

LBIS™ Rat Albumin ELISA Kit

Please, read this instruction carefully before use.

1. Intended use

LBIS™ Rat Albumin ELISA Kit is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of rat albumin. This kit is intended for research use only.

2. Introduction

Albumin is mostly a simple hydrophilic protein present in cells and body fluids. Albumin is synthesized in the liver, and serum albumin (M.W. 69,000, pI 4.9) occupies 56% - 60% of total serum proteins. Because of its large population, albumin is very important in maintaining plasma osmotic pressure. Albumin can bind hydrophobic physiological substances e.g. fatty acids, bilirubin, and thyroxine and contributes to the transfer of these substances. Concentration of albumin in serum is lowered in liver cirrhosis, malnutrition, and pyrexial diseases due to decreased biosynthesis or increased consumption of albumin in, and also by secretion into urine in renal damage. In normal human subjects, excretion of albumin into urine is very little, about 30 mg/day, but increased in glomerulonephritis, nephritic syndrome, and diabetic nephropathy. Urinary albumin sometimes increases in pyrexia, hypertension, congestive heart failure (CHF), and urinary tract infection (UTI). Even in healthy human, a transient upraise of urinary albumin is observed after hard exercise, muscle work, bathing in high temperature water, mental excitement, stress, intake of much protein, and before menstruation. These are called physiological or functional or sports proteinuria (albuminuria). Orthostatic proteinuria (albuminuria) is observed in teenagers. Rare hereditary analbuminemia in human is really albumin deficiency. A model analbuminemia rat has been established by Dr. Sumi Nagase which has been derived from Sprague-Dawley strain, and is called Nagase analbuminemia rat (NAR). Routine measurement of serum albumin is conveniently made with FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's TIA assay kits for automatic analyzers. FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's Albumin ELISA Kits can measure urinary albumin with high sensitivity, and are also applied to *in vitro* albumin biosynthesis system, checking of contamination with albumin in biological active substance preparations obtained by culture system, and liver transplantation experiments using NAR.

3. Assay Principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS™ Rat Albumin ELISA Kit, standards or diluted samples are incubated in monoclonal anti-albumin antibody-coated wells to capture albumin. After 1 hour incubation and washing, HRP (horse radish peroxidase)-labeled anti-albumin 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 albumin concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against standard albumin concentrations. Albumin concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

4. Performance Characteristics

- Assay range

The assay range of the kit is 50 ng/mL - 1000 ng/mL.

- Specificity

The antibodies used in this kit are specific to albumin.

Sample	Cross reaction	Sample	Cross reaction
Mouse albumin	Less than 5%	Bovine albumin	N.D.
Human albumin	N.D.	10% FCS	N.D.
Porcine albumin	N.D.		

*Cross reaction at 10000 ng/mL (Except FCS)

- Precision of assay

Within assay variation (3 samples, 5 replicates assay), Mean CV was within 10%

- Reproducibility

Between assay variation (3 samples, 3 days, 3 replicates assay), Mean CV was within 10%

- Recovery test

Standard albumin was added in 3 concentrations to serum sample and assayed.

The recoveries were 93.7% - 98.9%

- Dilution test
Serum sample was serially diluted by 3 steps.
The dilution curves showed linearity with $R^2 = 0.9951$ and 0.9984 .

5. Reference Assay Data

Rat albumin mean assay value : 36.0 mg/mL, SD : 4.45 mg/mL

Strain : CD(SD), 4 males, 10 week-old, serum

These data should be considered as guidance only. Each laboratory should establish its own normal and pathological reference ranges for albumin levels independently.

6. Precautions

- For professional use only. Beginners are advised to use this kit under the guidance of experienced person.
- Do not drink, eat or smoke in the areas where assays are carried out.
- 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 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 containing hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine. Wear gloves and eye and clothing protection when handling these reagents.
- The materials must not be pipetted by mouth.
- Unused samples and used tips should be rinsed in 1% formalin, 2% glutaraldehyde, 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.
- Use clean laboratory glassware.
- 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%.

7. Reagents supplied

Components	Use Status	Amount	
		96 tests	96 tests × 2
(A) Antibody-coated Plate	Use after washing	96 wells/1 plate	96 wells/2 plates
(B) Rat Albumin Standard	Concentrated. Use after dilution.	150 μL/1 bottle	150 μL/2 bottles
(C) Buffer	Ready for use.	60 mL/1 bottle	120 mL/1 bottle
(D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution	Concentrated. Use after dilution.	100 μL/1 bottle	200 μL/1 bottle
(F) TMB Solution	Ready for use.	12 mL/1 bottle	24 mL/1 bottle
(H) Stop Solution	Ready for use.	12 mL/1 bottle	24 mL/1 bottle
(I) Wash Solution (10×)	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle	100 mL/2 bottles
(J) Plate Seal	—	3 sheets	6 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.

[(B) Rat Albumin Standard]

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

Dispose remaining prepared solution.

[(C) Buffer] and [(F) TMB Solution]

Use only volume you need for your assay. Remaining reagents should be stored at 2°C - 10°C fastening the cap tightly. It maintains stability until expiration date. Once opened, we recommend using 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.

[(I) Wash Solution (10×)]

If not opened, store at 2°C - 10°C. Dispose any unused diluted buffer.

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

Purified water (distilled water). Test tubes for preparation of standard solution series.

Glassware for dilution of Wash Solution (10×) (a graduated cylinder, a bottle).

Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 5 μL precisely, and another for 50 μL - 500 μL. Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipette plus which can dispense 50 μL. 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. A 96 well-plate reader (450 nm ± 10 nm, 620 nm : 600 nm - 650 nm). Software for data analysis.

9. Preparation of Samples

This kit is intended to measure albumin in rat serum, plasma (heparin is recommended) or urine. The necessary sample volume for the standard procedure is 5 μL. Dilute your samples with the buffer so as to be within the assay range, 50 ng/mL - 1000 ng/mL. The recommended dilution is 10000× - 50000× for serum or plasma, and 50× - 100× for urinary samples.

Samples should be immediately assayed or stored below -35°C until assay. Before starting assay, shake thawed samples sufficiently. Do not repeat freeze-and-thaw cycles.

Hemolytic and hyperlipemic serum samples are not suitable.

***To avoid influence of blood (high lipid or hemolysis, etc.), if your original samples have heavy chyle or hemolysis as the pictures below, do not use them for assay. Abnormal value might be obtained with hemolysis above 80 mg/dL with this kit.**

If presence of interfering substance is suspected, examine by dilution test at more than 2 points. Dilution of a sample should be made in a test tube using buffer solution prior to adding them to wells.

Turbid samples or those containing insoluble materials should be centrifuged before testing to remove any particulate matter.

10. 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) Rat Albumin Standard]

Below is an example of preparing each standard solution.

Volume of standard solution	(C) Buffer	Concentration (ng/mL)
Original solution 50 μL	450 μL	1000
1000 ng/mL solution 400 μL	100 μL	800
800 ng/mL solution 300 μL	100 μL	600
600 ng/mL solution 200 μL	100 μL	400
400 ng/mL solution 100 μL	100 μL	200
200 ng/mL solution 100 μL	100 μL	100
100 ng/mL solution 100 μL	100 μL	50
Blank	100 μL	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 Wash Solution (10×) to **10 volume** with deionized water (or distilled water) to prepare working solution. Example : 100 mL of concentrated Wash Solution (10×) and 900 mL of deionized water (or distilled water).

11. 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 wells with 300 μL of washing buffer and discard 3 times (*①), then strike the plate upside-down onto folded several sheets of paper towel to remove residual buffer in the wells(*⑤).

- (2) Pipette 50 μ L of (C) Buffer to each well and shake the plate gently on a plate shaker (*②).
 - (3) Pipette 5 μ L of standard solution to the wells designated for standards, and 5 μ L of properly diluted samples to the designated sample wells.
 - (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 50 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 50 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 50 μ L of the Stop Solution to all wells to stop the coloration.
 - (13) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620 nm (*④)) immediately using a plate reader.
- *Refer 15. Summary of Assay Procedure for notes of *①, *②, *③, *④, and *⑤.

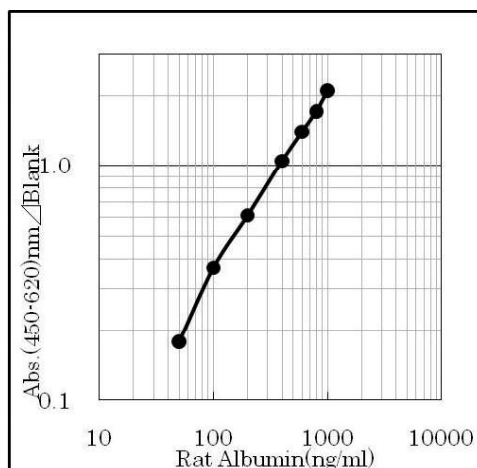
12. Technical Tips

- 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 \times 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.

13. Calculations

- (1) Prepare a standard curve by plotting standard concentration on X-log and absorbance on Y-axis.
- (2) Using the standard curve, read the albumin 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 or 5 parameters method for log-normal plot in computer calculation.



Rat Albumin assay standard curve (an example)
Absorbance may change due to assay environment.

14. 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 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 was higher than that of the lowest standard concentration (50 ng/mL).

Possible explanations :

Improper or inadequate washing. (Change washing frequency from 3 times to 4 - 6 times at the constant stroke 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 there contains liquid in 96 well-plate when I opened the box. What is it?

A-2 : When we manufacture 96 well-plate, we insert preservation stabilizer in wells.

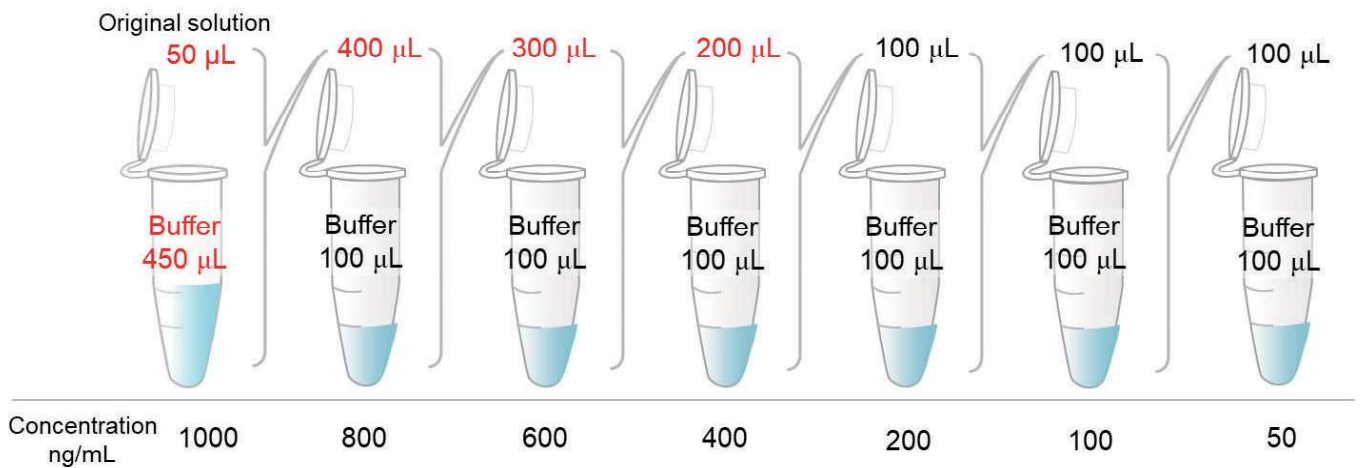
15. Summary of Assay Procedure : Use as a check box

* 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.

Standard solution dilution example :



- Antibody-coated Plate
- ↓ Washing 3 times (*①), (*⑤)
- Buffer 50 μL
- ↓ Shaking (*②)
- (Diluted) Samples, or Standards 5 μL
- ↓ Shaking (*②), Incubation for 1 hour at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- Dilute (D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution to **1 : 100** with (C) Buffer returned to 20°C - 25°C.
- ↓ Washing 3 times (*①), (*⑤)
- Peroxidase-conjugated Antibody Solution (Diluted) 50 μL
- ↓ Shaking (*②), Incubation for 1 hour at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- ↓ Washing 3 times (*①), (*⑤)
- TMB Solution 50 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 50 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)) immediately
(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 μL/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 Antibody 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 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.

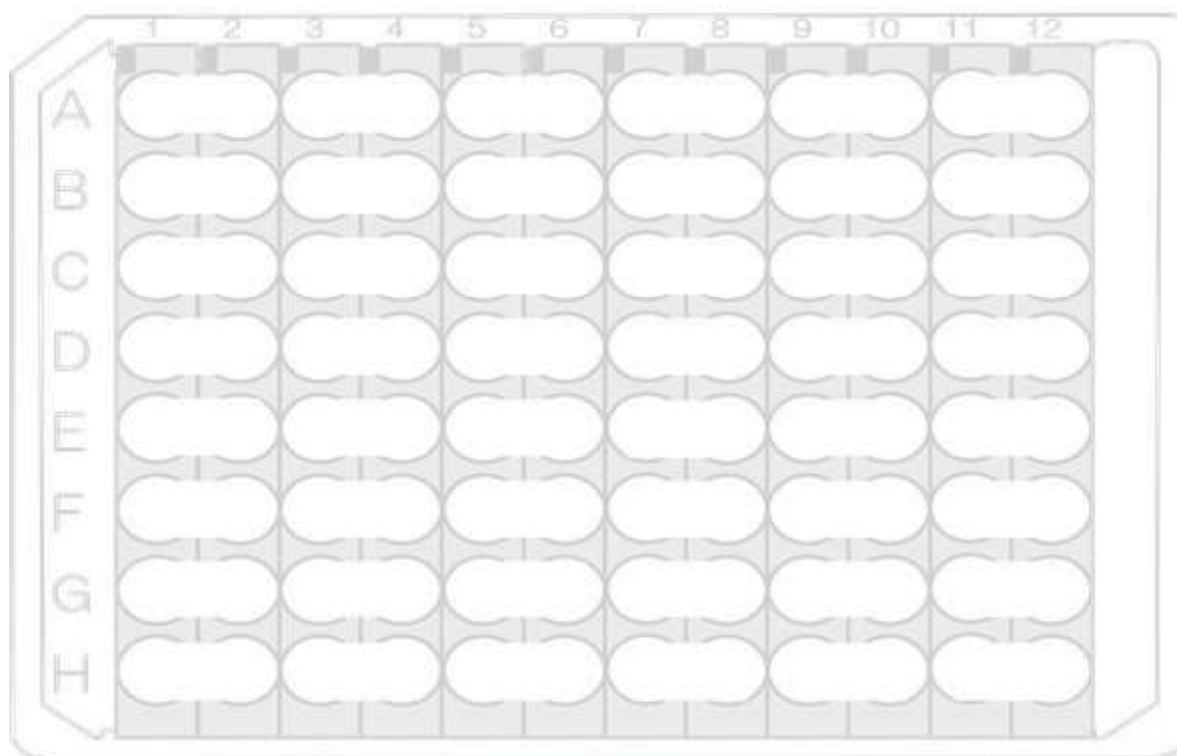
*④ 600 nm - 650 nm can be used as reference wavelength.

*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	1000 ng/mL	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
B	800 ng/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
C	600 ng/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
D	400 ng/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
E	200 ng/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
F	100 ng/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
G	50 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



16. Storage and Expiration

When the complete kit is stored at 2°C - 10°C. Opened reagents should be used as soon as possible to avoid loss in optimal assay performance caused by storage environment.

LBIS™ Rat Albumin ELISA Kit

[Storage]	Store at 2 - 10°C
[Expiration date]	Indicated on the label
[Package]	For 96 tests / 96 tests × 2
[Cat #]	293-92501 (96 tests) 299-92503 (96 tests × 2)

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://fwk.fujifilm.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation
1600 Bollwood 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>

レビス™ ラットアルブミン ELISA キット

1. イントロダクション

アルブミンは細胞や体液中に含まれ、水溶性の高い主として単純タンパク質ですが、糖を含むものも見出されています。血漿アルブミンは血漿タンパク質中の56%～60%を占める分子量約69000、等電点4.9の単純タンパク質で、肝細胞で合成されます。血漿アルブミンは血漿タンパクの大半以上を占め、浸透圧維持に重要な役割を果たし、水に難溶性の物質、例えば生理的には脂肪酸、ビリルビン、チロキシンなどと結合してこれらの運搬作用に寄与しています。血漿アルブミンの濃度は、肝硬変などでのアルブミンの生合成低下、栄養不良や熱性疾患での体タンパク質損耗に基づく血液中のアルブミンの消費、腎障害による尿への漏出等で低下します。

健康人での尿中への血漿アルブミンの排泄は通常ごく僅かで1日30mg以下ですが、腎疾患に際して尿中への漏出が増大するので糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症等の腎疾患で尿中アルブミンレベルは増大します。また発熱、高血圧、うっ血性心不全、尿路感染症などの場合に尿中アルブミンレベルが増加することがあります。健康人でも過激な運動や筋肉労働後、熱い湯での入浴後、精神的興奮、ストレス、多量のタンパク質の摂取後および月経前などに尿中アルブミンの一過性増加がみられ、生理的または機能的タンパク尿或いは運動性蛋白尿と言われます。また主に若年者において、しばしば起立時にのみタンパク尿がみられることがあります。

ヒトで低アルブミン血症と呼ばれるまれな先天性疾患があり、無アルブミン血症とも呼ばれますが正確にはごく少量のアルブミンがあり、臨床症状は軽度の浮腫と中等度の低血圧であり、肝機能異常やタンパク尿は認められないようです。動物ではラットに無アルブミン血症 *analbuminemia* のモデルがあります。佐々木研究所の長瀬スミ先生が Sprague-Dawley rat (SD ラット) から開発されたもので、NAR (Nagase *analbuminemia* rat) と呼ばれています。

血清(血漿)アルブミンの測定は、マクロ的にはTIAの測定系がよく、当社でもラット、マウス、サルについての自動測定器用TIAを提供していますが、ELISAによる測定系では高感度で微量測定が可能です。当社ELISAキットは血液中、尿中のアルブミンを疾患との関連で定量する他に、*in vitro*のアルブミン生合成実験系、培養系で作製された生理活性物質を精製した場合のFCS等のcontaminationの検討、NARでの肝細胞、肝組織移植後のアルブミン産生をメルクマールとする成否の検討などにも応用が可能です。

本キットはラットアルブミン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。
- ・ラット血清または血漿(ヘパリンの使用を推奨します)、尿中のアルブミンを測定します。
- ・微量な検体(標準操作法は5 μ L)で測定可能です。
- ・1キットは96ウェルです。
- ・標準品はラット由来のものです。
- ・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、希釈検体を抗アルブミン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、ペルオキシダーゼ標識抗体を加え、捕捉されたアルブミンとともに1時間インキュベートします。洗浄後、ウェルに残った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。吸光度はアルブミン濃度にはほぼ比例します。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
ラットアルブミンを50ng/mL～1000ng/mLの範囲で測定できます。
- ・特異性
このELISA系で使用されている抗体はラットアルブミンに対して特異的です。関連物質を本キットで測定した結果は次表のとおりです。交差性は、10000ng/mL時のデータです(FCSは除く)。

検体名	交差性	検体名	交差性
マウス アルブミン	5% 未満	ウシ アルブミン	—
ヒト アルブミン	—	10% FCS	—
ブタ アルブミン	—	— : 交差性無し	

- ・精度試験（アッセイ内変動）（5重測定、3検体） 平均C.V.値は10%未満
- ・再現性試験（アッセイ間変動）（3重測定、3検体、3日間） 平均C.V.値は10%未満
- ・添加回収試験
2血清検体に異なる3濃度のアルブミンを添加し測定した結果、回収率は93.7%から98.9%
- ・希釈直線性
2血清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0.9951と0.9984

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

- ・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。
- ・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。
- ・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。
- ・TMB溶液は96ウェルプレートに使用するまでは薄い青色澄明です。光を避けて保存して下さい。
- ・反応停止液は使用するまでは無色です。
- ・本キットはELISA法の研修を終了した方、または指導者の方のご使用下さい。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。
- ・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。
- ・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。
- ・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。

5. 構成品

構 成 品	状 態	容 量	
		96 回用	96 回用×2
(A) Antibody-coated Plate 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12) / 1枚	96wells (8×12) / 2枚
(B) Rat Albumin Standard ラットアルブミン標準品	希釈後使用	150μL / 1本	150μL / 2本
(C) Buffer 緩衝液	そのまま使用	60mL / 1本	120mL / 1本
(D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution ペルオキシダーゼ結合抗体溶液	希釈後使用	100μL / 1本	200μL / 1本
(F) TMB Solution TMB溶液	そのまま使用	12mL / 1本	24mL / 1本
(H) Stop Solution 反応停止液	そのまま使用	12mL / 1本	24mL / 1本
(I) Wash Solution (10×) 洗浄液 (10×)	希釈後使用	100mL / 1本	100mL / 2本
(J) Plate Seal プレートシール	—	3枚	6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) ラットアルブミン標準品

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、及び (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・ビーカー・瓶） チップ交換型ピペット（使い捨てチップで5μLを正確にピペッティングできるもの、及び50μL～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（例 Eppendorf の multipette plus）、50μL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 ± 10nm、620nm：600nm～650nm） データ計算用ソフトウェア

7. 検体の調製

本キットはラット血清または血漿（ヘパリンの使用を推奨します）、尿中のアルブミンを測定します。測定範囲（50ng/mL～1000ng/mL）に入るよう、キットの（C）緩衝液を用いて検体を希釈して下さい。

希釈目安は、血清または血漿検体が10000～50000倍、尿検体が50～100倍です。検体を希釈する場合は、あらかじめ試験管等を用いて（C）緩衝液で希釈し測定ウェルに分注して下さい。

- ・尿検体の場合は特にラットの状態によりアルブミン濃度の変動が大きくなるため、上記希釈目安の倍率では検体の吸光度が標準曲線吸光度より外れる場合があります。その場合は、低濃度検体は例えば10倍希釈、高濃度検体は200倍、500倍等、適当倍率に調製し再測定を実施して下さい。（10. 計算（2）参照）
- ・検体は定法にしたがって採取しすぐに測定するか、-35℃以下で凍結保存して下さい。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。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。正しい結果が得られない原因になります。
- ・採血の際、ヒト用採血管をご使用になるのは避けて下さい。血清分離剤や凝固促進剤等の添加剤が測定系に影響を与える可能性があります。
- ・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。

【検体の安定性と保存方法】

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。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。また、検体の希釈は用時調製として下さい。

8. 試薬の調製

*キットの試薬は使用前に必ず室温（20℃～25℃）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) ラットアルブミン標準品：標準曲線作成用

(B) Rat Albumin Standard (原液：10 μ g/mL) 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	1000
1000ng/mL 溶液 400 μ L	100 μ L	800
800ng/mL 溶液 300 μ L	100 μ L	600
600ng/mL 溶液 200 μ L	100 μ L	400
400ng/mL 溶液 100 μ L	100 μ L	200
200ng/mL 溶液 100 μ L	100 μ L	100
100ng/mL 溶液 100 μ L	100 μ L	50
0 (Blank)	100 μ L	0

(D) ペルオキシダーゼ結合抗体溶液

100 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、プレートが充分に室温に戻ってから剥がして下さい。

- (1) 保護液を捨て、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) 各ウェルに緩衝液を 50 μ L ずつ分注し、マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌 (*②) します。
 - (3) 標準品測定ウェルに各濃度のアルブミン標準溶液を、検体用ウェルに希釈検体をそれぞれ 5 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 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ 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 50 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 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) 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 50 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 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) で 20 分間静置 (*③) します。
 - (12) 各ウェルに反応停止液を 50 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。

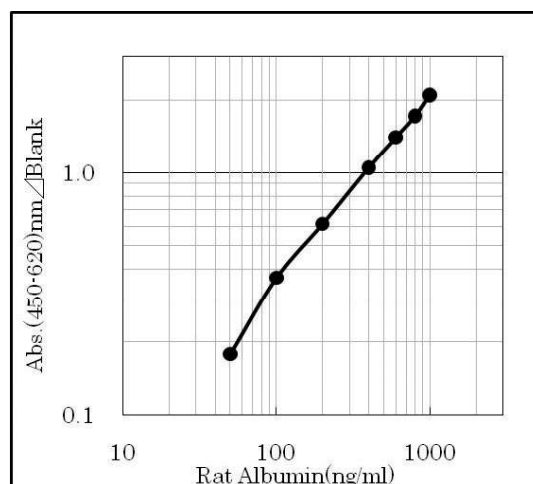
* 検体の吸光度が標準曲線吸光度より外れた場合は (C) 緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施して下さい。

* 一番高濃度の標準溶液の吸光度付近の検体は (C) 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。

* プレートリーダーは SUNRISE RAINBOW (TECAN) を使用。

下の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）。



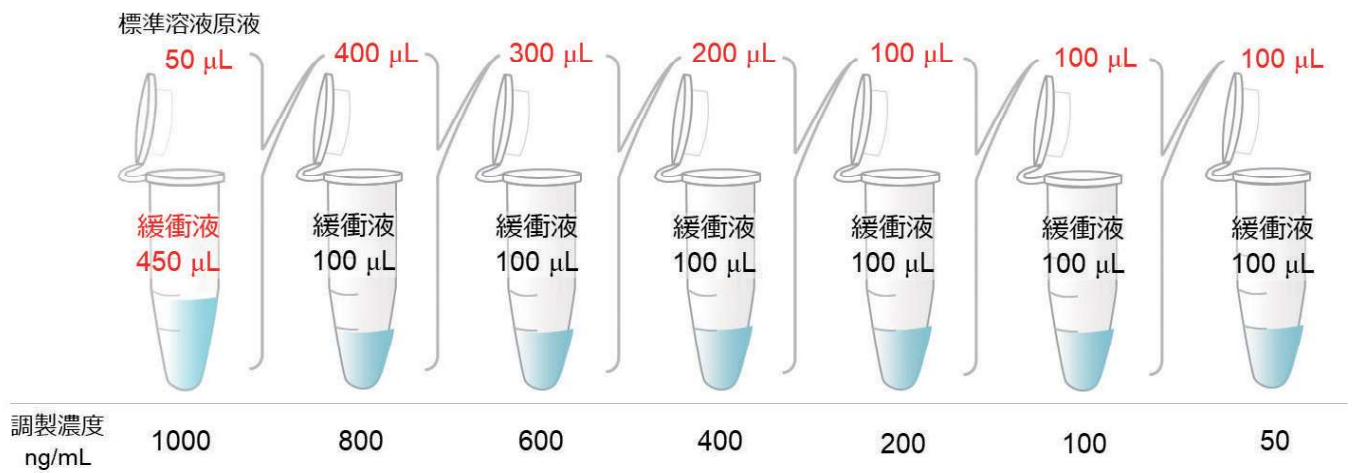
11. トラブルシューティングと Q&A

- 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（50ng/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
洗浄が不適當、不完全であった。
(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。)
- 変動係数 (CV) が大きい
原因として考えられること
 - 1) 洗浄が不適當、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ください）。
 - 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液体が入っていましたが何ですか？
A-2: 出荷時には保存安定液が充填してあります。

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ください。

- 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×）：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

- 抗体固相化プレート
- ↓ 洗浄 3 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注) *①
- 緩衝液 50 μ L
- ↓ 攪拌 *②
- 希釈検体または標準溶液 5 μ L
- ↓ 攪拌、室温 (20℃～25℃)、1 時間反応、静置 *②、*③
- (D) 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。
- ↓ 洗浄 3 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注) *①
- ペルオキシダーゼ結合抗体溶液 50 μ L
- ↓ 攪拌、室温 (20℃～25℃)、1 時間反応、静置 *②、*③
- ↓ 洗浄 3 回 (洗浄液除去後、直ちに TMB 溶液分注) *①
- TMB 溶液 **TMB が室温化されていることを確認** 50 μ L
分注後、濃度により青色に変色
- ↓ 攪拌、室温 (20℃～25℃)、20 分間反応、静置 *②、*③
- 反応停止液 **強酸性につき取扱注意** 50 μ L
分注後、濃度により黄褐色に変色
- ↓ 攪拌 (直ちに攪拌) *②
- 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 μ L / ウェルです。万一、最小標準溶液濃度 (50ng/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。

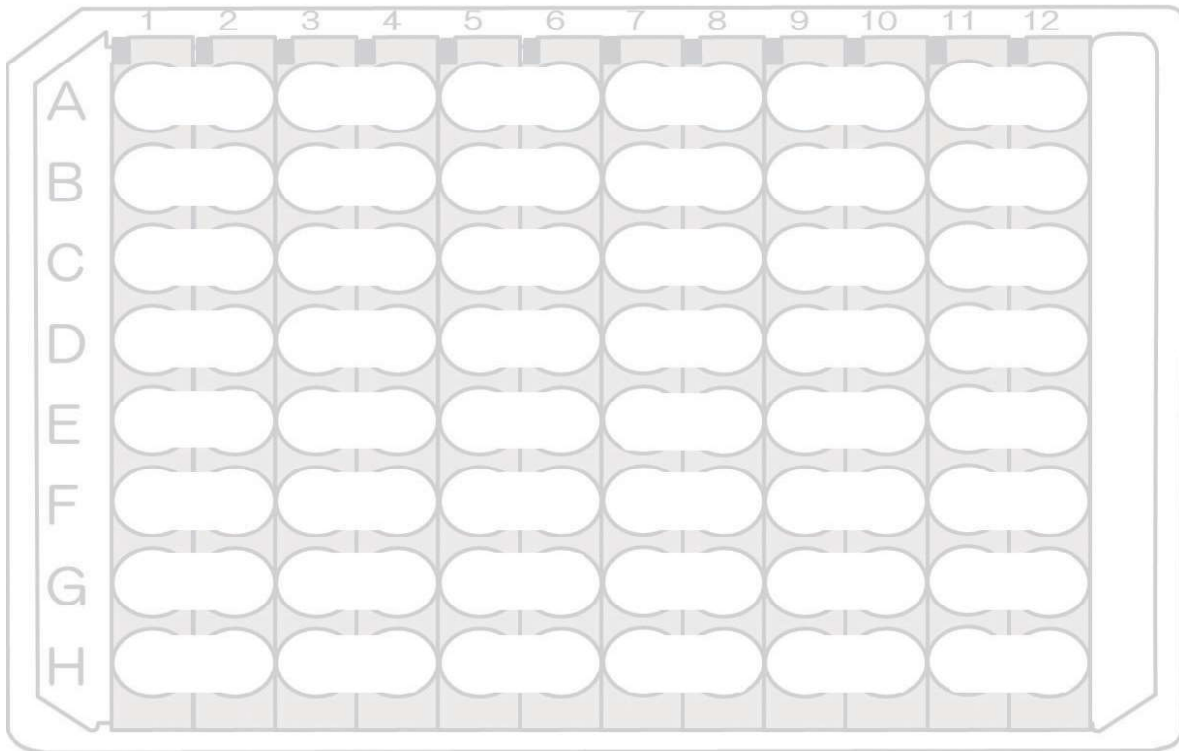
(*②) 攪拌の目安は 600rpm～1200rpm-10 秒間、3 回。

(*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。

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	1000ng/mL	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	800ng/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	600ng/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	400ng/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	200ng/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	100ng/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	50ng/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 ラットアルブミン ELISA キット
【和光コード】	293-92501 (96 回用) 299-92503 (96 回用×2)
【英語表記】	LBIS TM Rat Albumin ELISA Kit
【貯法】	2 ~ 10℃ 保存
【使用期限】	ラベルに記載
【包装】	96 回用 / 96 回用×2

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