

Phosphorylated Tau T181 ELISA kit Wako

【Introduction】

Tau is a microtubule-associated protein that is mainly expressed in neurons in the central nervous system and regulates stability of microtubules. In the brain of patients with Alzheimer's disease, the aggregates of phosphorylated Tau, and neurofibrillary tangles are formed, and the extent of formation has been reported to correlate with severity of dementia. Therefore, Tau has been studied to investigate causes of Alzheimer's disease and to develop drugs for treating the disease. As the concentration of Tau and phosphorylated Tau in cerebrospinal fluid (CSF) of Alzheimer's disease patients is higher than that of non-dementia patients, it is important to measure the concentration of Tau and phosphorylated Tau in CSF. This product is high sensitive ELISA kit to measure Tau with phosphorylated threonine 181 (T181) in CSF.

【Kit Performance】

| | |
|----------------------------|----------------------------------|
| Range of calibration curve | 4.40 - 500 pg/mL |
| Measurement subject | Tau pT181 |
| Sample | Human cerebrospinal fluid (CSF)* |
| Sample volume | 20 μ L |
| Measurement time | 15-18h + 2h |
| Detection method | Luminescent system** |

*Not recommended for plasma and serum.

**Requires luminescence plate reader for measurement

【Kit Content】

| | Component | Condition | Volume or quantity |
|----|---|--------------------------|----------------------------------|
| 1 | Antibody-coated Plate | Use as is | 1 plate 96 wells (8 \times 12) |
| 2 | Phosphorylated Tau Standard | Use after reconstitution | 1 tube |
| 3 | Buffer | Use as is | 60 mL/1 bottle |
| 4 | Biotin-conjugated Antibody Solution | Use after preparation | 100 μ L/1 tube |
| 5 | Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution | Use after preparation | 100 μ L/1 tube |
| 6 | Luminescent Reagent 1 | Use as is | 6 mL/1 tube |
| 7 | Luminescent Reagent 2 | Use as is | 6 mL/1 tube |
| 8 | Wash Solution (20 \times) | Use after preparation | 50 mL/1 bottle |
| 9 | Standard Buffer (blue color) | Use as is | 12 mL/1 tube |
| 10 | Sample Buffer (red color) | Use as is | 50 mL/1 bottle |
| 11 | Plate Seal | | 3 sheets |
| 12 | Instruction for use | | 1 copy |

【Principle of assay】

On wells of an assay plate, anti-phosphorylated Tau T181 monoclonal antibody (epitope, Tau pT181) is immobilized. To these wells, the standard solution or sample and biotinylated anti-Tau monoclonal antibody (epitope, 211-231.a.a. or center part of Tau) are added for reaction. Then, peroxidase-conjugated streptavidin is added for reaction. Finally, by measuring the peroxidase activity in each well, a concentration of phosphorylated Tau T181 in the sample can be determined.

【Equipment or materials required but not supplied】

- Purified water (distilled water)
- Tubes for dilution of standard solution/specimen

- Glass apparatuses for dilution of washing solution (graduated cylinder and beaker)
- Pipets with a disposable tip (ones capable of accurately transferring 10 μ L and 100 to 500 μ L of liquid)
- Dispenser capable of dispensing 50 μ L or 100 μ L continuously
- Water-absorbable material such as paper towel (to remove liquid remaining on a plate after washing)
- Mixer (Vortex type)
- Microplate shaker (about 600 to 800 rpm)
- 96-well plate washer (if available) or bottle for washing
- 96-well plate reader (for luminescent assay)
- Data processing software

【Preparation methods of reagents】

Make sure that all kit reagents are brought to room temperature (20°C to 25°C) before use.

(1) Preparation of standard solutions

Reconstitute Phosphorylated Tau Standard with purified water as specified in Appendix* (to prepare the Standard Stock Solution at 10 ng/mL), and prepare the standard solutions by mixing with Standard Buffer provided in the kit as specified in the table below.

*Because the volume of purified water to be added differs from lot to lot, check the volume specified in the Appendix.

| Concentration in the standard solution (pg/mL) | Volume of the standard solution | Standard Buffer |
|--|--|-----------------|
| 500 | Stock solution (10 ng/mL) : 50 μ L | 950 μ L |
| 227 | Standard solution (500 pg/mL) : 200 μ L | 240 μ L |
| 103 | Standard solution (227 pg/mL) : 200 μ L | 240 μ L |
| 47.0 | Standard solution (103 pg/mL) : 200 μ L | 240 μ L |
| 21.3 | Standard solution (47.0 pg/mL) : 200 μ L | 240 μ L |
| 9.70 | Standard solution (21.3 pg/mL) : 200 μ L | 240 μ L |
| 4.40 | Standard solution (9.70 pg/mL) : 200 μ L | 240 μ L |
| 0.00 | — | 240 μ L |

(2) Biotin-conjugated Antibody Solution

Dilute this reagent 100 folds with Buffer.

(3) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

Dilute this reagent 100 folds with Buffer.

(4) Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2

Mix the Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 at the ratio of 1 : 1 (vol./vol.) 15 to 30 minutes before use.

Protect the mixture from light until use.

Example : Mix 6 mL each of the Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 (when all of 96 wells are used).

(5) Wash Solution (20 \times)

Dilute the Wash Solution (20 \times) 20 folds with purified water (distilled water) for use.

Example : Mix 50 mL of the Wash Solution (20 \times) with 950 mL of purified water (distilled water) (when all of 96 wells are used).

The other reagents are directly used.

【Stability of reagents and storage methods】

(1) Antibody-coated Plate

Unused antibody-immobilized strips (kept refrigerated and sealed) may be returned into the zip-seal bag provided in the kit and stored at 2°C to 10°C. They are stable within the shelf life.

(2) Phosphorylated Tau Standard

Reconstitute Phosphorylated Tau Standard with purified water as specified in Appendix* to prepare the Standard Stock Solution at 10 ng/mL. Then, prepare the standard solutions with the Standard Diluent provided in the kit, which has been brought to room temperature. For the volume of purified water to be added, see the Appendix. (*Because the volume of purified water to be added differs from lot to lot, check the volume specified in the Appendix.) Use the prepared standard solutions immediately and do not store these.

(3) Buffer

If a part of Buffer is used, transfer the volume slightly greater than needed to another container, immediately close the lid tightly without bringing the remaining Buffer to room temperature, and store at 2°C to 10°C. They are stable within the shelf life.

(4) Biotin-conjugated Antibody Solution and (5) 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 lid tightly without bringing the remaining Stock solution to room temperature, and store at 2°C to 10°C. They are stable within the shelf life. Discard the remaining diluted solutions if any.

(6) Luminescent Reagent 1 and (7) Luminescent Reagent 2

If the kit is divided for multiple assays, use these reagents for preparation just after taking out of the refrigerator, immediately close the lid tightly without bringing the remaining Luminescent Reagents to room temperature, and store at 2°C to 10°C. They are stable within the shelf life.

(8) Wash Solution (20×)

Store the Wash Solution (20×) with the lid tightly closed at 2°C to 10°C if applicable. They are stable within the shelf life. Discard the remaining diluted washing solution if any.

(9) Standard Buffer and (10) Sample Buffer

If the kit is divided for multiple assays, use these diluents for preparation just after taking out of the refrigerator, immediately close the lid tightly without bringing the remaining diluents to room temperature, and store at 2°C to 10°C. They are stable within the shelf life.

[Preparation method of samples]

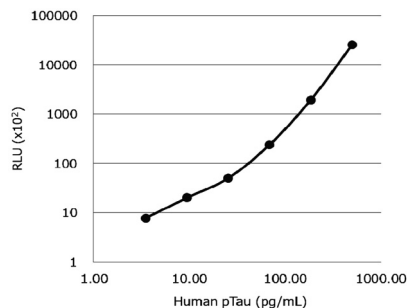
Dilute a sample 3 folds with the Sample Buffer (red) that has been brought to room temperature (example, 20 μL of sample + 40 μL of Sample Buffer).

[Assay procedure]

1. Fill each well of the Antibody-coated Plate with the prepared washing solution, and empty the wells. Repeat this washing operation 4 times. Then, reverse the plate, and tap it against paper towel lightly to remove the remaining liquid from the wells.
2. To the standard assay wells, dispense 50 μL of each standard solution as specified.
3. To the sample assay wells, dispense 50 μL of each sample diluted with the Sample Buffer (prepared sample) as specified.
4. Agitate the plate on a microplate shaker.
5. Affix a plate sealer onto the plate, and allow the plate to stand at 2°C to 10°C for 15 to 18 hours.
6. After end of the reaction, discard the reaction mixture, fill each well with the washing solution, and empty. Repeat this washing operation 4 times. Then, reverse the plate, and tap it against paper towel lightly to remove the remaining liquid from the wells.
7. To each well, dispense 50 μL of the biotin-conjugated antibody solution. Agitate the plate on a microplate shaker.
8. Affix a plate sealer onto the plate, and allow the plate to stand at room temperature (20°C to 25°C) for 90 minutes.

9. After end of the reaction, discard the reaction mixture, fill each well with the washing solution, and empty. Repeat this washing operation 4 times. Then, reverse the plate, and tap it against paper towel lightly to remove the remaining liquid from the wells.
 10. To each well, dispense 50 μ L of the peroxidase-conjugated streptavidin solution. Agitate the plate on a microplate shaker.
 11. Affix a plate sealer onto the plate, and allow the plate to stand at room temperature (20°C to 25°C) for 30 minutes.
 12. After end of the reaction, discard the reaction mixture, fill each well with the washing solution, and empty. Repeat this washing operation 4 times. Then, reverse the plate, and tap it against paper towel lightly to remove the remaining liquid from the wells.
 13. To each well, dispense 50 μ L of the prepared luminescent reagent mixture. Agitate the plate on a microplate shaker for 1 minute.
 14. After the agitation, determine luminescent intensities with a 96-well microplate reader (for luminescent assay). It is recommended to determine the intensities within 10 to 20 minutes after addition of the luminescent reagent mixture.
 15. Prepare the standard curve by plotting the concentration (pg/mL) in the standard solution on the horizontal axis and the luminescent intensity on the vertical axis. Read the concentration (pg/mL) corresponding to the luminescent intensity of the diluted sample. Multiply the read concentration by the dilution factor (3) to obtain the assay value.
- *It is recommended to use a polynomial of the 3rd degree or 4 or 5-parameter logistic fitting if the processing is performed by computer software.

Calibration curve (example)



【Precautions for use】

1. Use polypropylene containers when handling the sample. It is recommended to store the sample frozen at -35°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.
2. Centrifuge the sample to remove turbidity or insoluble matters where necessary before use for the assay.
3. 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 Sample Buffer.
4. The kit shall be used by personnel who have completed training for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or under supervision of a director.
5. If the assay is manually performed, personnel who handle a pipet in a reproducible and stable manner shall be engaged.
6. Wear gloves, glasses, and protective garment during preparation and operation with this kit.
7. Avoid skin contact with reagents. If contact of a reagent of this kit with the eye, mouth, wound, or skin occurs, provide a first-aid treatment such as immediately washing the contacted area with tap water thoroughly, and seek medical advice where necessary.

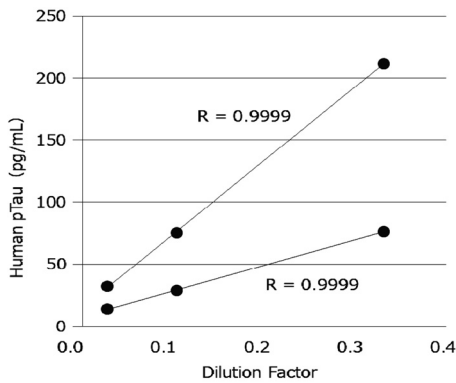
8. Do not drink, eat, or smoke in a place where this kit is used.
9. Handle the sample with proper care, being aware that the sample may have an infection risk. This kit contains animal-derived ingredients.
10. Soak used samples and consumables in 1% formalin, 2% glutaraldehyde or 0.1% or higher sodium hypochlorite solution for at least 1 hour. Or autoclave such materials for sterilization before discarding. Discard used consumables and unused chemical agents in accordance with rules of the facility as well as applicable local laws and regulations.
11. Do not use reagents with different lot numbers together. 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.
12. ELISA can be affected by assay environment. Ensure that room temperature at places for assay operation and incubation is strictly controlled at 20°C to 25°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.

【Examples of assay operation】

○ Spiked recovery test

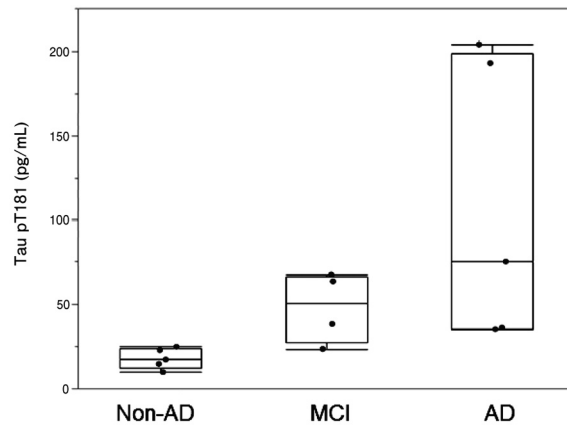
| | | | | | | | |
|-------------------------------|-------------|------------------------------|----------|-------------------------------|----------|-------------------------------|----------|
| Human cerebrospinal fluid [1] | None-spiked | Spiked with pTau at 20 pg/mL | | Spiked with pTau at 100 pg/mL | | Spiked with pTau at 200 pg/mL | |
| | Assay value | Assay value | Recovery | Assay value | Recovery | Assay value | Recovery |
| | 53.7 pg/mL | 73.4 pg/mL | 98.5% | 147 pg/mL | 93.3% | 271 pg/mL | 109% |
| Human cerebrospinal fluid [2] | None-spiked | Spiked with pTau at 20 pg/mL | | Spiked with pTau at 100 pg/mL | | Spiked with pTau at 200 pg/mL | |
| | Assay value | Assay value | Recovery | Assay value | Recovery | Assay value | Recovery |
| | 14.0 pg/mL | 32.8 pg/mL | 94.0% | 107 pg/mL | 93.0% | 225 pg/mL | 106% |

○ Dilution linearity



○ Assay of clinical samples

Cerebrospinal fluid samples from subjects without Alzheimer's disease (non-AD), patients with mild cognitive impairment (MCI), and those with Alzheimer's disease (AD) were assayed using this ELISA kit.



| | | | | | |
|--------------------|-------------|-----------------|-------------|----------------|------------|
| Non-AD1 | 22.8 | MCI1 | 23.5 | AD1 | 35.2 |
| Non-AD2 | 14.6 | MCI2 | 67.7 | AD2 | 36.2 |
| Non-AD3 | 9.70 | MCI3 | 38.4 | AD3 | 193 |
| Non-AD4 | 17.2 | MCI4 | ND | AD4 | 75.0 |
| Non-AD5 | 24.8 | MCI5 | 63.6 | AD5 | 204 |
| Non-AD mean | 17.8 | MCI mean | 48.3 | AD mean | 109 |

→ A significant difference was observed in assay value between non-AD subjects and AD patients.

[Outline of assay procedure]

- Bring the plate and reagents to room temperature (20°C to 25°C) adequately.
- Dilution of Wash Solution (20×) : Dilute it 20 folds with purified water that has been brought to room temperature.
- Dilution of the standard solution (example) : Reconstitute the Phosphorylated Tau Standard with purified water as specified in Appendix* (to prepare the Phosphorylated Tau Standard Stock Solution at 10 ng/mL), and prepare the standard solutions by mixing with the Standard Buffer provided in the kit as specified in the table below.

| Example of dilution | Concentration (pg/mL) | 500 | 227 | 103 | 47.0 | 21.3 | 9.70 | 4.40 | 0 |
|------------------------|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| Standard solution (μL) | Stock solution: 50 | 200* | 200* | 200* | 200* | 200* | 200* | 200* | 0 |
| Standard Buffer (μL) | | 950 | 240 | 240 | 240 | 240 | 240 | 240 | 300 |

*: Standard solution at a 1-step higher concentration

- Dilute a sample 3 folds with the Sample Buffer (red) that has been brought to room temperature (example, 20 μL of sample + 40 μL of Sample Buffer).
- Antibody-coated Plate**
- ↓ Washing 4 times (*[1])
- Standard solution or prepared sample 50 μL/well**
- ↓ Agitation (*[2]) and incubation at 2°C to 10°C for 15 to 18 hours (*[3])
- ↓
- *Preparation of biotin-conjugated antibody solution (dilute 100 folds with Buffer that has been brought to room temperature)
- ↓ Washing 4 times (*[1])
- Biotin-conjugated antibody solution 50 μL/well**
- ↓ Agitation (*[2]) and incubation at room temperature (20°C to 25°C) for 90 minutes (*[3])
- ↓

- *Preparation of peroxidase-conjugated streptavidin solution (dilute 100 folds with Buffer that has been brought to room temperature)
 - ↓ Washing 4 times (*[1])
 - Peroxidase-conjugated streptavidin solution 50 μ L/well**
 - ↓ Agitation (*[2]) and incubation at room temperature (20°C to 25°C) for 30 minutes (*[3])
↓
 - *Preparation of luminescent reagent mixture (mix the Luminescent Reagent 1 and Luminescent Reagent 2 at the ratio of 1: 1 [vol./vol.])
 - ↓ Washing 4 times (*[1])
 - Luminescent reagent mixture 50 μ L/well**
 - ↓ Agitation at room temperature (20°C to 25°C) for 1 minute.
 - Measurement of luminescent intensity (measure between 10 and 20 minutes after addition)**
- (*[1]) In each washing operation, dispense the washing solution 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 μ L may be appropriate for dispensing the washing solution into each well.
- (*[2]) Three repeats of agitation at 600 to 800 rpm for 10 seconds may be appropriate.
- (*[3]) After agitation, affix a plate sealer, and allow it to stand. 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]

Stored 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://www.wako-chem.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>

りん酸化 Tau T181 ELISA キットワコー

【はじめに】

Tau は、微小管結合タンパク質の一つで、主に中枢神経系の神経細胞に発現しており、微小管の安定性を制御しています。アルツハイマー病患者の脳では、りん酸化 Tau が蓄積した神経原線維変化が形成され、その出現の程度が認知症の重症度と相関すると報告されています。そのため、Tau はアルツハイマー病の原因究明や治療薬開発のために研究されています。一方、脳脊髄液中の総 Tau とりん酸化 Tau の濃度はアルツハイマー病患者では非認知症患者よりも上昇すると報告されています。本品は 181 番目のスレオニン (T181) がりん酸化された Tau を簡便に測定可能な ELISA キットです。

【キット性能】

| | |
|--------|-------------------|
| 検量線範囲 | 4.40 ~ 500 pg/mL |
| 測定対象 | Tau pT181 |
| 測定対象検体 | ヒト脳脊髄液 (CSF)* |
| 必要検体量 | 20 μ L |
| 測定時間 | 15 ~ 18 時間 + 2 時間 |
| 検出法 | 発光系** |

* 血漿、血清サンプルでの測定不可

** 測定には発光プレートリーダーが必要です。

【キット内容】

| | 構 成 品 | 状 態 | 容 量 |
|----|---|--------|---------------------------------|
| 1 | Antibody-coated Plate/ 抗体固相化プレート | そのまま使用 | 1 プレート 96 wells (8 \times 12) |
| 2 | Phosphorylated Tau Standard / りん酸化 Tau 標準品 | 溶解後使用 | 1 本 |
| 3 | Buffer/ 緩衝液 | そのまま使用 | 60 mL/1 本 |
| 4 | Biotin-conjugated Antibody Solution/ ビオチン結合抗体溶液 | 調製後使用 | 100 μ L/1 本 |
| 5 | 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 | 調製後使用 | 100 μ L/1 本 |
| 6 | Luminescent Reagent 1/ 発光試薬 1 | そのまま使用 | 6 mL/1 本 |
| 7 | Luminescent Reagent 2/ 発光試薬 2 | そのまま使用 | 6 mL/1 本 |
| 8 | Wash Solution (20 \times) / 洗浄液 (20 \times) | 調製後使用 | 50 mL/1 本 |
| 9 | Standard Buffer/ 標準品調製液 (青色) | そのまま使用 | 12 mL/1 本 |
| 10 | Sample Buffer / 検体調製液 (赤色) | そのまま使用 | 50 mL/1 本 |
| 11 | プレートシール | | 3 枚 |
| 12 | 取扱説明書 | | 1 部 |

【測定原理】

測定プレートの中には抗りん酸化 Tau T181 モノクローナル抗体 (エピトープ: Tau pT181) 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 Tau モノクローナル抗体 (エピトープ: Tau 中央部分、211-231aa) 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、検体中のりん酸化 Tau T181 の濃度を求めることができます。

【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 10 μ L を正確にピペッティングできるもの、および 100 ~ 500 μ 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、50 μ L、100 μ 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 600 ~ 800 rpm）
- 96 ウエルプレート用洗浄機（あれば好ましい）または洗浄瓶
- 96 ウエルプレートリーダー（発光測定用）
- データ処理ソフトウェア

【試薬類の調製法】

キットの試薬は使用前に必ず室温（20 ~ 25℃）に戻してください。

(1) 標準溶液の調製

標準品に精製水を別紙に記載の指定量*を加え溶解（標準品原液：10 ng/mL）し、その後キット添付標準品調製液で各濃度の標準溶液を下記のように混合して標準溶液を調製して下さい。

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

| 標準溶液濃度 (pg/mL) | 標準溶液の容量 | 標準品調製液 |
|----------------|--------------------------------|-------------|
| 500 | 原液 (10 ng/mL) : 50 μ L | 950 μ L |
| 227 | 500 pg/mL の標準溶液 : 200 μ L | 240 μ L |
| 103 | 227 pg/mL の標準溶液 : 200 μ L | 240 μ L |
| 47.0 | 103 pg/mL の標準溶液 : 200 μ L | 240 μ L |
| 21.3 | 47.0 pg/mL の標準溶液 : 200 μ L | 240 μ L |
| 9.70 | 21.3 pg/mL の標準溶液 : 200 μ L | 240 μ L |
| 4.40 | 9.70 pg/mL の標準溶液 : 200 μ L | 240 μ L |
| 0.00 | — | 240 μ L |

(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。

(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。

(4) 発光試薬 1 および発光試薬 2

使用する 15 ~ 30 分前に、発光試薬 1 と発光試薬 2 を 1:1 (vol./vol.) で混合してください。使用するまで遮光しておいてください。

例：発光試薬 1（6 mL）：発光試薬 2（6 mL）の混合（96 ウエル全てを使用する場合）

(5) 洗浄液（20 \times ）

精製水（蒸留水）で 20 倍に希釈して使用してください。

例：50 mL の濃縮洗浄液（20 \times ） + 950 mL の精製水（蒸留水）（96 ウエル全てを使用する場合）

その他の試薬はそのまま使用します。

【試薬の安定性と保存方法】

(1) 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バックに戻し、そのまま 2 ~ 10℃ で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(2) 標準品

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（10 ng/mL）を調製して下さい。その後室温化されたキット添付標準品調製液で調製して下さい。加える

精製水の量は別紙をご参照ください。（*ロットにより精製水を添加する量が異なりますので、別紙に記載の指定量をご確認ください。）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。

(3) 緩衝液

溶液の一部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。有効期限内安定性を保ちます。

(4) ビオチン結合抗体溶液および (5) 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。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(6) 発光試薬 1 および (7) 発光試薬 2

キットを分割して使用する際は冷蔵庫より取り出し調製をしてください。残りの発光試薬は室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(8) 洗浄液 (20×)

洗浄液 (20×) 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。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

(9) 標準品調製液および (10) 検体調製液

キットを分割して使用する際は冷蔵庫より取り出し、調製をしてください。残りの調製液は室温に戻さず、直ちに蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

【検体調製方法】

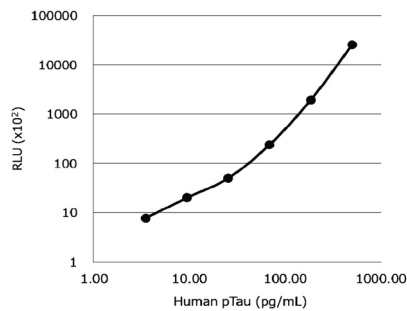
検体を室温化した検体調製液（赤色）で3倍に希釈します（例 検体：20 μL + 検体調製液：40 μL）。

【測定操作】

1. 抗体固相化プレートにあらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし、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 μL ずつ分注します。
3. 検体測定ウェルに検体調製液で希釈した検体（調製済み検体）を 50 μL ずつ分注します。
4. マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌します。
5. プレートシールを貼り、2～10℃で 15～18 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 μL 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 90 分間静置します。
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 μL 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、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。
13. 各ウェルに混和調製した発光試薬を 50 μL ずつ分注します。マイクロプレート振とう器を用いて 1 分間、攪拌します。

14. 攪拌後、96 ウェルマイクロプレートリーダー（発光測定用）で発光強度を測定します。発光試薬添加後、10分～20分の間での測定を推奨します。
15. X軸を標準溶液濃度（pg/mL）、Y軸を発光強度の標準曲線を作成します。希釈検体の発光強度に対応する濃度（pg/mL）を読み取ります。読み取った濃度に検体希釈率（3倍）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。

検量線（例）



【使用上の注意】

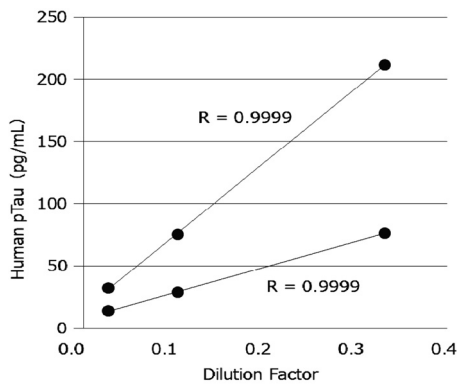
1. 検体を入れる容器はポリプロピレン製のものを使用してください。長期に保管する場合は、 -35°C 以下での凍結保管を推奨します。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。凍結した検体は測定する直前に解凍し十分に攪拌して下さい。また検体は用時調製して下さい。
2. 濁り及び不溶解物のある検体は遠心分離等で除去後測定に用いて下さい。
3. 妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、2種以上の異なる希釈率で希釈直線性を確認して下さい。調製済み検体の希釈は検体調製液で行ってください。
4. キットはELISA法の研修を終了した方、または指導者の方でご使用下さい。
5. 的手法操作で測定する際にはピペティング操作の再現性が安定した方がご使用下さい。
6. 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。
7. 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、必要場合は医師の指導を受けて下さい。
8. 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。
9. 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。
10. 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。
11. ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。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。
12. ELISA法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温： $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ （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（エアコン風も含む）低湿度の環境下での測定は避けて下さい。

【測定例】

○ 添加回収試験

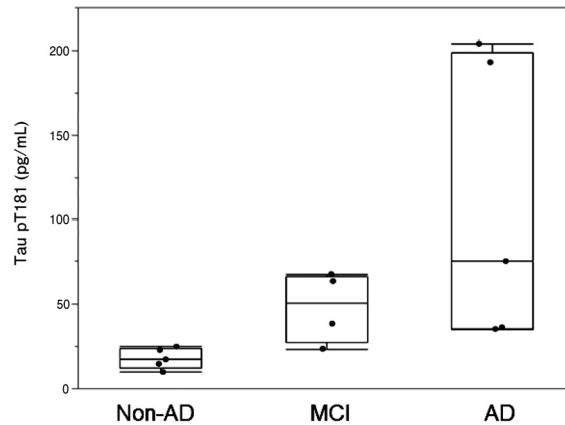
| | | | | | | | |
|-------------|------------|------------------|-------------------|-------------------|----------|-----------|----------|
| ヒト脳脊髄液 ① | 未添加 | 20 pg/mL pTau 添加 | 100 pg/mL pTau 添加 | 200 pg/mL pTau 添加 | | | |
| | 測定値 | 測定値 | Recovery | 測定値 | Recovery | 測定値 | Recovery |
| | 53.7 pg/mL | 73.4 pg/mL | 98.5% | 147 pg/mL | 93.3% | 271 pg/mL | 109% |
| ヒト脳脊髄液 ② | 未添加 | 20pg/mL pTau 添加 | 100 pg/mL pTau 添加 | 200 pg/mL pTau 添加 | | | |
| | 測定値 | 測定値 | Recovery | 測定値 | Recovery | 測定値 | Recovery |
| | 14.0 pg/mL | 32.8 pg/mL | 94.0% | 107 pg/mL | 93.0% | 225 pg/mL | 106% |

○ 希釈直線性



○ 臨床検体での測定

非認知症者 (non-AD)、軽度認知障害患者 (MCI)、アルツハイマー病患者 (AD) の脳脊髄液を本 ELISA で測定した。



| | | | | | |
|-----------|------|--------|------|-------|------|
| Non-AD1 | 22.8 | MCI1 | 23.5 | AD1 | 35.2 |
| Non-AD2 | 14.6 | MCI2 | 67.7 | AD2 | 36.2 |
| Non-AD3 | 9.70 | MCI3 | 38.4 | AD3 | 193 |
| Non-AD4 | 17.2 | MCI4 | ND | AD4 | 75.0 |
| Non-AD5 | 24.8 | MCI5 | 63.6 | AD5 | 204 |
| Non-AD 平均 | 17.8 | MCI 平均 | 48.3 | AD 平均 | 109 |

→ 非認知症者とアルツハイマー病患者間で測定値に有意差が見られた。

【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（20×）の希釈：室温化した精製水で、20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：10 ng/mL）、その後キット添付標準品調製液で各濃度の標準溶液を下記のように混合して標準溶液を調製して下さい。

| 希釈例 | 濃度(pg/mL) | 500 | 227 | 103 | 47.0 | 21.3 | 9.70 | 4.40 | 0 |
|------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| 標準溶液(μL) | 原液: 50 | 200* | 200* | 200* | 200* | 200* | 200* | 200* | 0 |
| 標準品調製液(μL) | | 950 | 240 | 240 | 240 | 240 | 240 | 240 | 300 |

*:ひとつ高濃度の標準溶液

- 検体を室温化した検体調製液（赤色）で3倍希釈（例 検体：20 μL + 検体調製液：40 μL）
 - 抗体固相化プレート**
 - ↓ 洗浄 4 回（*①）
 - 標準溶液または調製済み検体 50 μL/ ウェル**
 - ↓ 攪拌（*②）、2～10℃、15～18 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 倍希釈して下さい）
 - ↓ 洗浄 4 回（*①）
 - ビオチン結合抗体溶液 50 μL/ ウェル**
 - ↓ 攪拌（*②）、室温（20～25℃）、90 分間反応、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/ ウェル**
 - ↓ 攪拌（*②）、室温（20～25℃）、30 分間反応、静置（*③）
 - ↓
 - * 発光試薬の調製（発光試薬 1：発光試薬 2 = 1：1（vol./vol.）に混和調製）
 - ↓ 洗浄 4 回（*①）
 - 発光試薬 50 μL/ ウェル**
 - ↓ 1 分間 攪拌 室温（20～25℃）
 - 発光強度測定（10 分～20 分の間に測定）**
- （*①） 洗浄毎に洗浄液をウェルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。4 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後はウェルの乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300 μL/ ウェルです。
- （*②） 攪拌の目安は 600～800 rpm-10 秒間、3 回。
- （*③） 攪拌終了後プレートシールを貼り静置して下さい。プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

【貯 法】

2-10℃保存

【使用期限】

ラベルに記載

【包 装】

96 回用

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

1905KA1