

[LBIS Rabbit Apo B-48 ELISA Kit]

Cat #628-04901

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 Rabbit Apo B-48 ELISA Kit is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of rabbit Apolipoprotein B-48 (Apo B-48). This kit is intended for research use only.

2. Storage and expiration

When the complete kit is stored at 2 °C - 8 °C (Do not freeze), the kit is stable until the expiration date shown on the label on the container. Opened reagents should be used as soon as possible to avoid loss in optimal assay performance caused by storage environment.

3. 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. Species difference has been found in lipoprotein metabolism. CETP (cholesterol ester transport protein) is abundant in human and rabbit, however, rats and mice lack this protein. Therefore, rabbits are exclusively used in this field as an experimental animal. For this reason we developed this kit for rabbit B48.

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

4. Assay principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's Rabbit Apo B-48 ELISA Kit, anti-human Apo B-48 monoclonal antibody (4C8) is used. Amino acid sequence of human Apo B-48 and rabbit Apo B-48 are different in just one of the amino acid, however, we found only a single band by western blot using rabbit serum and 4C8 antibody.

The standard is prepared by affinity purification of 4C8 antibody. The standards and samples are incubated in monoclonal antibody-coated wells to capture Apo B-48. After 1 hour 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, HRP(horse radish peroxidase)-conjugated streptavidin is added, and incubated for 30 minutes. After washing, bound HRP-conjugated streptavidin is reacted with a chromogen (TMB) 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.

5. 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 because it is sulfuric acid. The stop solution and the substrate solution may cause skin/eyes irritation. In case of contact with these wash skin/eyes thoroughly with water and seek medical attention, when necessary.
- Avoid contact with the acidic stop solution and chromogen (TMB) 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 %.

6. Reagents supplied

Components	State	Amount
(A) Anti-Apo B-48-coated plate	Use after washing.	96 wells/1 plate
(B) Standard rabbit Apo B-48 (derived from rabbit)	Frozen-dried.	1000 ng/1 vial
(C) Buffer solution	Ready for use.	60 mL/1 bottle
(D) Biotinylated anti-Apo B-48 antibody	Concentrated. Use after dilution.	100 µL/1 vial
(E) HRP-conjugated streptavidin	Concentrated. Use after dilution.	100 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	–	4 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 200 µL. Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipipette plus which can dispense 50 µL. Paper towel to remove washing buffer remaining in wells. A vortex-type mixer. A shaker for 96 well-plate (600-1200 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 rabbit Apo B-48 (Frozen-dried)]

Add 400 µL of deionized water (or distilled water) of room temperature to Standard rabbit 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 for 10 seconds × 3 times. 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 µL.

Sufficient shaking with Vortex (1800 rpm - 2000 rpm for 10 seconds × 3 times) 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 solution	Concentration(ng/mL)
Original solution 200 µL	200 µL	1250
1250 ng/mL solution 200 µL	200 µL	625
625 ng/mL solution 200 µL	200 µL	313
313 ng/mL solution 200 µL	200 µL	156

156 ng/mL solution 200 µL	200 µL	78
78 ng/mL solution 200 µL	200 µL	39
39 ng/mL solution 200 µL	200 µL	19.5
0 (Blank)	200 µL	0

[(D) Biotinylated anti-Apo B-48 antibody]

Prepare working solution by dilution of (D) with the (C) Buffer solution to **1:100**.
10 mL of the diluted solution is enough for 96 wells.

[(E) HRP-conjugated streptavidin]

Prepare working solution by dilution of (E) with the (C) Buffer solution to **1:100**.
10 mL of the diluted solution is enough for 96 wells.

[(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-Apo B-48-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.

[(B) Standard rabbit Apo B-48 (Frozen-dried)]

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 solution] & [(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 maintains stability until expiration date. Once opened, we recommend using as soon as possible to avoid influence by environmental condition.

[(D) Biotinylated anti-Apo B-48 antibody] & [(E) HRP-conjugated streptavidin]

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 Apo B-48 in rabbit 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). Recommended dilution is 10× (minimum. 5×). For high value samples, more than 10× dilution may be needed. When diluting samples, vortex them well (1800 rpm - 2000 rpm, 10 sec × 3) with care not to make bubbles.

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 °C - 8 °C. If it is necessary to store samples in refrigerator (2 °C - 8 °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 °C. Defrosted samples should be mixed thoroughly for best results. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

11. Assay procedure

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

- (1) Wash the anti-Apo B-48-coated plate 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 50 µL of properly diluted samples to the designated sample wells.
- (3) Pipette 50 µL of standard solution to the wells designated for standards.
- (4) Shake the plate gently on a plate shaker (*③).
- (5) Stick a plate seal (*④) 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 µL of Biotinylated anti-Apo B-48 antibody to all wells, and shake as step (4).
- (8) Stick a plate seal (*④) 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 µL of HRP-conjugated streptavidin to all wells, and shake as step (4).
- (11) Stick a plate seal (*④) 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 µL of Chromogen (TMB) to wells, and shake as step (4).
- (14) Stick a plate seal (*④) on the plate and incubate the plate for 20 minutes at 20 °C - 25 °C.
- (15) Add 50 µL of the stop solution to all wells and shake as step (4).
- (16) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620 nm*) immediately using a plate reader.

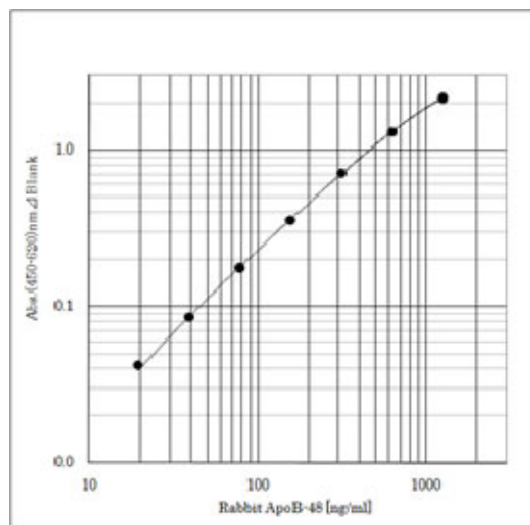
*Refer to the page 6 for notes of *②, *③ and *④.

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 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 animals should be judged comprehensively taking other examination results into consideration.



* Rabbit Apo B-48 assay standard curve (an example). Absorbance may change due to assay environment.

13. Performance characteristics

- Assay range: The assay range of the kit is 19.5 ng/mL - 1250 ng/mL.
- Specificity: The antibodies used in this kit are specific to Apo B-48. Rabbit 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 (2 samples, 4 days, 2 replicates assay), mean CV was within 10 %.
- Recovery test
Standard Apo B-48 was added in 3 concentrations to 2 serum samples and were assayed. The recoveries were 93.4 % - 105 %.
- Dilution test
Two serum samples were serially diluted by 3 steps. The dilution curves showed linearity with $R^2 = 0.9987 - 0.9996$.

14. Reference assay data

Rabbit apo B-48 assay data

Japanese White Rabbit, male, 4 weeks old

Mean assay value: 1.12 µg/mL, SE: 0.13 µg/mL, n = 6, fasting for 18 hours

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.

15. 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 Biotinylated anti-Apo B-48 antibody, HRP-conjugated streptavidin, or chromogen (TMB) might not be added.
 - 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of biotinylated anti-Apo B-48 antibody or HRP-conjugated streptavidin.
 - 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 (19.5 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 HRP-conjugated streptavidin.)
- 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.

16. References

- 1) Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA.
Kinoshita, M., Kojima, M., Matsushima, T., and Teramoto, T.
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., Ai, M., Van, Himbergen, T., Asztalos, BF., Tanaka, A., Stein, EA., Jones, PH., Schaefer, E.J. Atherosclerosis, 205:197-201, 2009

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×) must be diluted to **10 times** by deionized water (or distilled water) that returned to 20 °C -25 °C.

<input type="checkbox"/>	Anti-apo B-48-coated plate	
<input type="checkbox"/>	↓Washing 4 times(*②)	*⑥
<input type="checkbox"/>	Diluted samples, or Standards	50 μL
<input type="checkbox"/>	↓Shaking(*③), Incubation for 1 hour at 20 °C - 25 °C. (Standing(*④))	
<input type="checkbox"/>	Dilute Biotinylated anti-Apo B-48 antibody to 100× with (C) Buffer solution returned to 20 °C - 25 °C. (This should be prepared during incubation.)	
<input type="checkbox"/>	↓Washing 4 times(*②)	*⑥
<input type="checkbox"/>	Biotinylated anti-Apo B-48 antibody	50 μL
<input type="checkbox"/>	↓Shaking(*③), Incubation for 1 hour at 20 °C - 25 °C. (Standing(*④))	
<input type="checkbox"/>	Dilute HRP-conjugated streptavidin to 100× with (C) Buffer solution returned to 20 °C - 25 °C. (This should be prepared during incubation.)	
<input type="checkbox"/>	↓Washing 4 times*	*⑥
<input type="checkbox"/>	HRP-conjugated streptavidin	50 μL
<input type="checkbox"/>	↓Shaking(*③), Incubation for 30 minutes at 20 °C - 25 °C. (Standing(*④))	
<input type="checkbox"/>	↓Washing 4 times(*②)	*⑥
<input type="checkbox"/>	Chromogen (TMB) (After dispense, the color turns to blue depending on the concentration.)	50 μL
<input type="checkbox"/>	↓Shaking(*③), Incubation for 20 minutes at 20 °C - 25 °C. (Standing(*④))	
<input type="checkbox"/>	Stop solution (After dispense, the color turns to yellow depending on the concentration.)	50 μL
<input type="checkbox"/>	↓Shaking(*③) (Immediately shake.)	
<input type="checkbox"/>	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-conjugated streptavidin.

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

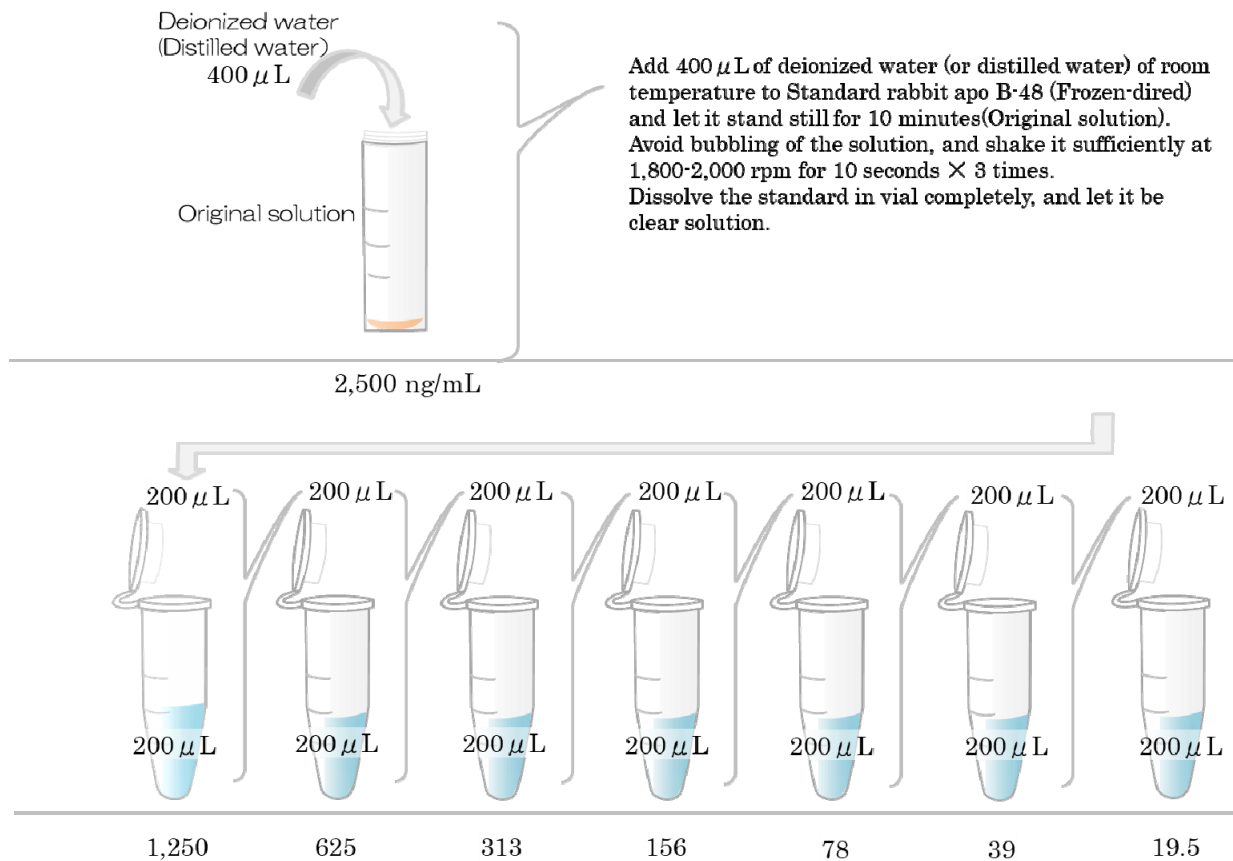
*③ Guideline of shaking: 600 rpm -1200 rpm for 10 seconds × 3 times.

*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.

Standard solution dilution example



LBIS Rabbit Apo B-48 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 #] 628-04901

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>

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 for 10 seconds x 3 times) 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 for 10 sec. x 3 times) 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 for 10 sec. x 3 times). 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.

『 LBIS Rabbit Apo B-48 ELISA Kit 』 取扱説明書

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。

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。

リポタンパク質代謝には種差があってヒトやウサギでは CETP (Cholesterol ester transport protein, コレステロールエステル輸送タンパク質) が多く存在するが、ラットやマウスでは欠如しています。従ってこの領域ではウサギが実験動物として使用されます。この測定キットがウサギ用に作られているのはそのためです。

本キットはウサギアポリポタンパク B-48 (以下 Apo B-48 という) 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 50 分です。
- ウサギ血清または血漿 (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。
- 標準品はウサギ由来のものです。

2. 測定原理

本キットは抗ヒト Apo B-48 モノクローナル抗体(4C8)を使用しています。ヒト Apo B-48 アミノ酸配列とウサギ Apo B-48 アミノ酸配列は一つのアミノ酸が異なりますが、ウサギ血清と 4C8 抗体を使用したウェスタンブロッティング法で一つのバンドのみ確認しました。

本キットは 4C8 抗体アフィニティー精製による第一標準品を基に調製した標準品、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・アビジン結合物を加え、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 Apo B-48 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。

3. キットの保存と使用期限

キットは 2 °C~8 °C 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。

4. 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 μ L を正確にピペッティングできるもの、及び 200 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 (例 Eppendorf の multipette plus)、50 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 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 \pm 10 nm、620 nm : 600 nm~650 nm)
- データ計算用ソフトウェア

5. 構成品

構成品	状態	容量
(A) Anti-Apo B-48 coated plate 抗体固相化 96 ウェルプレート	洗浄後使用	96 wells(8×12)/1 枚

(B) Standard rabbit Apo B-48 標準品	凍結乾燥品 希釈後使用	1000 ng/1本
(C) Buffer solution 緩衝液	そのまま使用	60 mL/1本
(D) Biotinylated anti-Apo B-48 antibody ビオチン結合抗 Apo B-48 抗体	希釈後使用	100 µL/1本
(E) HRP-conjugated streptavidin ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	希釈後使用	100 µL/1本
(F) Chromogen (TMB) 発色液	そのまま使用	12 mL/1本
(H) Stop solution 反応停止液	Be careful 取扱注意	そのまま使用 12 mL/1本
(I) Wash stock solution(10×) 濃縮洗浄液	希釈後使用	100 mL/1本
プレートシール		4枚
取扱説明書		1部

6. 試薬の調製

- * キットの試薬は使用前に必ず室温(20℃～25℃)に戻してください(2時間位が目安です)。
- * 5で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で調製してください。
- * 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 rabbit Apo B-48] ; 標準曲線作成用

(B)Standard rabbit Apo B-48 (凍結乾燥品) (1000 ng/本) に室温化された脱イオン水 (または蒸留水) 400 µL 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 (1800 rpm～2000 rpm 10 秒 3 回) してください。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ください。可溶化した標準溶液原液は冷蔵状態を保持し、24 時間以内にご使用ください。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ください。

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ください。

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ください。標準溶液作成のために最初の 200 µL 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 (1800 rpm～2000 rpm 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ください。泡立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) Buffer solution	濃度(ng/mL)
標準溶液原液 200 µL	200 µL	1250
1250 ng/mL 溶液 200 µL	200 µL	625
625 ng/mL 溶液 200 µL	200 µL	313
313 ng/mL 溶液 200 µL	200 µL	156
156 ng/mL 溶液 200 µL	200 µL	78
78 ng/mL 溶液 200 µL	200 µL	39
39 ng/mL 溶液 200 µL	200 µL	19.5
0 (Blank)	200 µL	0

[(D)Biotinylated anti-Apo B-48 antibody]

100 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。

[(E)HRP-conjugated streptavidin]

100 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×)を室温化された脱イオン水 (または蒸留水) で **10 倍**に希釈してください。

例：100 mL の(I) Wash stock solution(10×)+900 mL の脱イオン水 (または蒸留水) (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-Apo B-48 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）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℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(B) Standard Rabbit Apo B-48

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ください。残余溶液は廃棄してください。

(C) Buffer solution、及び(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℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(D) Biotinylated anti-Apo B-48 antibody、及び(E) HRP-conjugated streptavidin

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℃～8℃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℃～8℃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×)

(I) Wash stock solution(10×)を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2℃～8℃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。

7. 検体の調製

本キットはウサギ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℃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。
- 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) Buffer solution で希釈し測定ウェルに分注してください（(C) Buffer solution で希釈した検体は粘性が強くなりますので、ピペティングは注意してください）。希釈目安は 10 倍です（最小希釈倍率は 5 倍）。高値検体は 10 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（1800 rpm～2000 rpm-10 秒 3 回）してください。**
- 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ください。
 ※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原因となる場合がありますので測定に使用しないでください。本キットの場合、溶血は 160 mg/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 100 KIU/mL～500 KIU/mL のアプロチンを添加して保管してください。(KIU : kallikrein inhibitor unit) また、検体を長期に保管する場合は、-35℃以下での凍結保管を推奨します。繰り返しの凍結融解は避けてください。また、検体の希釈は用時調製としてください。

8. 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。

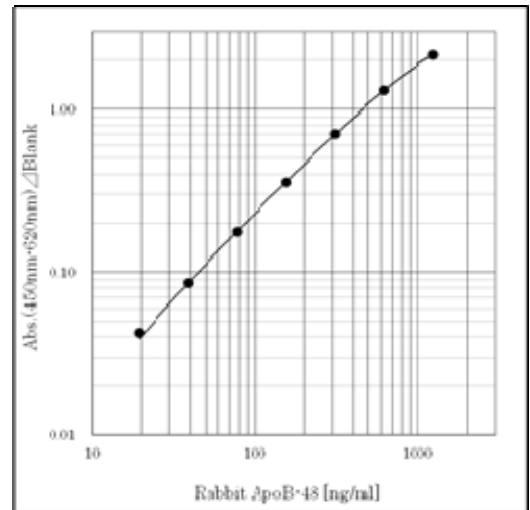
抗体固相化プレートのシールは、プレートが十分に室温に戻ってから剥がしてください。

- (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) 検体測定ウェルに希釈検体を 50 μL 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 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（*②）します。
- (5) プレートシールを貼り、室温(20℃～25℃)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 Apo B-48 抗体を 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（*②）します。
- (8) プレートシールを貼り、室温(20℃～25℃)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・アビジン結合物を 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（*②）します。
- (11) プレートシールを貼り、室温(20℃～25℃)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、発色液を 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（*②）します。

- (14) プレートシールを貼り、室温(20℃～25℃)で20分間静置(*③)します。
 (15) 各ウェルに反応停止液を50μLずつ分注し、発色反応を停止します。
 (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)測定手順概要(14ページ)をご参照ください。

9. 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。
 (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ください。また、反応温度を20℃～25℃範囲内にして再測定を実施してください。
 * 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。
 * ウサギ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。



10. キットの性能

- 測定範囲：Apo B-48を19.5 ng/mL～1250 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Apo B-48に対して特異的です。ウサギアポリポタンパク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) (2重測定、2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Apo B-48を添加し測定した結果、回収率は93.4%から105%
- 希釈直線性
2血清検体を連続的に希釈用緩衝液で3段階希釈し測定した結果、直線回帰のR²は0.9987と0.99996

11. 参考値

Apo B-48測定値：平均1.12 μg/mL、SE 0.13 μg/mL、N数：6、絶食18時間、日本白色種、雄、4ヶ月齢
 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ください。採血条件、検体保管条件等で変動します。

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) 発色液の温度が低かった。
- 最小標準溶液濃度(19.5 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・アビジン結合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。

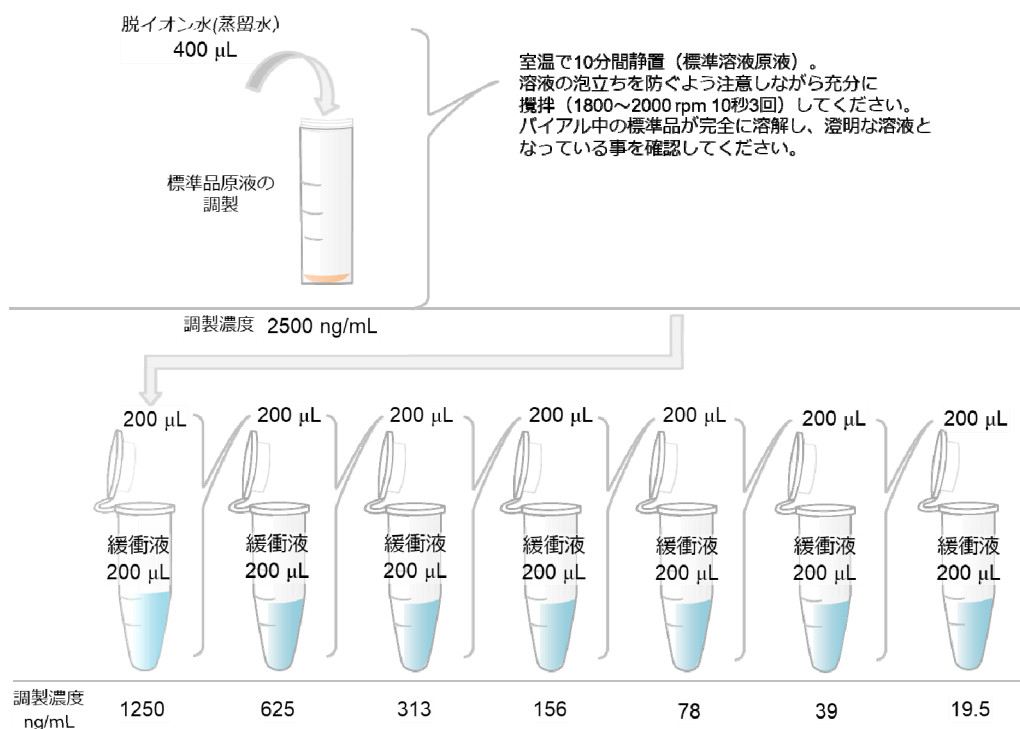
- Q-2：プレートを取り出したらウェルの中に液体が入っていましたが何ですか？
A-2：出荷時には保存安定液が充填してあります。

13.参考文献

- 1:Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA.
Kinoshita,M., Kojima,M., Matsushima,T., and Teramoto,T. 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., Ai,M., Van,Himbergen,T., Asztalos,BF., Tanaka,A., Stein,EA., Jones,PH., Schaefer,EJ. Atherosclerosis,205:197-201,2009
- 3: Determination of Immuno-reactive Rabbit Apolipoprotein B-48 in Serum by a sandwich ELISA.
Kinoshita,M., Kojima,M., Matsushima,T., Mashimo,Y.,Kigure,E.,and Teramoto,T.

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 μ L 加え、溶解してください。



【測定手順概要とチェックリスト】

- ウェルプレート、試薬類を十分に室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ 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 \times)：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		
<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"/> 希釈検体または標準 Apo B-48 溶液	50 μ L	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)、1 時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> (D) Biotinylated anti-Apo B-48 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"/> ビオチン結合抗 Apo B-48 抗体	50 μ L	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)、1 時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> (E) HRP-conjugated streptavidin 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二反応中に行う		

<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・アビジン結合物	50 μ L	
<input type="checkbox"/>	↓攪拌、室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)、30 分間反応、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	50 μ L	
<input type="checkbox"/>	↓攪拌、室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)、20 分間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/>	反応停止液 分注後、濃度により黄褐色に変色	50 μ L	強酸性につき取扱注意
<input type="checkbox"/>	↓攪拌 (直ちに攪拌)		* ②
<input type="checkbox"/>	直ちに吸光度測定 (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。		

(* 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 μ 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勧め致しません。万一、最小標準溶液濃度(19.5 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・アビジン結合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。

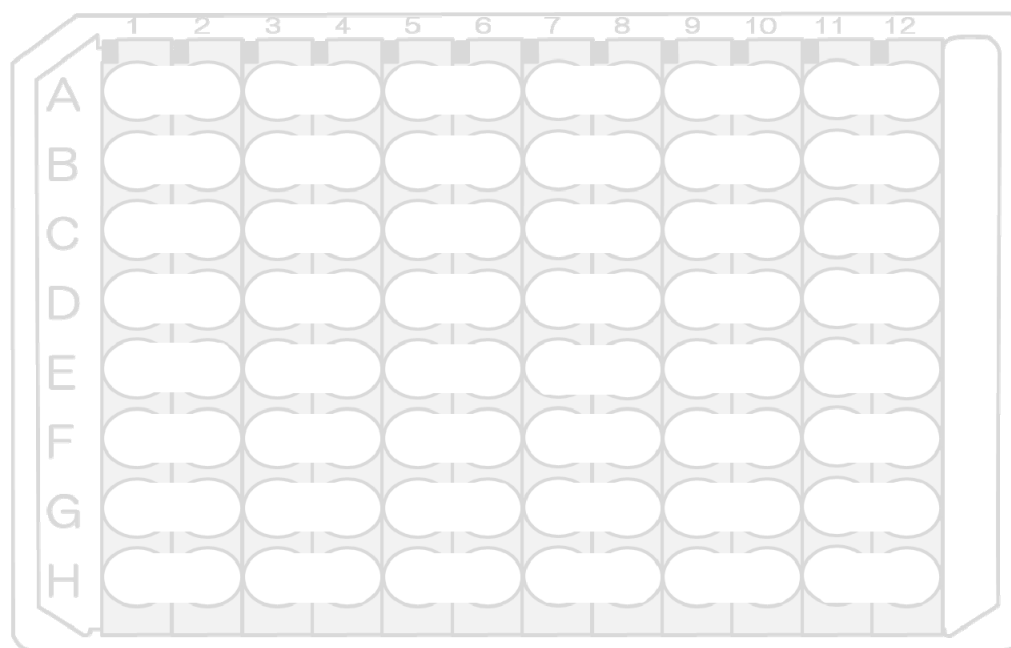
(* ②) 攪拌の目安は 600 rpm~1200 rpm-10 秒間、3 回。

(* ③) 攪拌終了後プレートシールを貼って静置してください。

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。

◆ご使用前にご確認頂きたい技術上のヒント及び注意事項

- ELISA 法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温：20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ 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ため、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、または指導者のもとでご使用ください。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。



Worksheet example

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	1250 ng/mL	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
B	625 ng/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
C	313 ng/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
D	156 ng/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
E	78 ng/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
F	39 ng/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
G	19.5 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

【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】

LBIS Rabbit Apo B-48 ELISA Kit

【和光コード】

628-04901

【英語表記】

LBIS Rabbit Apo B-48 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

大阪市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>

LBIS Rabbit Apo B-48 ELISA Kit 測定のバ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ください。
不明な点がありましたら弊社へお問い合わせください。
- 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ください。
- 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を測定開始までに 20 °C～25 °C に戻してください。
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）してください（室温を 22 °C とし
て）。反応温度は 20 °C～25 °C を厳守してください。
- 標準品の溶解について
標準品 Apo B-48（凍結乾燥品）（1000 ng/本）に室温化された脱イオン水（または蒸留水）400 μL（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（1800 rpm～2000 rpm 10 秒 3 回）してください。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ください。
可溶化した標準溶液原液（320 ng/mL）を保存する場合は冷蔵状態を保持し、24 時間以内にご使用ください。また、
保管する場合は可溶化後速やかに -35 °C 以下で凍結保存してください。
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ください。
- 検体
血漿採血時はヘパリン（最終濃度：10 μg/mL (1.2 U/mL)～100 μg/mL）、EDTA-2Na（最終濃度：1.0～1.5
mg/mL）、EDTA-2K（最終濃度：1.1～1.7 mg/mL）を使用してください（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ください（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
を作製してください。各標準溶液作製のために最初の 200 μL 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（1800 rpm～2000 rpm 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
ください。
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ください。残余溶液は廃棄してください。
正しく調整されたマイクロピペットを使用してください。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ください。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太
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ください。
- 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ください。泡立ちは測定結果のバ
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・ゴーで分注してください。
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（800 rpm 10 秒 3 回）してください。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ください。
- 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ください。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ください。試薬の添加には
Multipette Plus のような連続分注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
底を引き搔く可能性があります。