

[LBIS Bovine Albumin ELISA Kit]

Cat # 631-07091

Please, read this instruction carefully before use.

This kit is manufactured by FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation. Use only the current version of Instruction Manual enclosed with the kit!

1. Intended use

LBIS Bovine Albumin ELISA Kit is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of bovine albumin. This is intended for research use only.

2. Storage and expiration

When the complete kit is stored at 2°C - 8°C, the kit is stable until the expiration date shown on the label on the box. Opened reagents should be used as soon as possible to avoid loss in optimal assay performance caused by storage environment.

3. Introduction

Albumin is mostly a simple hydrophilic protein present in cells and body fluids. Albumin is synthesized in the liver, and serum albumin (69 kDa, 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 the transfer of these substances. Bovine albumin is generally thought to be an inert protein and is commonly used in various incubation media, and especially calf serum is very important component of tissue culture media. This means that if some substances are prepared using tissue- or cell-culture technique, they possible contaminated with bovine albumin. In order to assure product purity bovine albumin in the product has to be estimated. The present highly sensitive ELISA kit will be useful in this kind of estimation.

4. Assay principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS Bovine Albumin ELISA Kit, standards or 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 chromogen (TMB) for 30 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.

5. 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. 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 chromogen (TMB) substrate reagent 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

LBIS Bovine Albumin ELISA Kit

strictly. Avoid airstream velocity over 0.4 m/sec. (including wind from air conditioner), and humidity less than 30 %.

6. Reagents supplied

Components	State	Amount
(A) Anti-albumin-coated plate	Use after washing	96 wells/1 plate
(B) Standard bovine albumin (500 ng/mL) (derived from bovine)	Concentrated. Use after dilution.	200 µL/1 vial
(C) Buffer solution	Ready for use.	60 mL/1 bottle
(D) HRP-labeled anti-albumin antibody	Concentrated. Use after dilution.	200 µL/1 vial
(F) Chromogen (TMB)	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(H) Stop solution Be careful!	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(I) Wash stock solution (10×)	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle
Plate seal	—	3 sheets
Instruction Manual	—	1 copy

7. 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 stock solution (10×) (a graduated cylinder, a bottle)
- Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 50 µL precisely, and another for 50 µL- 500 µL.
- Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipipette plus which can dispense 100 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.

8. 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) Standard bovine albumin (500 ng/mL)]

Below is an example of preparing each standard solution.

Volume of standard solution	Buffer solution	Concentration (ng/mL)
Original solution 50 µL	450 µL	50
50 ng/mL solution 250 µL	250 µL	25
25 ng/mL solution 250 µL	250 µL	12.5
12.5 ng/mL solution 250 µL	250 µL	6.25
6.25 ng/mL solution 250 µL	250 µL	3.13
3.13 ng/mL solution 250 µL	250 µL	1.56
1.56 ng/mL solution 250 µL	250 µL	0.78
Blank	250 µL	0

[(D) HRP-labeled anti-albumin antibody]

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

[(I) Wash stock solution (10×)]

Dilute 1 volume of the concentrated Wash stock solution (10×) to **10 volume** with deionized water (or distilled water) to prepare working solution. Example: 100 mL of concentrated washing buffer (10×) and 900 mL of deionized water (or distilled water).

[Storage and stability]

[(A) Anti-albumin 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 - 8 °C. The strip will be stable until expiration date.

LBIS Bovine Albumin ELISA Kit

[(B) Standard bovine albumin (500 ng/mL)]

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

Dispose remaining prepared solution.

[(C) Buffer solution] and [(F) Chromogen (TMB)]

Use only volume you need for your assay. Remaining reagents should be stored at 2 °C - 8 °C fastening the cap tightly. It remains stable until expiration date. Once opened, we recommend using as soon as possible to avoid influence by environmental condition.

[(D) HRP-labeled anti-albumin antibody]

Unused working solution (already diluted) should be disposed. The rest of the undiluted solution: if stored tightly closed at 2 °C - 8 °C, it is stable until expiration date.

[(H) Stop solution]

Close the stopper tightly and store at 2 °C - 8 °C. It maintains stability until expiration date.

[(I) Wash stock solution (10×)].

The rest of undiluted buffer: if stored tightly closed at 2 °C - 8 °C, it is stable until expiration date.

Dispose any unused diluted buffer.

9. 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 - 8 °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 chromogen (TMB) 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 × 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.

10. Preparation of samples

This kit is intended to measure minute albumin in bovine samples such as tissue- or cell-culture products. Adjust your samples' pH within 6.5 - 8.0. A small sample volume 100 µL is needed as standard procedure.

Note that this kit is too sensitive to measure bovine serum or plasma. If you would like to measure them, they should be diluted about 1 000 000×. They need to be diluted using the kit's buffer so as to be within the assay range, 0.78 ng/mL - 50 ng/mL.

Samples should be immediately assayed or stored below -35 °C until assay. Before starting assay, stir thawed samples sufficiently. Do not repeat freeze-and-thaw cycles. Dilution of a sample should be made in a test tube using buffer solution prior to adding them to wells.

Hemolytic and hyperlipemic serum samples are not suitable. Turbid samples or those containing insoluble materials should be centrifuged before testing to remove any particulate matter.

11. Assay procedure

Remove the cover sheet of the antibody-coated plate after bringing up to room temperature.

- (1) Wash the anti-albumin-coated plate (A) by filling the wells with washing buffer and discard 4 times (*②), then strike the plate upside-down onto folded several sheets of paper towel to remove residual buffer in the wells.
- (2) Pipette 100 µL of standard solution to the wells designated for standards, and 100 µL of samples to the designated sample wells.
- (3) Shake the plate gently on a plate shaker (*③).
- (4) Stick a plate seal (*④) on the plate and incubate for 1 hour at 20 °C - 25 °C.
- (5) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).

LBIS Bovine Albumin ELISA Kit

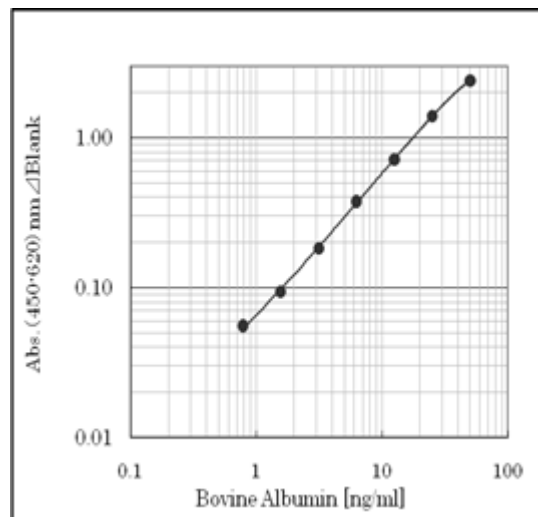
- (6) Pipette 100 μ L of HRP-labeled anti-albumin antibody to all wells, and shake as step (3).
- (7) Stick a plate seal (*④) on the plate and incubate the plate for 1 hour at 20 $^{\circ}$ C - 25 $^{\circ}$ C.
- (8) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (9) Pipette 100 μ L of chromogen (TMB) to wells, and shake as step (3).
- (10) Stick a plate seal (*④) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at 20 $^{\circ}$ C - 25 $^{\circ}$ C.
- (11) Add 100 μ L of the stop solution to all wells to stop the coloration.
- (12) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620 nm*) using a plate reader immediately.

*Refer to the page 6 for notes of *②, *③ and *④.

12. 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 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.
- * Physiological or pathological situation of bovine should be judged comprehensively taking other examination results into consideration.



13. Performance characteristics

- Assay range
The assay range of the kit is 0.78 ng/mL - 50 ng/mL.
- Specificity
The antibodies used in this kit are specific to albumin.

Sample	Cross reaction
Bovine albumin	100 %
Mouse albumin	Less than 0.05 %
Rat albumin	Less than 0.05 %
Human albumin	Less than 0.05 %

*Cross reaction at 1000 ng/mL

- Precision of assay
Within assay variation (4 samples, 5 replicates assay), Mean CV was within 10 %
- Reproducibility
Between assay variation (3 samples, 4 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 91 %~104 %
- Dilution test
Serum sample was serially diluted by 4 steps.
The dilution curves showed linearity with $R^2 = 0.9977 - 0.9996$.

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 HRP-labeled anti-albumin antibody or chromogen (TMB) might not be added.
 - 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of HRP-labeled

LBIS Bovine Albumin ELISA Kit

anti-albumin antibody.

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 (0.78 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 HRP-labeled anti-albumin antibody.)

- 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.

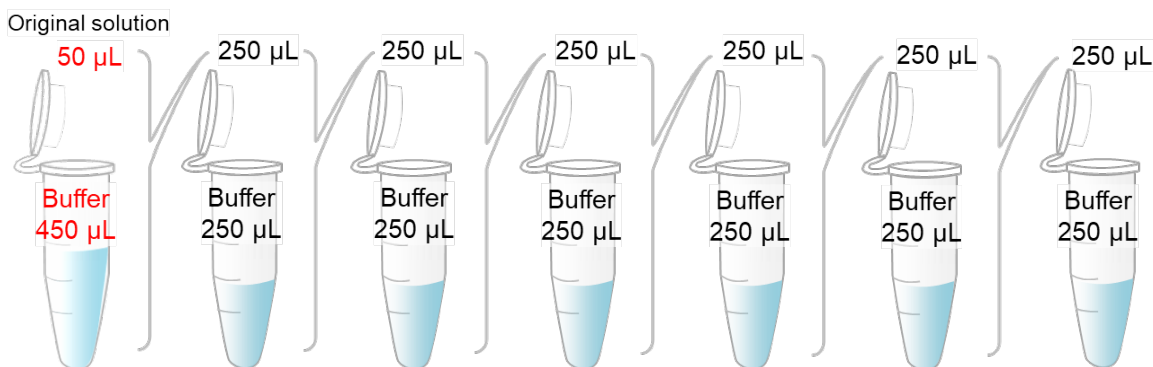
- Q-2: I found 96 well-plate is empty when I opened the box.

A-2: As this kit is dried type, not preservation stabilizer is added.

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 stock 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:



Concentration ng/mL	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78
---------------------	----	----	------	------	------	------	------

□ Anti-albumin coated plate (Dried-plate)		
□ ↓Washing 4 times (*②)		*⑥
□ Samples, or Standards	100 µL	
□ ↓Shaking (*③), Incubation for 1 hour at 20 °C - 25 °C (Standing (*④))		
□ Dilute HRP-conjugated anti-albumin antibody (D) to 100× with buffer (C) returned to 20 °C - 25 °C.		
□ ↓Washing 4 times (*②)		*⑥
□ HRP-labeled anti-albumin antibody	100 µL	
□ ↓Shaking (*③), Incubation for 1 hour at 20 °C - 25 °C (Standing (*④))		
□ ↓Washing 4 times (*②)		*⑥
□ Chromogen (TMB) (After dispense, the color turns to blue depending on the concentration.)	100 µL	
□ ↓Shaking (*③), Incubation for 30 min at 20 °C - 25 °C (Standing (*④))		
□ Stop solution (After dispense, the color turns to yellow depending on the concentration.)	100 µL	
□ ↓Shaking (*③) (Immediately shake.)		
□ Measurement of absorbance (450 nm, Ref 620 nm) using a plate reader immediately. (Ref. wave cancels the dirt in the back of plate.)		*⑤

*② 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 HRP-labeled streptavidin.

Standard of plate-washing pressure: 5- 25 mL/min. (Adjust it depending on the nozzle's diameter.)

*③ Guideline of shaking: 600 rpm - 1200 rpm for 10 seconds × 3 times.

*④ 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.

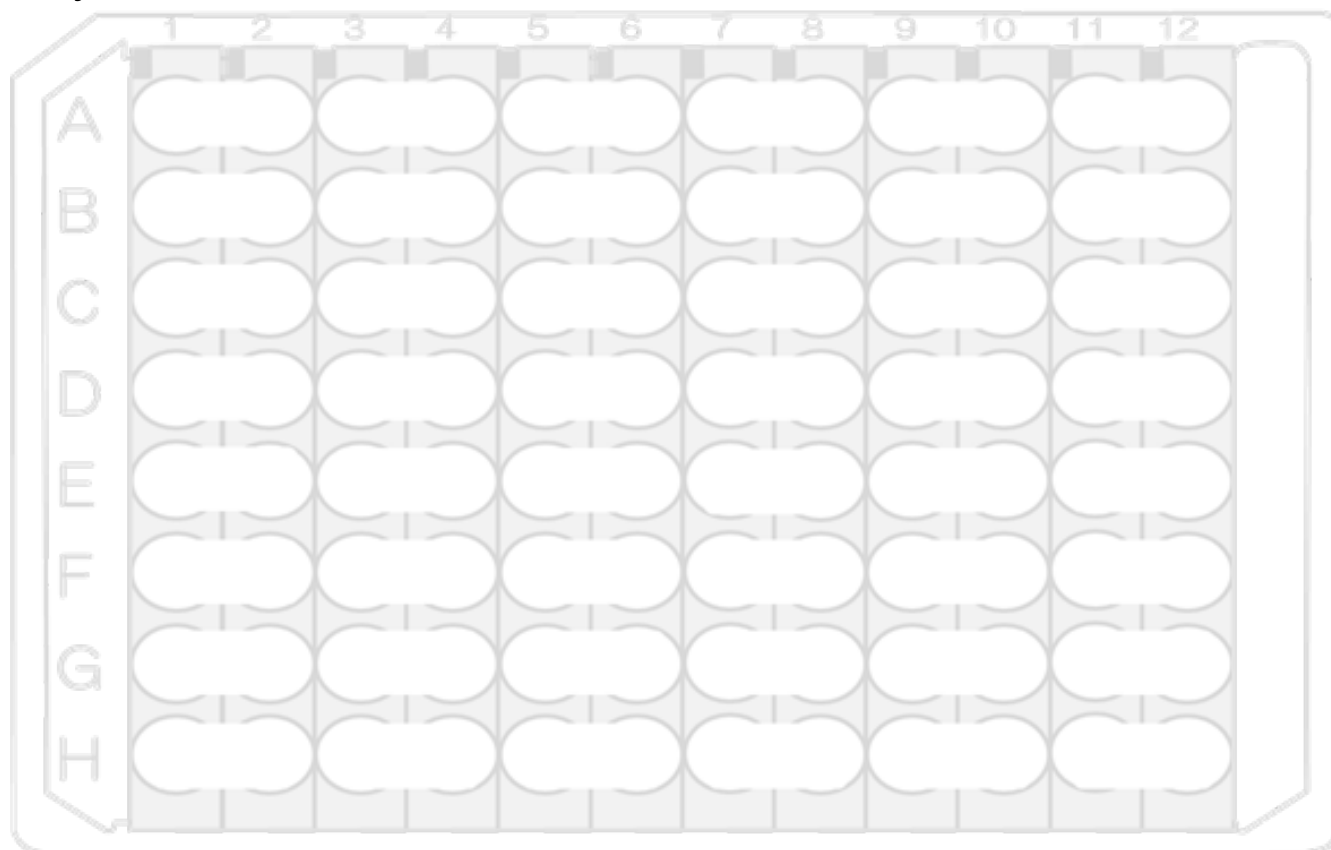
*⑤ 600 nm - 650 nm can be used as reference wavelength.

*⑥ 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	50 ng/mL	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
B	25 ng/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
C	12.5 ng/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
D	6.25 ng/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
E	3.13 ng/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
F	1.56 ng/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
G	0.78 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



LBIS Bovine Albumin ELISA Kit

[Storage condition] Store the kit at 2 °C - 8 °C (Do not freeze).

[Term of validity] Expiration date is indicated on the container.

[Cat #] 631-07091

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

<https://www.fujifilm.com/ffwk/en>

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書に従って測定を実施してください。本キットを初めてご使用になられる場合は後述の「◆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」をご確認の上ご使用ください。

『 レビス® アルブミン-ウシ 』 取扱説明書

本キットはウシ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ください。

◆製品の特長

- 全反応時間は2時間30分です。
- 本キットは検体中のウシアルブミンを測定します。
- 微量な検体（標準操作法は100 µL）で測定可能です。
- 1キットは96ウェルです。
- 標準品はウシ由来のものであります。
- 全ての試薬は溶液タイプです。

1.測定原理

本キットは標準品、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、ペルオキシダーゼ結合抗アルブミン抗体を加え、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発色液（TMB）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450 nm（副波長620 nm）で比色測定されます。吸光度はアルブミン濃度にほぼ比例します。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。

2.キットの保存と使用期限

キットは2℃～8℃で保存してください（凍結厳禁）。この保存条件下でキットは外箱のラベルに記載された有効期限内安定です。有効期限の過ぎた試薬は使用しないでください。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。

3.構成品

構成品	状態	容量
(A) Anti-albumin-coated plate 抗体固相化96ウェルプレート（乾燥プレートタイプ）	洗浄後使用	96 wells (8×12)/1枚
(B) Standard bovine albumin (500 ng/mL) (derived from bovine) 標準アルブミン溶液（ウシ）(500 ng/mL)	希釈後使用	200 µL/1本
(C) Buffer solution 緩衝液	そのまま使用	60 mL/1本
(D) HRP-labeled anti-albumin antibody ペルオキシダーゼ結合抗アルブミン抗体	希釈後使用	200 µL/1本
(F) Chromogen (TMB) 発色液（TMB）	そのまま使用	12 mL/1本
(H) Stop solution 反応停止液	そのまま使用	12 mL/1本
(I) Wash stock solution (10×) 濃縮洗浄液（10×）	希釈後使用	100 mL/1本
プレートシール		3枚
取扱説明書		1部

4.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50 µLを正確にピペティングできるもの、及び50 µL～500 µLを正確にピペティングできるもの） □連続分注ピペット（例 Eppendorf の multipette plus）、100 µL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 rpm~1200 rpm) □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(450 ± 10 nm、620 nm : 600 nm~650 nm) □データ計算用ソフトウェア

5. 試薬の調製

- * キットの試薬は使用前に必ず室温 (20 °C ~ 25 °C) に戻してください (2 時間位が目安です)。
- * 3. 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。「濃縮液」とあるものについては下記の要領で調製してください。
- * 測定に必要な分だけ試薬を調製してください (ご不明な際にはお問い合わせください)。

【濃縮された試薬類】

[(B) Standard bovine albumin (500 ng/mL)] ; 標準曲線作成用

(B) Standard bovine albumin (500 ng/mL) (原液) と (C) Buffer solution を使って標準溶液を調製してください。下記は一例です。

標準溶液の容量	緩衝液	濃度 (ng/mL)
標準溶液原液 50 µL	450 µL	50
50 ng/mL 溶液 250 µL	250 µL	25
25 ng/mL 溶液 250 µL	250 µL	12.5
12.5 ng/mL 溶液 250 µL	250 µL	6.25
6.25 ng/mL 溶液 250 µL	250 µL	3.13
3.13 ng/mL 溶液 250 µL	250 µL	1.56
1.56 ng/mL 溶液 250 µL	250 µL	0.78
0 (Blank)	250 µL	0

[(D) HRP-labeled anti-albumin antibody]

200 µL を充分分取できる量をご提供しています。濃縮液を (C) Buffer solution で **100 倍** に希釈してください。

[(I) Wash stock solution (10×)]

(I) Wash stock solution (10×) を室温化された精製水 (蒸留水) で **10 倍** に希釈してください。

例 : 100 mL の (I) Wash stock solution (10×) + 900 mL の精製水 (蒸留水) (96 ウェル全てを使用する場合)

【試薬の安定性と保存方法】

(A) Anti-albumin-coated plate

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 °C ~ 8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(B) Standard bovine albumin (500 ng/mL)

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 °C ~ 8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないでください。

(C) Buffer solution, (F) Chromogen (TMB)

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 °C ~ 8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(D) HRP-labeled anti-albumin antibody

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 °C ~ 8 °C で保存してください。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ください。

(H) Stop solution

使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2 °C ~ 8 °C で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(I) Wash stock solution (10×)

濃縮洗浄液 (10×) を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2 °C ~ 8 °C で保存してください。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ください。

6. 検体の調製

本キットは検体 (培養液等) 中に微量に存在するウシアルブミンを検出・定量するのに適しております。検体の pH は 6.5 ~ 8.0 の範囲内に入るように調製してください。本キットはウシ血清・血漿検体を測定するには鋭敏すぎることにご注意ください。およそ 100 万倍に希釈する必要があります。測定範囲 (0.78 ~ 50 ng/mL) に入るよう、キットの緩衝液を用いて検体を希釈してください。検体を希釈する場合は、あらかじめ

試験管等を用いて緩衝液で希釈し測定ウェルに分注してください。

- 検体は定法にしたがって採取しすぐに測定するか、 $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存してください。凍結した検体は測定する直前に解凍し十分に攪拌してください。繰り返しの凍結融解は避けてください。正しい結果が得られない原因になります。
- 溶血した検体や高脂質検体は使わないでください。
- 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ください。
- 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ください。

【検体の安定性と保存方法】

検体を長期に保管する場合は、 $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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ください。また、検体の希釈は用時調製としてください。

7.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ください。

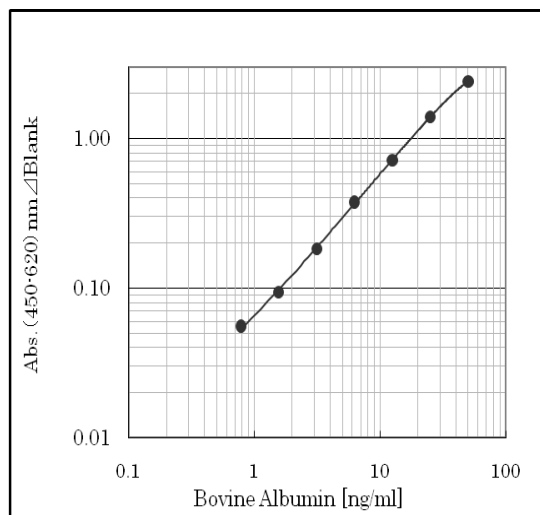
抗体固相化プレートのシールは、プレートが十分に室温に戻ってから剥がしてください。

- (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) 標準品測定ウェルに各濃度のアルブミン標準溶液を、検体用ウェルに検体をそれぞれ100 μL ずつ分注します。
 - (3) マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
 - (4) プレートシールを貼り、室温($20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)で1時間静置(*③)します。
 - (5) 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。
 - (6) 各ウェルにペルオキシダーゼ結合抗アルブミン抗体を100 μL ずつ分注します。
 - (7) 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($20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)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) 各ウェルに発色液を100 μL ずつ分注します。
 - (11) マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
 - (12) プレートシールを貼り、室温($20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)で30分間静置(*③)します。
 - (13) 各ウェルに反応停止液を100 μL ずつ分注し、発色反応を停止します。
 - (14) 攪拌(*②)後、直ちにマイクロプレート用分光光度計で450 nm (副波長620 nm)での吸光度を測定します。副波長は600 nm~650 nmの範囲で使用できます。
- (*①)、(*②)、(*③) 測定手順概要(13ページ)をご参照ください。

8.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ください。
- (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) Buffer solutionにて適当倍率に調製し再度測定を実施してください。
* 一番高濃度の標準溶液の吸光度付近の検体は(C) Buffer solution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。



9.キットの性能

- 測定範囲

ウシアルブミンを 0.78 ng/mL～50 ng/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ウシ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、1000 ng/mL 時のデータです。

検体名	交差性	検体名	交差性
ウシ アルブミン	100 %	ラット アルブミン	0.05 %以下
マウス アルブミン	0.05 %以下	ヒト アルブミン	0.05 %以下

- 精度試験 (アッセイ内変動) (5 重測定、4 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、4 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 91 %から 104 %でした。

- 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 R² は 0.9977 と 0.9996 でした。

10.トラブルシューティングと Q&A

- すべてのウェルで反応が弱い

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) 発色液の温度が低かった。

- 最小標準溶液濃度 (0.78 ng/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。

(ペルオキシダーゼ標識物と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5 回～8 回に増やしてください。)

- 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ください。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ください。

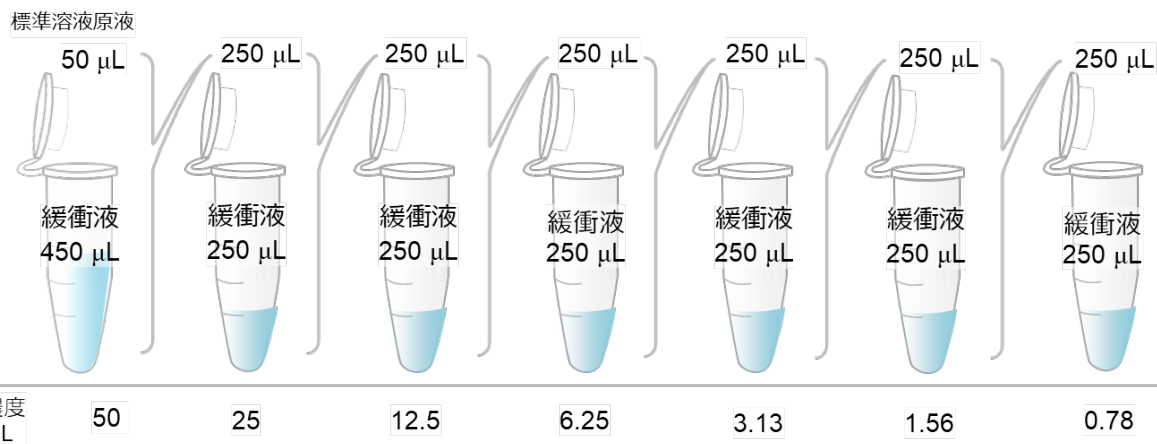
- Q-2: プレートを取出したらウェルの中に何も入っていませんでしたが大丈夫ですか?

A-2: 大丈夫です。このキットは乾燥プレートタイプです。

【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 °C ~ 25 °C) に戻してください。室温化には **2 時間位必要**
- (I) Wash stock solution (10×) : 室温化された精製水で、**10 倍**に希釈してください。
- (B) Standard bovine albumin (500 ng/mL) (例) : 室温化された (C) Buffer solution で、希釈してください。



各操作注意事項並びに関連情報

<input type="checkbox"/>	抗体固相化 96 ウェルプレート (乾燥プレートタイプ)		
<input type="checkbox"/>	↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/>	検体または標準溶液	100 µL	
<input type="checkbox"/>	↓攪拌、室温 (20 °C ~ 25 °C)、1 時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/>	(D) HRP-labeled anti-albumin antibody の希釈。室温化された (C) Buffer solution で 100 倍 に希釈してください。希釈溶液の調製は第一反応中に行う。		
<input type="checkbox"/>	↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/>	ペルオキシダーゼ結合抗アルブミン抗体	100 µL	
<input type="checkbox"/>	↓攪拌、室温 (20 °C ~ 25 °C)、1 時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/>	↓洗浄 4 回 (洗浄液除去後、直ちに発色液分注)		* ①
<input type="checkbox"/>	発色液 (TMB) 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	100 µL	
<input type="checkbox"/>	↓攪拌、室温(20 °C ~ 25 °C)、30 分間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/>	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	100 µL	
<input type="checkbox"/>	↓攪拌 (直ちに攪拌)		* ②
<input type="checkbox"/>	吸光度測定 (主波長 450 nm、副波長 620 nm:600 nm ~ 650 nm) 副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします。直ちに測定してください。		

(* 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 µL/ウェルです。万一、最小標準溶液濃度(0.78 ng/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、ペルオキシダーゼ標識物と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5 回~8 回に増やしてください。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5 mL/分 ~ 25 mL/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ネーションに注意してください。

(* ②) 攪拌の目安は 600 rpm ~ 1200 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ください。

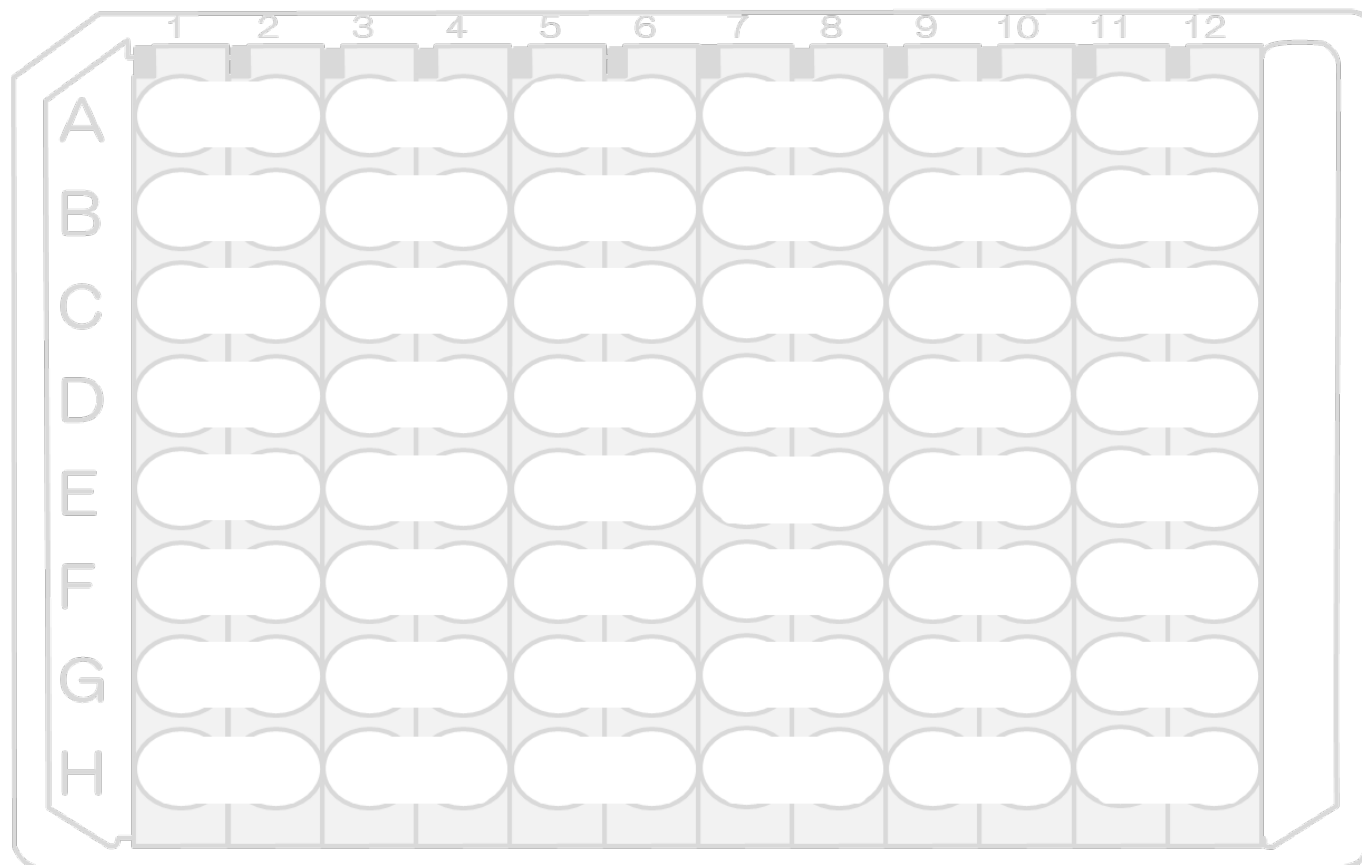
プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けてください。一度使用したプレートシールは再使用しないでください。

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	50 ng/mL	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	25 ng/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	12.5 ng/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	6.25 ng/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	3.13 ng/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	1.56 ng/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	0.78 ng/mL	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
H	0	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40

◆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

- BSA が含まれる試薬を取り扱ったピペットを使用することによる BSA のコンタミネーションにご注意ください。異常な発色の原因になります。メンテナンスされたピペットをご使用ください。ピペットのクリーニング方法はピペットメーカーの推奨方法をご確認ください。
- ピペッティングはゆっくり行ってください。プッシュボタンは決して急激に戻さないでください。コンタミネーションの原因になります。
- 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) を厳守してください。また、風速 (エアコンの風も含む)：0.4 m/sec 以上、湿度 30 %未満の環境下での測定は避けてください。やむを得ず、測定操作を風速：0.4 m/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ください。
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ください。
- 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ください。
- 検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけてください。1 ウェル/1 チップのご使用をお勧めします。
- 発色液は 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ください。
- 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ください。用手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ください。
- 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ください。
- 試薬類を皮膚に付けないでください。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ください。
- 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ください。
- 試薬類は口でピペッティングしないでください。
- ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないでください。
- 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ください。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 時間以上浸けてください。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄してください。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ください。



【測定名】

【所属】

【測定者】

【測定日】

【ロット番号】

【有効期限】

【備考】

【製品名】

レビス® アルブミン-ウシ

【和光コード】

631-07091

【英語表記】

LBIS Bovine Albumin ELISA Kit

【お問い合わせ先】

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

Fax : 06-6201-5964

<https://www.fujifilm.com/ffwk/ja>