

## Mature BDNF ELISA Kit *Wako*

### [1. Introduction]

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 researches.

BDNF has precursor termed proBDNF, which is converted to mature BDNF (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. Performance]

Principle of the assay	Sandwich method
Standard curve range	4.1 ~ 1,000 pg/mL
Specificity*1	Mature BDNF
Sample	Serum, Plasma (Human)
Sample volume	10 $\mu$ L
Assay time	4 hours
Detection method	Colorimetric method

\*1 This kit has approximately 10% cross-reactivity to recombinant human proBDNF.

### [3. Material supplied]

Components	State	Volume or quantity
(A) Antibody-coated Plate	Use after washing	1 plate 96 wells (8 $\times$ 12)
(B) Mature BDNF Standard	Use after reconstitution	1 vial
(C) Buffer	Ready-to-use	60 mL/1 vial
(D) Biotin-conjugated Antibody Solution	Concentrated Use after dilution	100 $\mu$ L/1 vial
(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Concentrated Use after dilution	100 $\mu$ L/1 vial
(F) TMB Solution	Ready-to-use	6 mL/1 vial
(G) Stop Solution	Ready-to-use	6 mL/1 vial
(H) Wash Solution (10 $\times$ )	Concentrated Use after dilution	100 mL/1 vial
(I) Plate Seal	Ready-to-use	4 sheets

### [4. Measurement Principle]

The microplate is coated with anti mature BDNF monoclonal antibody. In each well, the standard solution or sample and biotin-conjugated anti BDNF polyclonal 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

measured to determine mature BDNF in the sample.

**[5. Equipment or Materials Required but not Supplied]**

- Purified water (distilled water)
- Test tube for dilution of a standard solution and samples
- Glass utensils for dilution of Wash Solution (e.g. graduated cylinders and beakers)
- Pipettes with disposable tips (one capable of pipetting 50  $\mu\text{L}$  of liquid accurately and one capable of pipetting 100 to 1,000  $\mu\text{L}$ )
- Dispenser capable of dispensing
- Water-absorbable material such as paper towel (to remove liquid remaining on a plate after washing)
- Mixer (Vortex type)
- Shaker for 96-well plate (approximately 600 to 1,200 rpm)
- Automatic washer for 96-well plate (If available) or washing bottle
- Microplate reader capable of measuring at  $450 \pm 10$  nm, with the correction wavelength set at 600-650 nm
- Software for data analysis

**[6. Reagent Preparation]**

Bring the reagents to room temperature prior to use. Reagents described as "Use after dilution" and "Use after reconstitution" in [3. Material Supplied] shall be prepared as follows. Prepare only as much reagent as needed on the day of the experiment.

6.1 Standard Solution

Reconstitute the standard with volume of purified water\*<sup>2</sup> described in a separate sheet (standard stock solution 10 ng/mL), and then mix with Buffer to prepare standard solutions as shown below.

\*<sup>2</sup> Because the volume of purified water to be added differs depending on the lot, see the specified volume in the separate sheet.

Concentration of the standard solution (pg/mL)	Volume of the preceding standard solution	Buffer
1000	Stock Solution (10 ng/mL) : 30 $\mu\text{L}$	270 $\mu\text{L}$
400	Standard Solution at 1000 pg/mL : 100 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$
160	Standard Solution at 400 pg/mL : 100 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$
64	Standard Solution at 160 pg/mL : 100 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$
25.6	Standard Solution at 64.0 pg/mL : 100 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$
10.2	Standard Solution at 25.6 pg/mL : 100 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$
4.1	Standard Solution at 10.2 pg/mL : 100 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$
0	—	150 $\mu\text{L}$

6.2 Biotin-conjugated Antibody Solution

Biotin-conjugated Antibody Solution is diluted 100-fold with Buffer.

6.3 Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution is diluted 100-fold with Buffer.

6.4 Wash Solution (1 $\times$ )

Wash Solution (10 $\times$ ) is diluted 10-fold with purified water (distilled water). (e.g.) When solution for 96-well reaction is prepared

Add 100mL of Wash Solution (10×) to 900 mL of purified water (distilled water) to prepare 1,000 mL of Wash Solution (1×).

#### **[7. Stability and Storage Method of Each Reagent]**

##### (A) Antibody-coated Plate

Unused antibody-immobilized strips (kept refrigerated and sealed) should be returned into the zip-seal bag provided in the kit and stored at 2-10°C. These are stable until the expiration date.

##### (B) Mature BDNF Standard

Reconstituted standard solution, which is standard stock solution 10 ng/mL should be stored at 2-10°C and should be used up within 2 weeks. Discard the remaining diluted standard solution after use.

##### (C) Buffer

If a part of Buffer is used, transfer the volume slightly greater than needed to another container, immediately close cap lid tightly without bringing the remaining Buffer to room temperature, and store at 2-10°C. It is stable until the expiration date.

##### (D) Biotin-conjugated Antibody Solution

If the kit is divided for multiple assays, prepare these solutions by dilution just after taking out of the refrigerator, immediately close the cap tightly without bringing the remained stock solution to room temperature, and store at 2-10°C. It is stable until the expiration date. Discard the remaining diluted standard solution after use.

##### (E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

If the kit is divided for multiple assays, prepare these solutions by dilution just after taking out of the refrigerator, immediately close the cap tightly without bringing the remained stock solution to room temperature, and store at 2-10°C. It is stable until the expiration date. Discard the remaining diluted standard solution after use.

##### (F) TMB Solution

If a part of TMB solution is used, transfer the volume slightly greater than needed to another container, immediately close the lid tightly without bringing the remaining TMB solution to room temperature, and store at 2-10°C. It is stable until the expiration date.

##### (G) Stop Solution

Just after get the Stop Solution out of the refrigerator, dispense the required volume of the solution. The remained solution should be stored at 2-10°C with the cap tightened. It is stable until the expiration date.

##### (H) Wash Solution (10×)

Store the Wash Solution (10×) with the cap tightly closed at 2-10°C if applicable. It is stable until the expiration date. Discard the remaining diluted washing solution.

#### **[8. Sample Preparation]**

Serum : Dilute 20 to 100-fold with Buffer.

Plasma (EDTA) : Dilute 10 to 50 fold with Buffer.

**[9. Assay Procedure]**

1. Discard the solution filled the Antibody-coated Plate with. Then wash 4 times with Wash Solution (1×). Invert the plate and gently blot it against clean paper towels.
2. Add 50  $\mu$ L of diluted standard solution to each well.
3. Add 50  $\mu$ L of diluted sample to each well.
4. Agitate the plate on a microplate shaker.
5. Cover with a Plate Seal. Incubate for 2 hours at room temperature (20-25°C).
6. Discard the solution and wash 4 times with Wash Solution (1×). Invert the plate and gently blot it against clean paper towels.
7. Add 50  $\mu$ L of Biotin-conjugated Antibody Solution to each well.
8. Cover with a new Plate Seal. Incubate for 1 hour at room temperature (20-25°C).
9. Repeat the wash as in step 6.
10. Add 50  $\mu$ L of Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to each well. Then shake using microplate shaker.
11. Cover with a new Plate Seal. Incubate for 30 minutes at room temperature (20-25°C) .
12. Repeat the wash as in step 6.
13. Add 50  $\mu$ L of TMB Solution to each well. Then shake using microplate shaker.
14. Cover with a new Plate Seal. Incubate for 30 minutes at room temperature (20-25°C).
15. Add 50  $\mu$ L of Stop Solution to each well.
16. Measure the absorbance at 450 nm and 620 nm as reference wavelength (600-650 nm)<sup>\*3</sup> using a microplate reader after stirring microplate with microplate shaker.

\*3 The range of 600-650 nm can be used as reference wavelength.

**[10. Calculation of Results]**

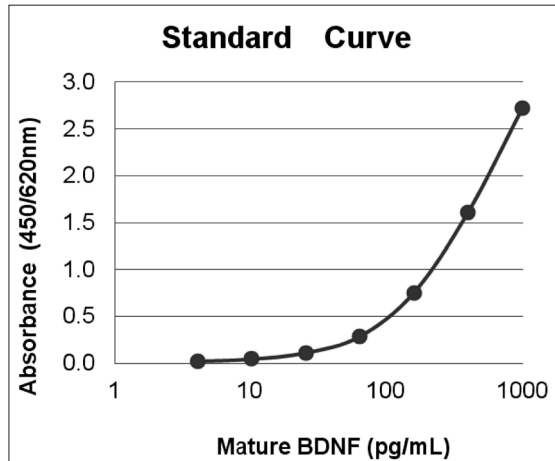
Prepare a standard curve by plotting the absorbance readings (Y-axis) against values of standard concentration (X-axis). Determine the unknown sample concentration from the Standard Curve<sup>\*4</sup> and multiply the value by the dilution factor.

\*4 The use of a 3rd order regression curve for log-log plot or 4 or 5 parameters method for log normal plot in computer calculation is recommended.

Sample values obtained with this kit could be converted to the NIBSC/WHO BDNF ; WHO Reference Reagent Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) code 96/534 Units, use multiplier coefficient<sup>\*5</sup> described in the separate sheet.

\*5 Multiplier coefficient differs depending on the lot, see the specified value in the separate sheet.

### [11. Typical Data]



※If absorbance of highest standard concentration (1,000 pg/mL) is more than 3.0, the standard curves should be created except for the absorbance.

### [12. Precautions]

- Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection.
- Avoid contact of skin and mucous membranes with kit reagents or specimens. If any reagents come in contact with eyes, skin, or mucous membranes, wash with copious amounts of water and contact a physician.
- Do not drink, eat, or smoke in a place where this kit is used.
- Handle the sample with proper care, being aware that the sample may have an infection risk. This kit contains animal-derived ingredients.
- Do not use reagents with different lot numbers together.
- TMB Solution is slightly yellow and clear liquid. Protect from light.
- It is recommended to store the sample frozen at  $-35^{\circ}\text{C}$  or lower if long-term storage is intended. Avoid repeated freezing and thawing. Thaw the frozen sample just before assay and thoroughly agitate. Prepare the sample before use.
- Do not use a sample with hemolysis or containing high lipid.
- Centrifuge the sample to remove turbidity or insoluble matters where necessary before use for the assay.
- If presence of interfering substances is suspected for the sample, dilute the concerned one at multiple dilution ratios to check the dilution linearity. Dilute the prepared sample with the Buffer.
- When allowing the plate to stand in each step, always affix a plate sealer to protect the wells from drying, contamination with foreign matters, uneven temperature, and evaporation of a dispensed reagent.
- ELISA can be affected by assay environment. Ensure that room temperature at places for assay operation and incubation is strictly controlled at  $20^{\circ}\text{C}$  to  $25^{\circ}\text{C}$  (on a bench or in an incubator). Avoid performing assay under air flow (including air flow from an air-conditioning equipment) or in a low-humidity environment.

### [13. Assay Procedure Summary]

- Bring the plate and reagents to room temperature ( $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ ) before use.
- Dilution of Wash Solution ( $10\times$ ) : Dilute Wash Solution ( $10\times$ ) 10-folds with purified water.

- Dilution of the standard solution: Reconstitute it with volume of purified water described in a separate sheet (standard stock solution 10 ng/mL), prepare the standard solutions by mixing with the Buffer to prepare as shown in a table below.

Concentration (pg/mL)	1000	400	160	64.0	25.6	10.2	4.10	0
Standard Solution (μL)	30	100*	100*	100*	100*	100*	100	-
Diluent Buffer (μL)	270	150	150	150	150	150	150	150

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

- Antibody-coated Plate
- ↓ Washing 4 times (\*①)
- Sample or standard solution 50 μL/well
- ↓ Agitate (\*②) and incubate at room temperature (20-25°C) for 2 hour (\*③)
- \* Preparation of biotin-conjugated antibody solution (dilute 100- folds with Buffer)
- ↓ Washing 4 times (\*①)
- Biotin-conjugated antibody solution 50 μL/well
- ↓ Agitate (\*②) and incubate at room temperature (20-25°C) for 1 hour (\*③)
- \* Preparation of peroxidase-conjugated streptavidin solution (dilute 100- folds with Buffer)
- ↓ Washing 4 times (\*①)
- Peroxidase-conjugated streptavidin solution 50 μL/well
- ↓ Agitate (\*②) and incubate at room temperature (20-25°C) for 30 minutes (\*③)
- ↓ Washing 4 times (\*①)
- TMB Solution 50 μL/well
- ↓ Agitate (\*②) and incubate at room temperature (20-25°C) for 30 minutes (\*③)
- Stop Solution 50 μL/well
- ↓ Agitate (\*②)
- Measure absorbance at 450 nm (Reference wavelength 620 nm : 600 ~ 650 nm)

(\*①) In each washing operation, dispense the wash solution (1×) into wells, gently agitate the filled plate on the palm for about 10 seconds, and then empty the wells. After washing the wells 4 times consecutively, reverse the plate, and tap it against paper towel to remove the washing solution completely. After removal of the washing solution, immediately dispense the next solution with care not to dry the wells. Use of a pipet set at the liquid volume of 300 μL may be appropriate for dispensing the washing solution into each well.

(\*②) Three repeats of agitation at 600 to 1,200 rpm for 10 seconds may be appropriate.

(\*③) After agitation, cover with a plate sealer. Remove the liner from the plate sealer, and apply its adhesive side to the plate for affixation. Do not re-use any plate sealer.

**[Storage]** Store at 2-10°C

**[Expiration date]** Indicated on the label

**[Package]** 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 : + 49-2131-311-0  
Facsimile : + 49-2131-311100  
<http://www.wako-chemicals.de>



## Mature BDNF ELISA キットワコー

### 【1. はじめに】

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)は神経栄養因子の一つで、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 はプロセッシングを受けることで Mature BDNF (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。本キットは mBDNF を特異的に検出する ELISA キットです。

### 【2. キット性能】

測定原理	サンドイッチ法
検量線範囲	4.1 ~ 1,000pg/mL
測定対象 <sup>*1</sup>	Mature BDNF
測定対象検体	血清、血漿（ヒト）
必要検体量	10 $\mu$ L
測定時間	約 4 時間
検出法	発色系

※1 リコンビナント human proBDNF に対して約 10% の交差性があります。

### 【3. キット内容】

構成品	状態	容量
(A) Antibody-coated Plate/ 抗体固相化プレート	洗浄後使用	1 プレート 96 wells (8×12)
(B) Mature BDNF Standard/ Mature BDNF 標準品	溶解後使用	1 本
(C) Buffer/ 緩衝液	そのまま使用	60mL/1 本
(D) Biotin-conjugated Antibody Solution/ ビオチン結合抗体溶液	希釈後使用	100 $\mu$ L/1 本
(E) 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	希釈後使用	100 $\mu$ L/1 本
(F) TMB Solution/TMB 溶液	そのまま使用	6mL/1 本
(G) Stop Solution/ 反応停止液	そのまま使用	6mL/1 本
(H) Wash Solution (10×)/ 洗浄液 (10×)	希釈後使用	100mL/1 本
(I) Plate Seal/ プレートシール	そのまま使用	4 枚

### 【4. 測定原理】

測定プレートの中には抗 Mature BDNF モノクローナル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、ビオチン標識抗 BDNF ポリクローナル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 Mature BDNF の濃度を求めることができます。

#### 【5. 必要な器具および装置】

- 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 50  $\mu$ L および 100 ~ 1,000  $\mu$ L を正確に採取できるもの）
- 連続分注ピペット
- ペーパータオル等（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）
- プレート振とう器（約 600 ~ 1,200rpm）
- プレート用洗浄機（あれば好ましい）または洗浄瓶
- プレートリーダー（450  $\pm$  10nm/600 ~ 650nm）
- データ計算用ソフトウェア

#### 【6. 試薬類の調製法】

キットの試薬は使用前に必ず室温（20 ~ 25 $^{\circ}$ C）に戻して下さい（2時間位が目安です）。【3. キット内容】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。「溶解後使用」、「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。

##### 6.1 標準溶液の調製

標準品に別紙記載の指定量<sup>※2</sup>の精製水を加え溶解し、標準品原液（10ng/mL）を調製してください。その後室温化されたキット添付の緩衝液で調製して下さい。

※2 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
1000	標準品原液：30 $\mu$ L	270 $\mu$ L
400	1000pg/mL 溶液：100 $\mu$ L	150 $\mu$ L
160	400pg/mL 溶液：100 $\mu$ L	150 $\mu$ L
64	160pg/mL 溶液：100 $\mu$ L	150 $\mu$ L
25.6	64.0pg/mL 溶液：100 $\mu$ L	150 $\mu$ L
10.2	25.6pg/mL 溶液：100 $\mu$ L	150 $\mu$ L
4.10	10.2pg/mL 溶液：100 $\mu$ L	150 $\mu$ L
0.00	-	150 $\mu$ L

##### 6.2 ビオチン結合抗体溶液

緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。

##### 6.3 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。

##### 6.4 洗浄液 (10 $\times$ )

精製水（蒸留水）で 10 倍に希釈して使用して下さい。

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）

#### 【7. 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 $^{\circ}$ C で保存して下さい。有効期限内は安定です。

(B) Mature BDNF 標準品

調製した標準品原液 (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

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。有効期限内は安定です。

(D) ビオチン結合抗体溶液

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。有効期限内は安定です。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(E) 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。有効期限内は安定です。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(F) 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、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。有効期限内は安定です。

(G) 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。有効期限内は安定です。

(H) 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。有効期限内は安定です。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

**[8. 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。

**[9. 測定操作]**

1. プレート保護液を除去し、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 50  $\mu$ L ずつ分注します。
3. 検体測定ウェルに緩衝液で希釈調製した検体を 50  $\mu$ 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攪拌します。
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溶液を 50  $\mu$ 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攪拌します。
8. プレートシールを貼り、室温 (20～25℃) で 1 時間静置します。
9. 反応終了後、ステップ 6 の洗浄操作を行います。
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 50  $\mu$ 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攪拌します。
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、ステップ 6 の洗浄操作を行います。
13. 各ウェルに TMB 溶液を 50  $\mu$ L ずつ分注します。マイクロプレート振とう器

- などを用いて攪拌します。
- プレートシールを貼り、室温（20～25℃）で30分間静置します。
  - 各ウェルに反応停止液を50μLずつ分注し、発色反応を停止します。
  - 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。

#### 【10. 計算方法】

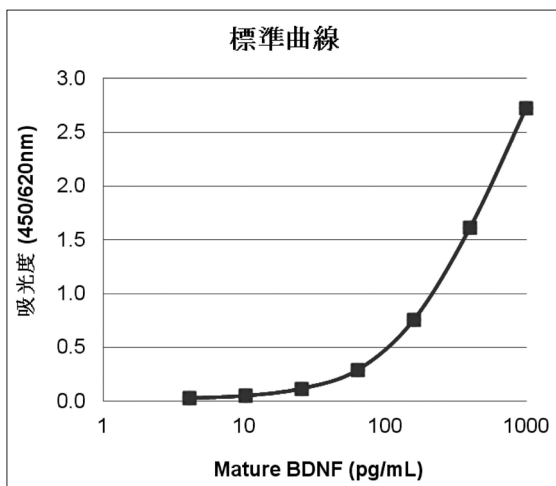
X軸を標準溶液濃度（pg/mL）、Y軸を吸光度の検量線を作成します。検量線より、希釈検体の吸光度に対応する濃度（pg/mL）を読み取ります。読み取った濃度に検体希釈率をかけて測定値とします。

\*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。

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<sup>\*3</sup>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。

※3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. 検量線（例）】



※吸光度が3.0を超える場合は値を除外して、それ以外のスタンダードの吸光度を用いて検量線を作成して下さい。

#### 【12. 使用上の注意】

- ・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。
- ・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。
- ・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。
- ・プレート内ウェル中には予め液体が入っています。プレートシールを剥がす際などこぼさないよう注意下さい。
- ・ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。
- ・TMB溶液は使用するまでは薄い黄色澄明です。光を避けて保存して下さい。
- ・検体を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。繰り返し

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、検体を希釈する場合は用時調製として下さい。

- ・溶血した検体や高脂質検体は使わないで下さい。
- ・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。
- ・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ため、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。

### 【13. 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。
- 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。
- 標準溶液の希釈（例）：標準品に精製水を別紙に記載の指定量\*を加え溶解し、標準品原液（10ng/mL）を調製して下さい。その後室温化した緩衝液で調製して下さい。加える精製水の量は別紙をご参照ください。
- \*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

希釈例	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 50 μL
- ↓ 攪拌 (\*②)、室温 (20～25℃)、2 時間反応、静置 (\*③)
- \* ビオチン結合抗体溶液の調製  
(室温化した緩衝液で100倍に希釈して下さい。)
- ↓ 洗浄 4 回 (\*①)
- ビオチン結合抗体溶液 50 μL
- ↓ 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 50 μL
- ↓ 攪拌 (\*②)、室温 (20～25℃)、30 分間反応、静置 (\*③)
- ↓ 洗浄 4 回 (\*①)
- TMB 溶液 50 μL
- ↓ 攪拌 (\*②)、室温 (20～25℃)、30 分間反応、静置 (\*③)
- 反応停止液 50 μL
- ↓ 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 / ウエルです。

(\*②) 攪拌の目安は600～1,200rpm-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

**富士フィルム 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