

## LBIS™ Human Apo B-48 ELISA Kit

Please, read this instruction carefully before use.

### 1. Intended use

LBIS™ Human Apo B-48 ELISA Kit is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of human Apolipoprotein B-48 (Apo B-48). This is intended for research use only.

### 2. Introduction

Plasma lipoproteins are complex substances composed of certain ratios of lipids and proteins, and are important factors for serum lipids transportation. On the surface of the lipoprotein structure, apolipoproteins are present and playing roles in stabilization of lipoprotein structure, in activation of enzymes relating to lipoprotein metabolism, and in binding with lipoprotein receptors on the cell surface. Apolipoprotein-B48 (ApoB-48) has 48% amino acid sequence of apolipoprotein B-100 which is present in lipoproteins, VLDL, LDL and HDL of liver origin. ApoB-48 is an apolipoprotein specific to a lipoprotein, chylomicron (CM) which is formed in intestine and carries exogenous lipids derived from foods to the liver and peripheral tissues. Measurement of ApoB-48 is useful in observation and pursuit of postprandial dynamics of lipoprotein, lipid-soluble nutrients and drugs. Co-estimation of LDL-, HDL-cholesterol and B-48 will give important information about exogenous and endogenous cholesterol (see reference), and also estimation of CM-remnant that is thought to be a risk factor of cardiovascular atherosclerosis.

Reference : Otokozawa, S., *et al.* : *Atherosclerosis*, **205**, 197-201 (2009).

### 3. Assay Principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS™ Human Apo B-48 ELISA Kit, standards or samples are incubated in monoclonal antibody-coated wells to capture Apo B-48. After 1 hour's incubation and washing, biotinylated anti-Apo B-48 antibody is added and incubated further for 1 hour to bind with captured Apo B-48. After washing, Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution is added, and incubated for 30 minutes. After washing, bound HRP-conjugated streptavidin 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 Apo B-48 concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against standard Apo B-48 concentrations. Apo B-48 concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

### 4. Performance Characteristics

- Assay range : The assay range of the kit is 2.5 ng/mL - 160 ng/mL.
- Specificity : The antibodies used in this kit are specific to Apo B-48.  
Human Apo B-100 had no cross reactivity with this kit.
- 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 Apo B-48 was added in 4 concentrations to 2 serum samples and were assayed.  
The recoveries were 94.9% - 101%.
- Dilution test  
Serum sample was serially diluted by 4 steps.  
The dilution curves showed linearity with  $R^2 = 0.996 - 0.999$ .

### 5. Reference Assay Data

Human apo B-48 assay data

Mean assay value : 4.60  $\mu\text{g/mL}$ , SD : 1.54  $\mu\text{g/mL}$ , n = 18, fasting

These data should be considered as guidance only. Each laboratory should establish its own normal and pathological reference ranges for Apo B-48 levels independently.

### 6. Precautions

- For professional use only. Beginners are advised to use this kit under the guidance of experienced person. In manual operation, proficiency in pipetting technique is recommended.

- 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. 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
(A) Antibody-coated Plate	Use after washing.	96 wells/1 plate
(B) Human Apo B-48 Standard	Frozen-dried. Use after dilution.	1 bottle
(C) Buffer	Ready for use.	60 mL/1 bottle
(D) Biotin-conjugated Antibody Solution	Concentrated. Use after dilution.	100 $\mu$ L/1 bottle
(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Concentrated. Use after dilution.	100 $\mu$ L/1 bottle
(F) TMB Solution	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(H) Stop Solution	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(I) Wash Solution (10 $\times$ )	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle
(J) Plate Seal	–	4 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) Human Apo B-48 Standard]

**The reconstituted standard solution (original solution) should be used within 24 hours if stored in a refrigerator. Dispose remaining prepared solution. For longer storage, freeze it immediately after reconstitution, and store it under -35°C.**

[(C) Buffer] & [(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. Once opened, we recommend using as soon as possible to avoid influence by environmental condition.

[(D) Biotin-conjugated Antibody Solution] & [(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution]

Unused working solution (already diluted) should be disposed. If not opened, store at 2°C - 10°C.

[(H) Stop Solution]

Close the stopper tightly and store at 2°C - 10°C.

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

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

Deionized water (or Distilled water)  Test tubes for preparation of standard solution series.  Glassware for dilution of Wash Solution (10 $\times$ ) (a graduated cylinder, a bottle)  Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 50  $\mu$ L precisely, and another for 200  $\mu$ L and 400  $\mu$ L.  Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipette plus which can dispense 50  $\mu$ L.  Paper towel to remove washing buffer remaining in wells.  A vortex-type mixer.  A shaker for 96 well-plate (600 - 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  $\pm$  10 nm, 620 nm : 600 nm - 650 nm)  Software for data analysis.

## 9. Preparation of Samples

This kit is intended to measure Apo B-48 in human serum or plasma (**citric acid for plasma is not suitable**). We recommend to use EDTA-2Na, EDTA-2K or heparin as anticoagulant. Don't use citric acid. 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. Turbid samples or those containing insoluble materials should be centrifuged before testing to remove any particulate matter.

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 PP or PE test tube using buffer solution prior to adding them to wells (Be careful with pipetting since samples diluted with buffer have highly viscosity). Mix well and pipette 50  $\mu\text{L}$  of diluted sample into a well for assay.

Recommended dilution is 100 $\times$ . For high value samples, more than 200 $\times$  dilution may be needed. When diluting samples, vortex them well (1800 rpm - 2000 rpm 3 times for 10 seconds) with care not to make bubbling.

Hemolytic and hyperlipemic samples are not suitable.

\* To avoid influence of blood (high lipid or hemolysis, etc.), if your original samples have heavy chyle or hemolysis, do not use them for assay. Abnormal value might be obtained with hemolysis above 160 mg/dL with this kit.

[Storage and Stability]

Apo B-48 in samples will be inactivated if stored at 2 $^{\circ}\text{C}$  - 10 $^{\circ}\text{C}$ . If it is necessary to store samples in refrigerator (2 $^{\circ}\text{C}$  - 10 $^{\circ}\text{C}$ ), add aprotinin at final concentration of 100 - 500 KIU/mL (KIU : kallikrein inhibitor unit). If you have to store assay samples for a longer period, snap-freeze samples and keep them below -35 $^{\circ}\text{C}$ . Defrosted samples should be mixed thoroughly for best results. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

## 10. Preparation of Reagents

◆ Bring all reagents of the kit to room temperature (20 $^{\circ}\text{C}$  - 25 $^{\circ}\text{C}$ ) before use.

◆ Prepare reagent solutions in appropriate volume for your assay. Do not store the diluted reagents.

### [Concentrated reagents]

[(B) Human Apo B-48 Standard]

**Add 400  $\mu\text{L}$  of deionized water (or distilled water) of room temperature to Standard human Apo B-48 (Frozen-dried) and let it stand still for 10 minutes (Original solution).** Avoid bubbling of the solution, and shake it sufficiently at 1800 rpm - 2000 rpm 3 times for 10 seconds. Dissolve the standard in vial completely, and let it be clear solution.

Caution for vortexing : Put a vial on Vortex and start mixing. Do not put vial on Vortex while moving. That caused bubbling.

**Reconstituted solution (original solution) is highly viscous. Before preparing standard solutions, get accustomed to treat highly viscous solution (for pipetting, we recommend co-washing procedure). In order to prepare the standard solution precisely, it is very important to pipette correctly the first 200  $\mu\text{L}$ .**

Sufficient shaking with Vortex (1800 rpm - 2000 rpm 3 times for 10 seconds) in every step of dilution is very important. Be careful not to make bubbles while mixing. Bubbling causes bad reproducibility.

Below is an example of preparing each standard solution.

Volume of standard solution	(C) Buffer	Concentration (ng/mL)
Original solution 200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	160
160 ng/mL solution 200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	80
80 ng/mL solution 200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	40
40 ng/mL solution 200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	20
20 ng/mL solution 200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	10
10 ng/mL solution 200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	5.0
5.0 ng/mL solution 200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	2.5
0 (Blank)	200 $\mu\text{L}$	0

[(D) Biotin-conjugated Antibody Solution]

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

10 mL of the diluted solution is enough for 96 wells.

[(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution]

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

10 mL of the diluted solution is enough for 96 wells.

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

Dilute I volume of the concentrated Wash Solution (10 $\times$ ) to **10 volume** with deionized water (or distilled water) to prepare working solution. Example : 100 mL of concentrated Wash Solution (10 $\times$ ) 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 (A) Antibody-coated Plate by filling the wells with washing buffer and discard 4 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  $\mu\text{L}$  of properly diluted samples to the designated sample wells.
- (3) Pipette 50  $\mu\text{L}$  of standard solution to the wells designated for standards.
- (4) Shake the plate gently on a plate shaker (\*②).

- (5) Stick a Plate Seal (\*③) on the plate and incubate for 1 hour at 20°C - 25°C.
- (6) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (7) Pipette 50  $\mu$ L of Biotin-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  $\mu$ L of Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to all wells, and shake as step (4).
- (11) Stick a Plate Seal (\*③) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at 20°C - 25°C.
- (12) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (13) Pipette 50  $\mu$ L of (F) TMB Solution to wells, and shake as step (4).
- (14) Stick a Plate Seal (\*③) on the plate and incubate the plate for 20 minutes at 20°C - 25°C.
- (15) Add 50  $\mu$ L of the (H) Stop Solution to all wells and shake as step (4).
- (16) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620 nm (\*④)) immediately using a plate reader immediately.

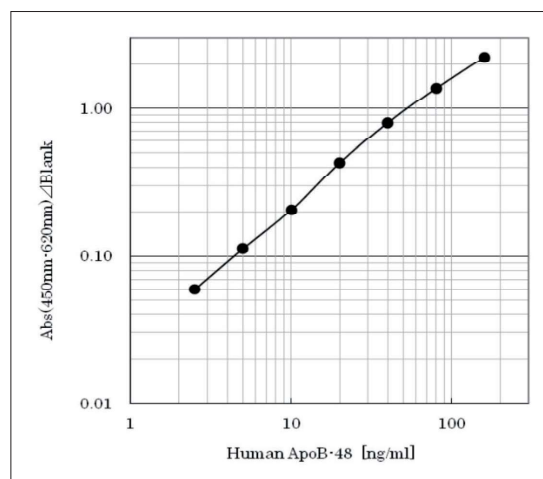
\* Refer to 16. Summary of Assay Procedure for notes of \*①, \*②, \*③, \*④ and \*⑤.

## 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 yellow 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-axis and absorbance on Y-axis.
- (2) Using the standard curve, read the Apo B-48 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.
- (3) Higher reaction temperature than 25°C tends to produce high absorbance on the whole. Though it depends on assay instruments, if coloring proceeds to area where there's low reliability of absorbance and slope of standard curve decreases, the area should not be used for calculation. Repeat assay by setting reaction temperature between 20°C - 25°C.



- \* 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.
- \* Physiological or pathological situation of human should be judged comprehensively taking other examination results into consideration.
- \* Human Apo B-48 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 Biotin-conjugated Antibody Solution, Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution, or TMB Solution might not be added.
  - 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of Biotin-conjugated Antibody Solution or Peroxidase-conjugated Streptavidin 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 chromogenic substrate reagent 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 (2.5 ng/mL).

Possible explanations :

Improper or inadequate washing. (Change washing frequency from 4 times to 5 - 8 times at the constant stroke after the reaction with Peroxidase-conjugated Streptavidin 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. References

1 : Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA.

Kinoshita, M. *et al.* : *Clinica Chimica Acta*, **351**, 115-120 (2005).

2 : Effects of intensive atorvastatin and rosuvastatin treatment on apolipoprotein B-48 and remnant lipoprotein cholesterol levels.

Otokozawa, S. *et al.* : *Atherosclerosis*, **205**, 197-201 (2009).

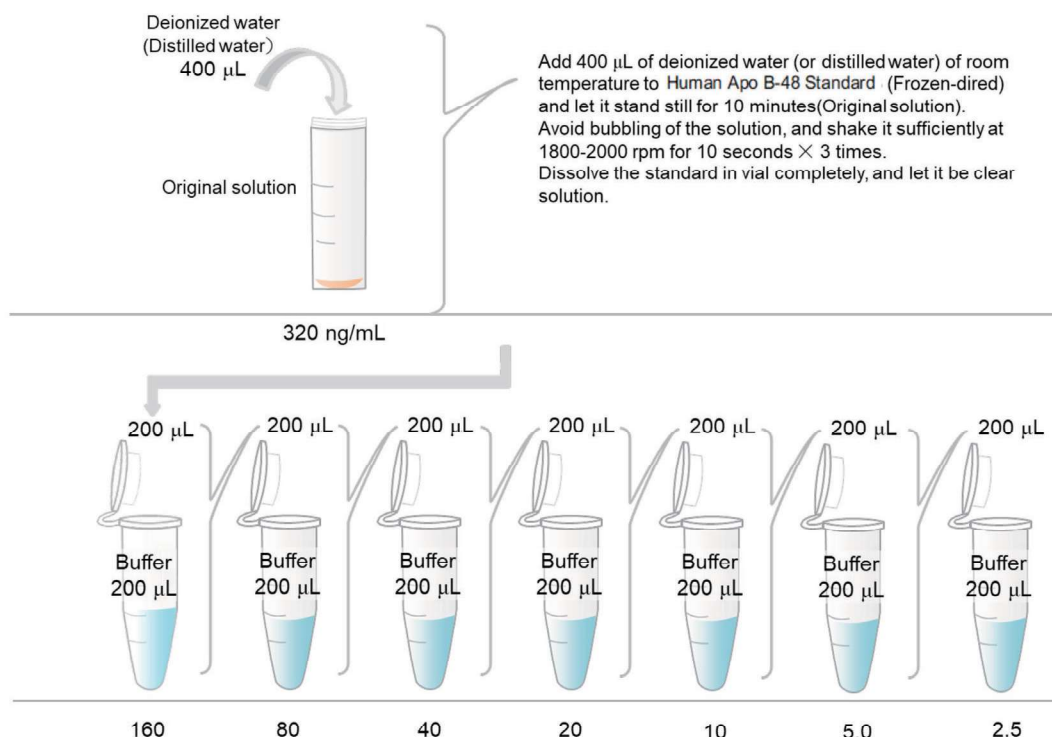
## 16. Summary of Assay Procedure : Use as a check box

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

Bring the (A) Antibody-coated Plate and all reagents back to 20°C - 25°C for 2 hours.

Wash Solution (10×) 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 4 times (\*①), (\*⑤)
- (Diluted) Samples, or Standards 50 μL
- ↓ Shaking (\*②), Incubation for 1 hour at 20°C - 25°C. (Standing (\*③))
- Dilute Biotin-conjugated Antibody Solution to **1 : 100** with (C) Buffer returned to 20°C - 25°C.  
(This should be prepared during incubation.)
- ↓ Washing 4 times (\*①), (\*⑤)
- Biotin-conjugated Antibody Solution (Diluted) 50 μL
- ↓ Shaking (\*②), Incubation for 1 hour at 20°C - 25°C. (Standing (\*③))
- Dilute Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to **1 : 100** with (C) Buffer returned to 20°C - 25°C.  
(This should be prepared during incubation.)
- ↓ Washing 4 times (\*①), (\*⑤)
- Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution (Diluted) 50 μL
- ↓ Shaking (\*②), Incubation for 30 minutes at 20°C - 25°C. (Standing (\*③))
- ↓ Washing 4 times (\*①), (\*⑤)
- TMB Solution (After dispense, the color turns to blue depending on the concentration.) 50 μL
- ↓ Shaking (\*②), Incubation for 20 minutes at 20°C - 25°C. (Standing (\*③))
- Stop Solution (After dispense, the color turns to yellow depending on the concentration.) 50 μL
- ↓ 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 4 times to 5 - 8 times at the constant stroke after the reaction with Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution. Standard of plate-washing pressure : 5 - 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.

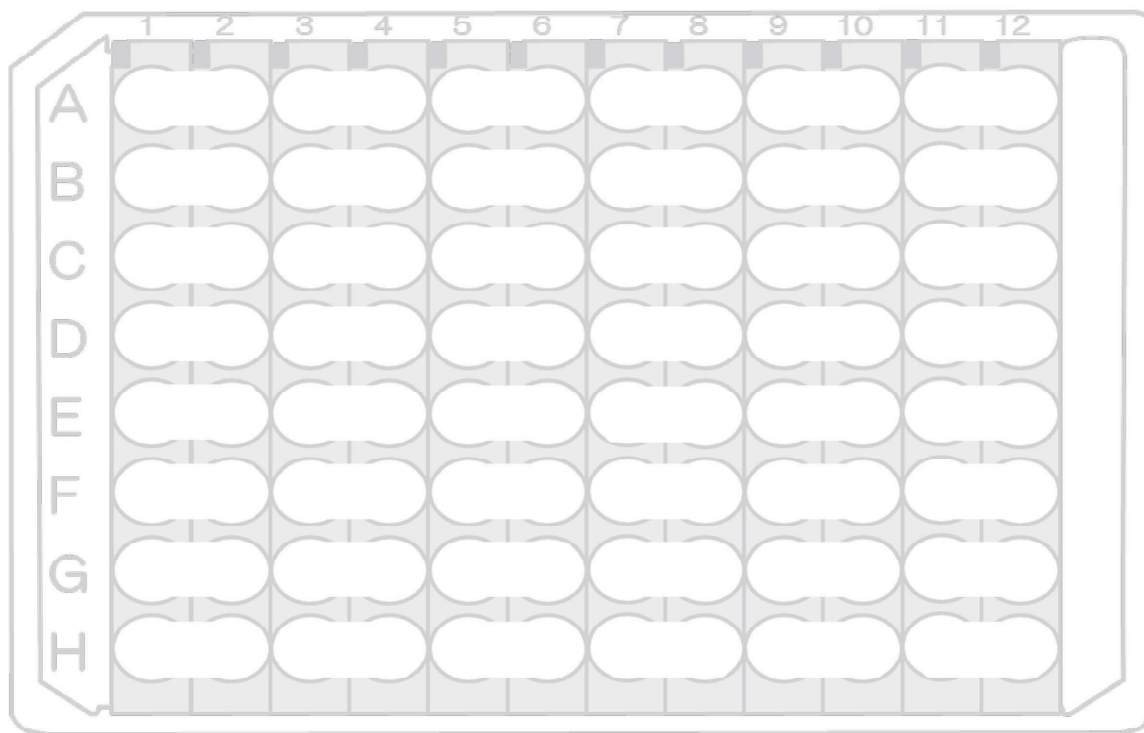
\*④ 600 nm - 650 nm can be used as reference wavelength.

\*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	160 ng/mL	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
B	80 ng/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
C	40 ng/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
D	20 ng/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
E	10 ng/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
F	5.0 ng/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
G	2.5 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



### 17. Storage and Expiration

The complete kit is stored at 2°C - 10°C (Do not freeze). Opened reagents should be used as soon as possible to avoid loss in optimal assay performance caused by storage environment.

LBIS™ Human Apo B-48 ELISA Kit

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

[Expiration date] Indicated on the label

[Package] For 96 tests

[Cat #] 298-88901

## Attention

### Very Important Points to Read before Starting Assay.

#### 1) Temperature

Bring all the reagent solutions up to room temperature (20°C - 25°C) before starting assay.

For this purpose, place and keep all the reagent solutions on a laboratory table for about two hours under the room temperature set at 22°C. Keep the reaction temperature between 20°C and 25°C.

#### 2) Reconstitution of the standard solution

The standard preparation attached to the kit is a frozen-dried material. Open the cap of the container, and add purified water as indicated (400 µL, room temperature). Fasten the cap, and let it stand for 10 minutes. Then vortex the container (1800 rpm - 2000 rpm 3 times for 10 seconds) under enough care not to form bubbles. Bubbling may cause denaturation of the protein. Confirm that the material is completely dissolved and solution is clear. Vortexing should be started from still-standing state. If you put the container on the rotating stirrer, it may cause bubbling.

#### 3) Samples

For collecting plasma samples, use heparin (final concentration : 10 µg/mL (1.2 U/mL) - 100 µg/mL), EDTA-2Na (final concentration : 1.0 mg/mL - 1.5 mg/mL), or EDTA-2K (final concentration : 1.1 mg/mL - 1.7 mg/mL). **Do not use citrate.** Use PP or PE tubes when samples are stored frozen. **(Do not use glass tubes.)**

#### 4) Preparation of standard solutions and dilution of samples

As the original reconstituted standard solution is highly viscous, start preparation of the standard solutions after getting used to measure highly viscous solution through enough training. Accurate measurement and delivery of the first 200 µL original standard solution is a very important step for preparation of the standard series. Co-washing method of pipetting written in the instruction paper of Eppendorf pipette is recommended. In every step of serial dilution, enough vortexing (1800 rpm - 2000 rpm 3 times for 10 seconds) is necessary. As the buffer used for dilution contains a surface active agent, enough attention must be paid to avoid bubble formation. Use a properly calibrated micropipette. Accurate pipetting is essential for excellent precision. Use exclusive (or matched) tips for your pipette. For the treatment of highly viscous solution, use tips with rather wide opening, and fix repeating of co-washing, pushing and releasing speed of pipetting, and angle of the pipette-holding. Refer to instruction paper of the pipette of your use for the exact operation and care. As a rule, preparation of the standard solutions, and preparation of assay samples must be done right before starting assay, and dilute the reagents (biotin-labelled anti-Apo B-48 antibody, peroxidase-conjugated avidin) during 2 hours' incubation for antigen-antibody reaction.

#### 5) Addition of standard solution, sample and reagent solution to wells

In pipetting above solutions, be careful not to cause bubble formation. Bubble formation may influence assay variation. For addition of reagent solutions, we recommend the use of a repeating dispenser like Eppendorf's Multipette Plus. In blowing out of the solution from the pipette, do not release the solution at the center of the well but at wall of the well, and then take out the pipette through "touch and go".

After addition of any reagent solution, shake the well plate on a plate shaker (800 rpm 3 times for 10 seconds). Adjust rotation speed to get the best mixing result without bubbling.

#### 6) Reaction period

The time counting should be started from the pipetting to the first well. But if the pipetting to a plate should take more than 15 minutes due to unexperienced situation, start time counting from the end of pipetting to the last well.

#### 7) Washing of the well plate

When you wash 96-well plate using an automatic plate washer, adjust the speed and pressure of pouring and sucking of washing buffer not to cause removal of solidified antibody due to excessive water stream, or increase the blank absorbance owing to incomplete washing, or causing big variation in coloring due to uneven washing. We recommend rather weak stream or pressure and more repeat. Never forget the maintenance of the apparatus with proper intervals. Be careful not to dry wells.

#### 8) Quality controls

We have LBIS™ Human Apo B-48 Control Set (Cat # 292-89009) as an option. This set contains high and low controls (250 µL each) and should be stored below -35°C. Expiration is 12 months from production and dilution is not necessary (already diluted). This will be helpful for your quality control in each assay.

---

### 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

Fuggenstrasse 12  
D-41468 Neuss  
Germany  
Telephone : +49-2131-311-0  
Facsimile : +49-2131-311100  
<http://www.wako-chemicals.de>



## レビス™ ヒトアポ B-48 ELISA キット

### 1. イントロダクション

血漿リポタンパク質 (plasma lipoprotein) とは一定の割合の脂質とタンパク質からなる複合体で血清脂質の輸送を担っています。その構造の表面にはアポリポタンパク質があり、リポタンパク質の構造の安定化や、リポタンパク質代謝に関連する酵素の活性化、細胞表面にあるリポタンパク質受容体との結合など重要な役割を果たしています。アポリポタンパク質 B48 (Apo B-48) は分子量 264,000、構造的には、他の肝臓由来の血漿リポタンパク質で内因性脂質を輸送する VLDL、LDL、HDL に存在するアポリポタンパク質 B100 の 48% のアミノ酸配列を持っています。食物等に由来する外因性脂質を肝臓や末梢組織に輸送するリポタンパク質キロミクロン (Chylomicron、CM) は小腸で作られますが Apo B-48 は CM に特異的な構造タンパク質です。従って Apo B-48 を測定することは摂食後のリポタンパク質の観察には最適です。また同一試料で LDL、HDL、コレステロールと B48 を測定することにより、外因性コレステロール、内因性コレステロールの変化を解析できます (参考文献 2)。心臓脈管系における粥状硬化症の原因の一つと見られている CM の残渣 (CM レムナント) の評価にも役立つと考えられています。

本キットはヒトアポリポタンパク B-48 (以下 Apo B-48 とする) 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 50 分です。
- ・ヒト血清または血漿 (クエン酸の使用はできません) 中の Apo B-48 を測定します。
- ・微量な検体で測定可能です。
- ・1 キットは 96 ウェルです。
- ・標準品はヒト由来のものであります。

### 2. 測定原理

本キットは標準品、希釈検体を抗 Apo B-48 モノクローナル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、ビオチン結合抗 Apo B-48 抗体を加え捕捉された Apo B-48 とともに 1 時間インキュベートします。洗浄後、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を加え、インキュベート後再度洗浄し、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 Apo B-48 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: Apo B-48 を 2.5ng/mL ~ 160ng/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 Apo B-48 に対して特異的です。ヒトアポリポタンパク B-100 との交差性は検出感度以下です。
- ・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 4 濃度の Apo B-48 を添加し測定した結果、回収率は 94.9% から 101%
- ・希釈直線性  
2 血清検体を連続的に希釈用緩衝液で 4 段階希釈し測定した結果、直線回帰の  $R^2$  は 0.996 と 0.999

### 4. 参考値

Apo B-48 測定値: 平均 4.60  $\mu$ g/mL SD 1.54  $\mu$ g/mL N 数: 18 空腹時

この説明書に引用されている測定値は一つの目安としてお使い下さい。採血条件、検体保管条件等で変動します。

### 5. ご使用前にご確認いただ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°C ~ 25°C (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ため、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薦めします。
- ・TMB 溶液は 96 ウェルプレートに使用するまでは薄い黄色澄明です。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、または指導者の方でご使用下さい。用手法操作で測定する際にはピペッティング操作の再現性が安定した方がご使用下さい。
- ・準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけて下さい。
- ・試薬類を皮膚に付けないで下さい。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で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。

## 6. 構成品

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	96wells (8×12) / 1 枚
(B) Human Apo B-48 Standard ヒト Apo B-48 標準品	凍結乾燥品 希釈後使用	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 μL / 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 μL / 1 本
(F) TMB Solution TMB 溶液	そのまま使用	12mL / 1 本
(H) Stop Solution 反応停止液	そのまま使用	12mL / 1 本
(I) Wash Solution (10×) 洗浄液 (10×)	希釈後使用	100mL / 1 本
(J) Plate Seal プレートシール	-	4 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）の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) ヒト Apo B-48 標準品

原則として用時調製です。各標準溶液調製後の保存はしないで下さい。残余溶液は廃棄して下さい。

#### (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) ビオチン結合抗体溶液、及び (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×)

(I) 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。

## 7. キット以外に必要な器具 □チェックリスト

□脱イオン水（または蒸留水） □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50 $\mu$ Lを正確にピペッティングできるもの、及び200～400 $\mu$ Lを正確にピペッティングできるもの） □連続分注ピペット（例 Eppendorf の multipette plus）、50 $\mu$ Lを連続分注できるもの □ペーパータオル等の吸水性のあるもの（洗浄後にプレートに残った液を取り除く） □攪拌器（Vortex タイプ） □マイクロプレート振とう器（約600rpm～1200rpm） □96 ウェルプレート用洗浄機（あれば好ましい）または噴射ピン □96 ウェルプレートリーダー（450nm $\pm$ 10nm、620nm：600nm～650nm） □データ計算用ソフトウェア

## 8. 検体の調製

本キットはヒト血清または血漿中の Apo B-48 を測定します。

- ・抗凝固剤は EDTA-2Na, EDTA-2K, ヘパリンをお勧めします（クエン酸は使用不可）。
- ・検体は定法にしたがって採取しすぐに測定するか、-35 $^{\circ}$ C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。
- ・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。
- ・検体を希釈する場合は、あらかじめ PP, PE 材質（ガラス製は使用不可）の試験管等において（C）緩衝液で希釈し測定ウェルに分注して下さい（（C）緩衝液で希釈した検体は粘性が強くなりますので、ピペッティングは注意して下さい）。希釈目安は100倍ですが、高値検体は200倍以上希釈が必要な場合があります。検体を希釈する際、泡立ちを防ぐよう注意しながら十分に攪拌（1800rpm～2000rpm-10秒3回）して下さい。
- ・溶血した検体や高脂質検体は異常値の発生原因となりますので避けて下さい。  
※血液成分の影響（高脂質・溶血等）を抑制するために原検体中の脂質（乳ビ）・溶血が高い場合は異常値発生の原因となる場合がありますので測定に使用しないで下さい。本キットの場合、溶血は160mg/dL以上で影響が現れます。

### 【検体の安定性と保存方法】

冷蔵保管すると Apo B-48 が失活しますので、最終濃度が100KIU/mL～500KIU/mLのアプロチニンを添加して保管して下さい（KIU：kallikrein inhibitor unit）。また、検体を長期に保管する場合は、-35 $^{\circ}$ C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。

## 9. 試薬の調製

- \*キットの試薬は使用前に必ず室温（20 $^{\circ}$ C～25 $^{\circ}$ C）に戻して下さい（2時間位が目安です）。
- \*6.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) ヒト Apo B-48 標準品；標準曲線作成用

(B) ヒト Apo B-48 標準品（凍結乾燥品）（1本）に室温化された脱イオン水（または蒸留水）400 $\mu$ Lを加え室温で10分間静置（標準溶液原液）。溶液の泡立ちを防ぐよう注意しながら十分に攪拌（1800rpm～2000rpm-10秒3回）して下さい。バイアル中の標準品が完全に溶解し、澄明な溶液となっていることを確認して下さい。

可溶化した標準溶液原液は冷蔵状態を保持し、24時間以内にご使用下さい。また、保管する場合は可溶化後速やかに-35 $^{\circ}$ C以下で凍結保存して下さい。

ヴォルテックスによる攪拌での注意点：バイアルをまずヴォルテックスに載せ、しかる後にスイッチを入れて攪拌を開始します。回転しているヴォルテックスにバイアルを載せることは泡立ちの原因となるので避けて下さい。

凍結乾燥標準品を可溶化した標準溶液原液は大変粘性が強いです。粘性が強い標準溶液のピペッティング操作に慣れてから各標準溶液を作成して下さい。標準溶液作成のために最初の200 $\mu$ Lの正確なピペッティング作業は大変重要なポイントです。

各標準溶液を作成する際に倍々希釈の全てのステップでヴォルテックスでの十分な攪拌（1800rpm～2000rpm-10秒3回）が必要です。ただし、攪拌中に泡立ちを起こさないよう充分注意して下さい。泡成ちは再現性低下要因となります。以下は各標準溶液調製例です。

標準溶液の容量	(C) 緩衝液	濃度 (ng/mL)
標準溶液原液 200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	160
160ng/mL 溶液 200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	80
80ng/mL 溶液 200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	40
40ng/mL 溶液 200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	20
20ng/mL 溶液 200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	10
10ng/mL 溶液 200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	5.0
5.0ng/mL 溶液 200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	2.5
0 (Blank)	200 $\mu$ L	0

#### (D) ビオチン結合抗体溶液

100  $\mu$ 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。

#### (E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

100  $\mu$ 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 $\times$ )

(I) 洗浄液 (10 $\times$ ) を室温化された脱イオン水 (または蒸留水) で **10 倍** に希釈して下さい。

例: 100mL の (I) 洗浄液 (10 $\times$ ) + 900mL の脱イオン水 (または蒸留水) (96 ウェル全てを使用する場合)

### 10. 測定操作法

洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意して下さい。

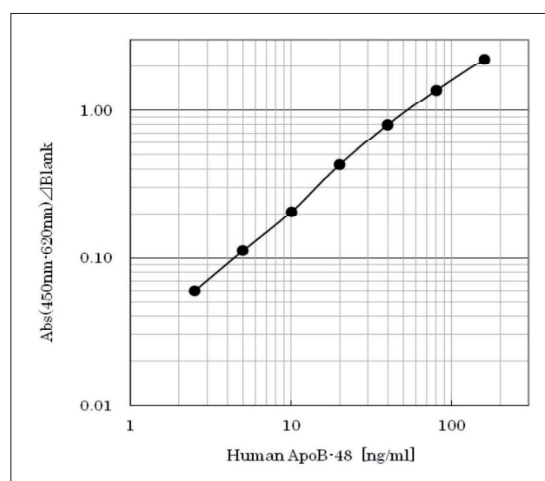
抗体固相化プレートのシールは、プレートが十分に室温に戻ってから剥がして下さい。

- (1) あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし、4 回洗浄 (\*①) します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
- (2) 検体測定ウェルに希釈検体を 50  $\mu$ L 添加します。
- (3) 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。
- (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、4 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 (\*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 4 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、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 (\*②) します。
- (11) プレートシールを貼り、室温 (20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) で 30 分間静置 (\*③) します。
- (12) 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 (\*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。
- (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 (\*②) します。
- (14) 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。
- (15) 各ウェルに反応停止液を 50  $\mu$ L ずつ分注し、発色反応を停止します。
- (16) 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、14. 測定手順概要とチェックリストをご参照下さい。

### 11. 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。
- (3) 反応温度が高い場合、吸光度が全体的に高くなります。測定機器により吸光度の信頼性のない領域まで発色が進み標準曲線の勾配が減少する場合は、その領域は計算に使用しないで下さい。また、反応温度を 20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C 範囲内にして再測定を実施して下さい。  
\* 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。  
\* ヒトの臨床所見は臨床症状や他の検査結果などを総合的に判断して行うことが必要です。  
\* グラフは標準曲線例です (吸光度は、測定環境により変動します)。  
\* プレートリーダーは SUNRISE RAINBOW (TECAN) を使用。



### 12. トラブルシューティングと Q&A

- すべてのウェルでの反応が弱い  
原因として考えられること
  - 1) 標準品や検体の入れ忘れ。
  - 2) 発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。

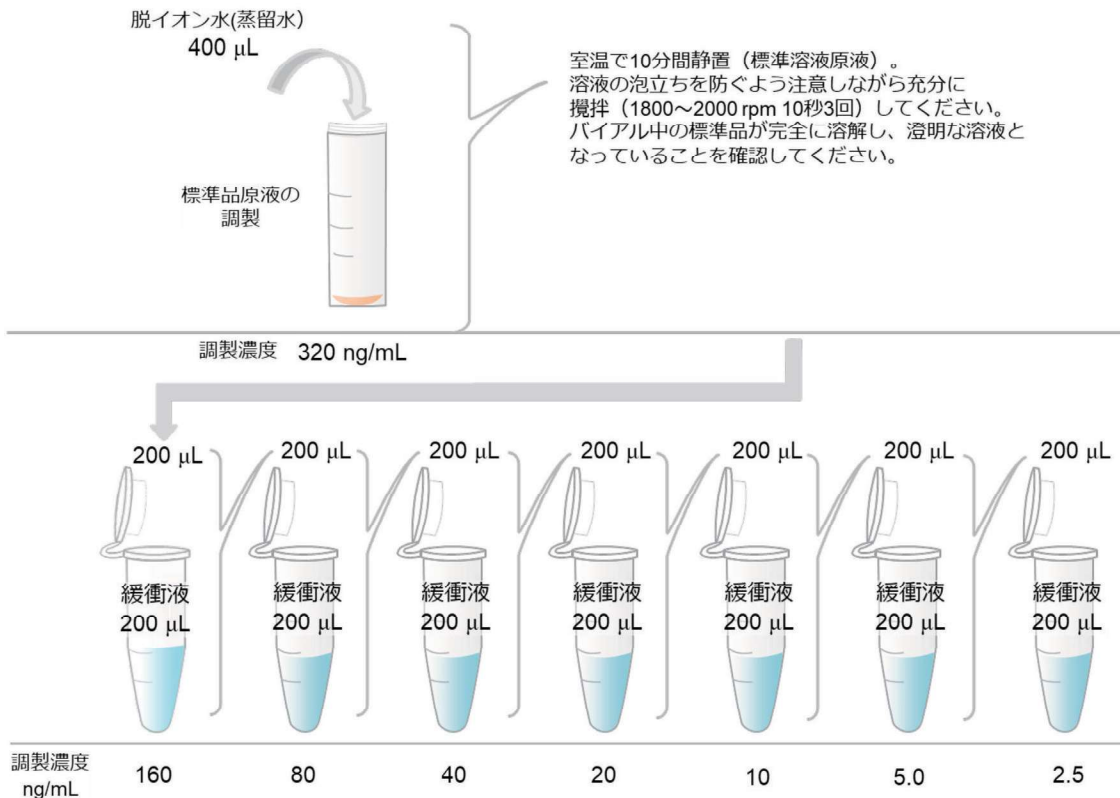
- 3) 発色に関連する試薬溶液の取り違いや希釈調製不良。
- 4) 酵素阻害剤の混入。
- 5) キット保管温度の影響（凍結した場合）。
- 6) プレートの過剰な洗浄。
- 7) TMB 溶液の温度が低かった。
- ・ 最小標準溶液濃度（2.5ng/mL）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。  
原因として考えられること  
洗浄が不適當、不完全であった。  
(ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5 回～8 回に増やして下さい。)
- ・ 変動係数 (CV) が大きい  
原因として考えられること
  - 1) 洗浄が不適當、不完全であった。
  - 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。

### 13. 参考文献

- 1: Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA.  
Kinoshita, M. *et al.* : *Clinica Chimica Acta*, **351**, 115-120 (2005).
- 2: Effects of intensive atorvastatin and rosuvastatin treatment on apolipoprotein B-48 and remnant lipoprotein cholesterol levels.  
Otokozawa, S. *et al.* : *Atherosclerosis*, **205**, 197-201 (2009).

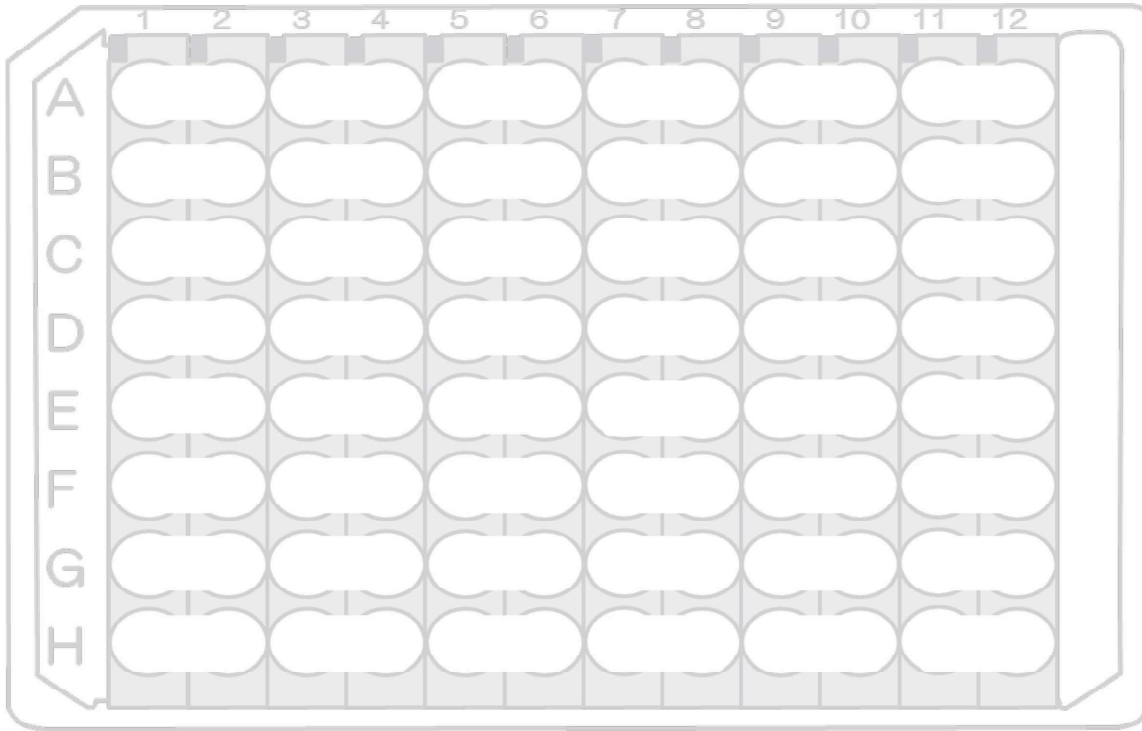
### 14. 測定手順概要とチェックリスト

- 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×）：室温化された脱イオン水（または蒸留水）で、**10倍**に希釈して下さい。
- 標準溶液の希釈（例）：  
標準品に室温化された脱イオン水（または蒸留水）を 400 μL 加え、溶解して下さい。



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 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注) \*①
  - 希釈検体またはヒト Apo B-48 標準品 50  $\mu$ L
  - ↓攪拌、室温 (20℃～25℃)、1 時間反応、静置 \*②\*③
  - (D) ビオチン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 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注) \*①
  - ビオチン結合抗体溶液 50  $\mu$ L
  - ↓攪拌、室温 (20℃～25℃)、1 時間反応、静置 \*②\*③
  - (E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液の希釈。室温化した (C) 緩衝液で、**100 倍**に希釈して下さい。  
希釈溶液の調製は第二反応中に行う。
  - ↓洗浄 4 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ストレプトアビジン溶液 50  $\mu$ L
  - ↓攪拌、室温 (20℃～25℃)、30 分間反応、静置 \*②\*③
  - ↓洗浄 4 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
  - 分注後、濃度により青色に変色 50  $\mu$ L
  - ↓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
  - 分注後、濃度により黄褐色に変色 50  $\mu$ L
  - ↓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。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  $\mu$ L / ウェルです。8 連等のマルチチャンネルピペットでの分注は洗浄不足によりブランク上昇の要因となりますのでご使用はお薦め致しません。万一、最小標準溶液濃度 (2.5ng/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ストレプトアビジン溶液と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5 回～8 回に増やして下さい。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5mL / 分～25mL / 分 (ノズルの径により異なります) です。第一反応後の初回の洗浄のみウェル間のコンタミに注意して下さい。
- (\*②) 攪拌の目安は 600rpm～1200rpm-10 秒間、3 回。
- (\*③) 攪拌終了後プレートシールを貼って静置して下さい。  
プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。



**15. 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™ ヒトアポ B-48 ELISA キット
- 【和光コード】 298-88901
- 【英語表記】 LBIS™ Human Apo B-48 ELISA Kit
- 【貯法】 2～10℃ 保存
- 【使用期限】 ラベルに記載
- 【包装】 96 回用

## LBIS™ Human Apo B-48 ELISA Kit測定のパラツキを小さくするための注意事項

- 取扱説明書と当注意事項は事前にご一読下さい。  
不明な点がありましたら弊社へお問い合わせ下さい。
- キット操作法について  
不明な点がありましたら弊社へお問い合わせ下さい。
- 温度について  
測定に使用するすべての試薬溶液とプレート測定開始までに20℃～25℃に戻して下さい。  
そのためには測定開始前に試薬溶液等を実験台の上に放置（2時間位が目安です）して下さい（室温を22℃として）。反応温度は20℃～25℃を厳守して下さい。
- 標準品の溶解について  
ヒト Apo B-48 標準品（凍結乾燥品）（1本）に室温化された脱イオン水（または蒸留水）400  $\mu$ L（室温）を加え室温で10分間静置。  
溶液の泡立ちを防ぐよう注意しながら十分に攪拌（1800rpm～2000rpm 10秒3回）して下さい。バイアル中の標準品が完全に溶解し、澄明な溶液となっていることを確認して下さい。  
可溶化した標準溶液原液（320ng/mL）を保存する場合は冷蔵状態を保持し、24時間以内にご使用下さい。また、保管する場合は可溶化後速やかに-35℃以下で凍結保存して下さい。  
ヴォルテックスによる攪拌での注意点：バイアルをまずヴォルテックスに載せ、しかる後にスイッチを入れて攪拌を開始します。回転しているヴォルテックスにバイアルを載せることは泡立ちの原因となるので避けて下さい。
- 検体  
血漿採血時はヘパリン（最終濃度：10  $\mu$ g/mL（1.2U/mL）～100  $\mu$ g/mL）、EDTA-2Na（最終濃度：1.0～1.5mg/mL）、EDTA-2K（最終濃度：1.1mg/mL～1.7mg/mL）を使用して下さい（クエン酸は使用禁）。  
検体はPP製又はPE製チューブに分注し冷凍保管して下さい（ガラス製は使用禁）。
- 標準溶液の調製と検体の希釈について  
可溶化した標準溶液原液は大変粘性が強いです。粘性が強い標準溶液のピペッティング操作に慣れてから各標準溶液を作製して下さい。各標準溶液作製のために最初の200  $\mu$ Lの正確なピペッティング作業は大変重要なポイントです。  
倍々希釈のすべてのステップでヴォルテックスでの十分な攪拌（1800rpm～2000rpm 10秒3回）が必要です。緩衝液には界面活性剤が含まれていますので、上記の注意事項を守って攪拌中に泡立ちを起こさぬよう充分注意して下さい。  
原則として用時調製です。各標準溶液作製後の保存はしないで下さい。残余溶液は廃棄して下さい。  
正しく調整されたマイクロピペットを使用して下さい。正確なピペッティングは良好な測定精度には不可欠です。  
チップはピペットメーカー専用チップをご使用下さい。粘性が大変強い標準品溶液を一定量ピペッティングするために先大チップを使用し、チップの共洗いの回数・ピペッティング動作のスピード・ピペットの傾斜を常に一定にして下さい。
- ウェルへの標準品、検体、試薬溶液の添加について  
標準溶液や検体、試薬溶液をウェルに加えるにあたっては泡立ちを起こさぬよう注意して下さい。泡立ちは測定結果のパラツキを大きくする可能性があります。試薬溶液の添加については、EppendorfのMultipette Plusのような連続分注用ピペットの使用をお勧めします。また試薬注入の場合ウェル中の液に直接注入しないで、ウェルの壁に向けて軽く注入し、タッチ・アンド・ゴーで分注して下さい。  
試薬の注入後、ウェルプレートをプレートシェーカーに載せて攪拌（800rpm 10秒3回）して下さい。回転速度も泡立ちを起こさず、かつ均質になるように調整して下さい。
- 反応時間  
反応時間の計測は、最初のウェルにピペッティングを開始したときから始めて下さい。しかしながら不慣れなどでピペッティングに15分以上時間がかかるようなら、最後のウェルに分注し終わったときから計測を開始して下さい。試薬の添加にはMultipette Plusのような連続分注用ピペットの使用をお勧めします。8連や12連のピペットは平行性に問題がありウェルの底を引き掻く可能性があります。
- 精度管理用コントロールセットについて  
ポジティブコントロールをご用意しております（別売品：LBIS™ Human Apo B-48 Control Set / Cat # 292-89009）。セットにはHighとLowが各1本入っています（各250  $\mu$ L / 1本）。凍結保管品です。融解後原液のまま使用できます。測定毎の精度管理にお役立て下さい。

製造発売元

**富士フイルム 和光純薬株式会社**  
大阪府中央区道修町三丁目1番2号  
Tel : 06-6203-3741