50 μ L	150 μ L
62.5	250 ng/mL Solution : 50 μ L	150 μ L
15.6	62.5 ng/mL Solution : 50 μ L	150 μ L
3.91	15.6 ng/mL Solution : 50 μ L	150 μ L
0.977	3.91 ng/mL Solution : 50 μ L	150 μ L
0.244	0.977 ng/mL Solution : 50 μ L	150 μ L
0.00 (B_0)	—	150 μ L

8-2. Peroxidase-conjugated Caffeine Solution

Dilute 10,000-fold with the buffer solution that has been equilibrated to room temperature.

Note : A two-step dilution is recommended.

8-3. Wash Solution (10×)

Before starting the procedure, dilute 10-fold with purified water (distilled water) that has been equilibrated to room temperature. Example : 100 mL of Wash Solution (10×) + 900 mL of purified water (distilled water) (when all 96 wells are used)

- 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), (9), and (12), 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 four times.
Then, turn the plate upside down on a paper towel and gently tap to remove any remaining liquid in the wells.
Note : Steps (2) through (5) below should be completed within 30 minutes.
- (2) Dispense 50 μL of diluted Peroxidase-conjugated Caffeine Solution into each well.
- (3) Gently agitate the plate using a microplate shaker.
Shaking conditions : 600-800 rpm for 10 seconds. Repeat 3 times.
After each cycle of shaking, stop and then restart again.
- (4) Dispense 50 μL each of diluted standard solutions into the wells designated for standards.
- (5) Dispense 50 μL each of diluted samples into the wells designated for samples.
- (6) Agitate the plate using a microplate shaker.
Shaking conditions : 600-800 rpm for 10 seconds. Repeat 3 times.
After each cycle of shaking, stop and then restart again.
- (7) Cover with the plate seal and incubate at room temperature (20-25°C) 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.
- (8) 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.
- (9) Dispense 100 μL of TMB solution pre-equilibrated to room temperature into each well.
- (10) Agitate the plate using a microplate shaker.
Shaking conditions : 600-800 rpm for 10 seconds. Repeat 3 times.
After each cycle of shaking, stop and then restart again.
- (11) Cover with the plate seal and incubate at room temperature (20-25°C) for 20 minutes.
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.
- (12) Dispense 100 μL of Stop Solution pre-equilibrated to room

temperature into each well.

- (13) After shaking, measure the absorbance at 450 nm (secondary wavelength 620 nm) with a plate reader.

[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]

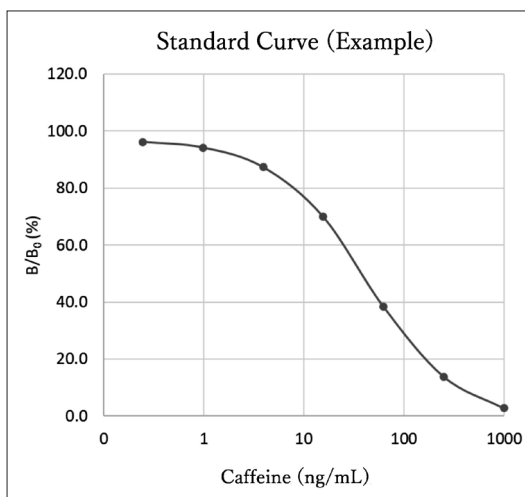
- (1) Create a standard curve by plotting the concentration of the standard solution (ng/mL) on the X-axis against the B/B_0 (%) value on the Y-axis.
- (2) Read the concentration (ng/mL) corresponding to the B/B_0 (%) of the diluted sample.
- (3) Multiply the read concentration by the sample dilution 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.

B/B_0 (%) = (Absorbance of each standard solution or sample / Absorbance of the zero standard (B_0)) \times 100

[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°C) before use (about 2 hours).
- ☐ Dilution of Wash Solution (10×) : Dilute 10-fold with purified water pre-equilibrated to room temperature.
- ☐ Preparation of standard solutions (example) : Prepare a caffeine standard stock solution (15 μg/mL) with the buffer solution supplied with the kit pre-equilibrated to room temperature. The following is an example.

Dilution example	Concentration(ng/mL)	1,000	250	62.5	15.6	3.91	0.977	0.244	0
	Standard Solution (μL)	30	50*	50*	50*	50*	50*	50*	—
	Buffer (μL)	420	150	150	150	150	150	150	150

* : Standard solution at 1 step higher concentration

- Preparation of Peroxidase-conjugated Caffeine Solution : Dilute 10,000-fold with Buffer pre-equilibrated to room temperature.
- Prepare samples according to [7. Sample Preparation].

☐ Antibody-coated Plate

- ☐ ↓ Wash 4 times (*1).

☐ Diluted Peroxidase-conjugated Caffeine Solution 50 μL/well

- ☐ ↓ Agitate using a microplate shaker (*2).

☐ Standard solutions or diluted samples 50 μL/well

- ☐ ↓ Agitate using a microplate shaker (*2), then incubate at room temperature (20-25°C) for 2 hours (*3).
- ☐ ↓ Check TMB Solution is equilibrated to room temperature.
- ☐ ↓ Wash 4 times (*1).

☐ TMB Solution 100 μL/well

- ☐ ↓ Agitate using a microplate shaker (*2), then incubate at room temperature (20-25°C) for 20 minutes (*3).

☐ Stop Solution 100 μL/well

- ☐ ↓ Agitate using a microplate shaker (*2).

☐ Absorbance Measurement (main wavelength, 450 nm ; sub-wavelength, 620 nm ; 600 to 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.

[Storage]

Store at 2°C to 10°C

[Expiration date]

Indicated on the label

[Package size]

For 96 assays

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

カフェイン ELISA キットワコー

【1. はじめに】

カフェインはアルカロイドの一種であり、コーヒー豆や茶葉に含まれることで知られています。中枢神経興奮作用を持つほか、運動中枢や延髄呼吸中枢を刺激し、血管収縮作用、強心作用、利尿作用、胃液の分泌促進作用も示すため、認知症やパーキンソン病、片頭痛や狭心症等の様々な疾患との関連が報告されています。

本品は、ヒト唾液／血清／血漿だけでなく、マウスやラットの血清／血漿中カフェインも測定可能な 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カフェイン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とペルオキシダーゼ結合カフェインを入れて反応させます。最後にウェル中のペルオキシダーゼ活性（吸光度）を測定することにより、検体中のカフェイン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	0.244 ～ 1,000ng/mL
測定対象	カフェイン
測定対象検体	マウス血清・血漿 ラット血清・血漿 ヒト唾液・血清・血漿（EDTA・ヘパリン）
必要検体量	55 μ L（2 倍希釈時、二重測定）
測定時間	約 2 時間 20 分
検出法	発色系
測定波長	主波長 450nm/ 副波長 620nm

【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。
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いして下さい。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/ 秒以上、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
Antibody-coated Plate/ 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8 × 12)/1 枚
Caffeine Standard/ カフェイン標準品	調製後使用	100 μ L/1 本
Buffer/ 緩衝液	そのまま使用	60mL/1 本
Peroxidase-conjugated Caffeine Solution/ ペルオキシダーゼ結合カフェイン溶液	調製後使用	50 μ L/1 本
TMB Solution/TMB 溶液	そのまま使用	12mL/1 本
Stop Solution/ 反応停止液	そのまま使用	12mL/1 本
Wash Solution（10 ×）/ 洗浄液（10 ×）	調製後使用	100mL/1 本
Plate Seal/ プレートシール	—	4 枚
取扱説明書	—	1 部

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。
未開封の場合、有効期限安定性を保ちます。

- (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バックに戻し、2 ～ 10℃で保存して下さい。
- (2) カフェイン標準品
未使用の場合、2 ～ 10℃で保存して下さい。
※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と閉め、2 ～ 10℃で保存して下さい。
- (4) ペルオキシダーゼ結合カフェイン溶液
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。
使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。
- (5) 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。

残りの未使用の溶液は、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。

(6) 反応停止液

残りの未使用の溶液は、2～10℃で保存して下さい。

(7) 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10μLを正確にピペッティングできるもの、及び200～500μLを正確にピペッティングできるもの）
- ☐ 連続分注ピペット、100μL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】

標準操作法では、キット添付の緩衝液で検体を希釈し測定して下さい。

検体	希釈倍率
マウス血清・血漿 ラット血清・血漿 ヒト血清・血漿（EDTA・ヘパリン）	2 倍
ヒト唾液	4 倍

検体調製前の推奨・注意事項

●検体採取時

- ・検体は定法に従い採血、分離したヒト / マウス / ラット血清及び血漿を使用して下さい。
- ・唾液検体の採取には流涎法を推奨しています。流涎法とはバイアルやチューブなどに唾液を垂れ流すことで検体を採取する方法です。
コットンおよび不活化ポリマー素材のスワブで採取した場合にも、流涎法と同程度に測定が可能であることを確認しておりますが、スワブの素材によっては、測定対象が吸着する可能性がありますのでご注意ください。

●検体保管時

- ・検体を長期保管する場合は、－80℃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

- ・希釈用溶媒にはキット添付の緩衝液を使用して下さい。
- ・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。
- ・血清分離促進剤等を使用する際は事前確認をして下さい。
- ・溶血した検体や高脂質検体は使用しないで下さい。

【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

操作を始める前にカフェイン標準品原液（15μg/mL）を室温化されたキット添付緩衝液で調製して下さい。

下記は一例です。

濃度 (ng/mL)	標準溶液の容量	緩衝液
1,000	標準品原液 : 30 μL	420 μL
250	1,000ng/mL 溶液 : 50 μL	150 μL
62.5	250ng/mL 溶液 : 50 μL	150 μL
15.6	62.5ng/mL 溶液 : 50 μL	150 μL
3.91	15.6ng/mL 溶液 : 50 μL	150 μL
0.977	3.91ng/mL 溶液 : 50 μL	150 μL
0.244	0.977ng/mL 溶液 : 50 μL	150 μL
0.00 (B ₀)	—	150 μL

8-2. ペルオキシダーゼ結合カフェイン溶液

室温化させた緩衝液で10,000倍に希釈して下さい。

※2段階希釈を推奨します。

8-3. 洗浄液 (10×)

操作を始める前に室温化された精製水(蒸留水)で10倍に希釈し、使用して下さい。

例：100mLの洗浄液(10×)+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。

【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)、(9)、(12)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に、あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満ち取り除く操作を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。
※以下、(2)～(5)の工程は30分以内に完了させて下さい。
 - (2) 各ウェルに希釈調製したペルオキシダーゼ結合カフェイン溶液を50μLずつ分注します。
 - (3) 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。

攪拌は 1 回終わる毎に一旦停止し、再度攪拌して下さい。

- (4) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 50 μ L ずつ分注します。

- (5) 検体測定ウェルに希釈調製済みの測定用検体を 50 μ L ずつ分注します。

- (6) 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。

攪拌は 1 回終わる毎に一旦停止し、再度攪拌して下さい。

- (7) 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。

- (8) 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。

- (9) 各ウェルに室温化させた TMB 溶液を 100 μ L ずつ分注します。

- (10) 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。

攪拌は 1 回終わる毎に一旦停止し、再度攪拌して下さい。

- (11) プレートシールを貼り、室温（20～25℃）で 20 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。

- (12) 各ウェルに室温化させた反応停止液を 100 μ L ずつ分注します。

- (13) 攪拌後、マイクロプレートリーダーで 450nm（副波長 620nm）での吸光度を測定します。

【操作補足】

洗浄方法

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 μ L/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 軸を標準溶液濃度（ng/mL）、Y 軸を B/B₀（%）の検量線を作成します。

- (2) 希釈検体の B/B₀（%）に対応する濃度（ng/mL）を読み取ります。

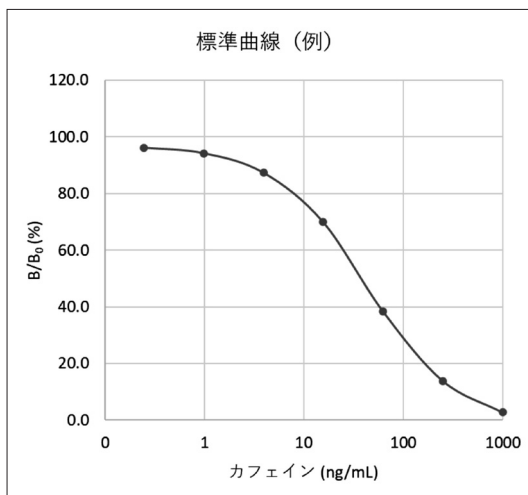
- (3) 読み取った濃度に検体希釈率をかけて測定値とします。

【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。

$$B/B_0 (\%) = (\text{各標準溶液また検体の吸光度} / 0 \text{ 濃度標準品 (B}_0\text{) の吸光度}) \times 100$$

【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、試薬類を十分に室温（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）：カフェイン標準品原液（15 μ g/mL）を室温化されたキット添付緩衝液で調製して下さい。下記は一例です。

濃度 (ng/mL)	1,000	250	62.5	15.6	3.91	0.977	0.244	0
調製標準溶液 (μ L)	原液： 30	50*	50*	50*	50*	50*	50*	—
例 緩衝液 (μ L)	420	150	150	150	150	150	150	150

*：ひとつ高濃度の標準溶液

* ペルオキシダーゼ結合カフェイン溶液の調製：室温化した緩衝液で 10,000 倍に希釈して下さい。

* 7. 検体の調製方法に従って、検体を調製して下さい。

- 抗体固相化プレート

- ↓ 洗浄 4 回（*①）

- 希釈調製したペルオキシダーゼ結合カフェイン溶液 50 μ L/ ウェル

- ↓ マイクロプレート振とう機で攪拌（*②）

- 各標準溶液または調製した検体 50 μ L/ ウェル

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

- ☐ ↓※ TMB が室温化されていることを確認
- ☐ ↓洗浄 4 回（※①）
- ☐ **TMB 溶液** **100 μ L/ ウェル**
- ☐ ↓マイクロプレート振とう機で攪拌（※②）、室温（20 ～ 25℃）、20 分反応、静置（※③）
- ☐ **反応停止液** **100 μ L/ ウェル**
- ☐ ↓マイクロプレート振とう機で攪拌（※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。洗浄液をビベットで添加する際の液量目安は 300 μ L/ 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。

【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

大阪市中央区道修町三丁目 1 番 2 号

Tel : 06-6203-3741