

For Research Use Only, Not for use in diagnostic procedures.

# **Ab-Match Universal kit**

For technical material or related information, please refer to <a href="https://ruo.mbl.co.jp/product/cancer/abmatch.html">https://ruo.mbl.co.jp/product/cancer/abmatch.html</a> .

#### **■** Advantage

Ab-Match Universal kit comprises of one 96-well microplate, some buffers, some diluents, the substrate solution and the stop solution. Please use Ab-Match Assembly kit in combination with Ab-Match Universal kit in order to build the ELISA system and quantify the target protein in suitable biological samples.

The two kits are sufficient to produce one 96-well microplate.

This product is intended for research use only.

## ■ Assay principal

By using the Ab-Match Universal kit in combination with the Ab-Match Assembly kit for target protein, the sandwich ELISA system is build.

The capture antibody is coated on a 96-well microplate. Standards or samples are added to the microwells, allowing target protein to bind to the capture antibody in proportion to the concentration of target protein in the samples. After wash unbound target protein, detection antibody is added and attaches to the target protein bound to coated antibody. After washing away all unbound detection antibody, initiate the substrate reaction. After substrate reaction, add the stop solution to the microwell plate. Then the relative amount of target protein bound in each well can be determined from the yellow color using a microplate reader. The concentration of target protein in each sample can be obtained by comparing the optical density (OD) of the sample to the OD of the standards on the plate.

## ■ **Materials provided** 96 wells

## **Ab-Match Universal kit contains:**

Name	Materials	Quantity (for 1 kit)
Microwell strips	Non coated microwell strips	$8$ -well $\times$ 12 strips
Coating Buffer	Carbonate buffer solution (ready-to-use)	$12 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$
<b>Blocking Agent</b>	Contains BSA and sucrose (ready-to-use)	$24 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$
Sample Diluent	Buffer mostly for diluting samples (ready-to-use) Contains BSA, Tween 20 and HAMA-Blocker	$50 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$
Wash Concentrate	Buffer for washing microwells (20x) Contains Tween 20	$50 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$
SA-HRP Diluent	Buffer mostly for diluting SA-HRP (ready-to-use) Contains BSA	$15 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$
<b>Substrate Solution</b>	TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> solution (ready-to-use)	$20 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$
<b>Stop Solution</b>	0.25 mol/L sulfuric acid (ready-to-use)	$20 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$

Note: Kit components must be stored at 2-8°C. Microwell strips can be stored at room temperature.

Kit components must be brought to room temperature (20-30°C) prior to use.

#### **■** Precautions

- Do not use reagents beyond the stated expiration dates.
- A standard curve must be run with each assay.
- Operation for dispensing and diluting should be precisely done.
- Avoid contact of Substrate Solution and Stop Solution with skin or eyes. If contacted, wash away
  with plenty of water.
- **Substrate Solution** is easily oxidized with metal ions. Use disposable new instruments and disposable pipettes for all handling of the substrate solution <u>NEVER</u> return **Substrate Solution** to the bottle.
- Serum samples may be infectious. Instruments used in this test should be disposed after use or treated as follows:

Soak in 2% glutaraldehyde solution (final concentration) for more than one hour.

Soak in 0.5% sodium hypochlorite solution (available chloric: approximately 5,000 ppm.) for more than one hour.

Autoclave at 121°C for more than 20 minutes.

• The incubation times indicated do not allow the incubation to complete. Frequent moving of the plate during standing, or vibration from instruments, may cause a shaking effect to the reaction solution, causing the reaction to progresses faster than usual and giving higher color development.

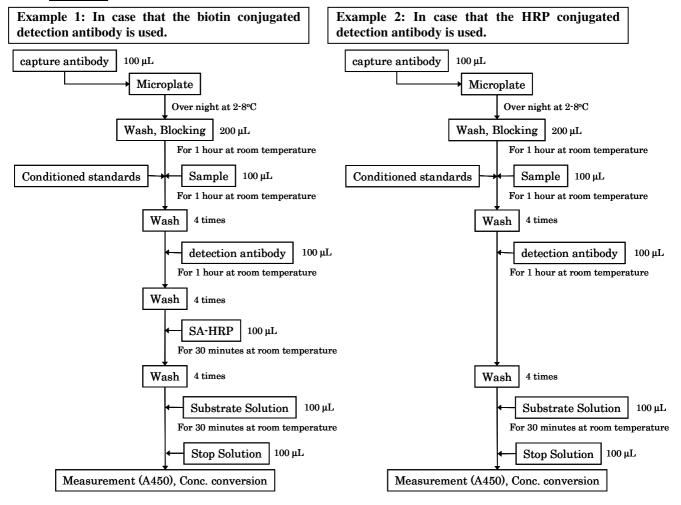
#### **■** Procedure

Prepare and use the Ab-Match Assembly kit reagent's standard and antibody solution with Ab-Match Universal kit's buffer solution. Ab-Match Universal kit contains the Microwell strips, Coating Buffer, Sample Diluent, Wash Concentrate, SA-HRP Diluent, Substrate Solution, and Stop Solution. These are required to prepare one 96-well ELISA using one Ab-Match Assembly kit.

Kit components must be brought to room temperature (20-30°C) prior to use.

The details of assay procedure vary from Ab-Match Assembly kit to kit. Please read data sheet of each Ab-Match Assembly kit thoroughly.

#### **♦ Outline**



<sup>\*</sup> Please read data sheet of each Ab-Match Assembly kit thoroughly.

## **♦ Preparation of Reagents**

For reagents highlighted in a box ( ), use **Ab-Match Universal kit** components. Each vial should be centrifuged prior to use in order to collect the reagent that is on the wall and cap of each vial.

#### 1. Wash Concentrate

Prepare **Wash solution** by diluting Wash Concentrate, 1:20 with the deionized water prior to use (ex. Add 50 mL of Wash Concentrate to 950 mL of deionized water).

After preparation, it is stable for 2 weeks at 2-8 °C.

#### 2. standard (component of Ab-Match Assembly kit)

For preparing **Conditioned standard**, <u>standard</u> should be diluted 1:10 with <u>Sample Diluent</u> or culture medium. With the 1:10 dilution as top **Conditioned standard**, 5 to 7 points should be made with <u>Sample Diluent</u> or culture medium by 2-fold serial dilution. Use the same diluent without any standard added as blank (zero conc.).

"standard" must be stored below -20°C. To avoid repeated freezing and thawing, prepare aliquots.

# 3. capture antibody (component of Ab-Match Assembly kit)

The capture antibody should be diluted with Coating Buffer.

Dilution must be used immediately and cannot be stored for future use.

Please read data sheet of each Ab-Match Assembly kit thoroughly.

## 4. detection antibody (component of Ab-Match Assembly kit)

The Biotin conjugated <u>detection antibody</u> should be diluted with <u>Sample Diluent</u>.

The HRP conjugated <u>detection antibody</u> should be diluted with <u>SA-HRP Diluent</u>

Dilution must be used immediately and cannot be stored for future use.

Please read data sheet of each Ab-Match Assembly kit thoroughly.

## 5. Streptavidin conj. peroxidase (component of some Ab-Match Assembly kits)

In case **SA-HRP solution** is needed, prepare **SA-HRP solution** by diluting <u>Streptavidin conj.</u> <u>peroxidase (SA-HRP)</u> with <u>SA-HRP Diluent</u>.

Dilution must be used immediately and cannot be stored for future use.

Please read data sheet of each Ab-Match Assembly kit thoroughly.

# **♦** Microplate Coating with capture antibody

For reagents highlighted in a box ( ), use components of the **Ab-Match Universal kit**.

## STEP 1. (Coating)

- 1) Dilute capture antibody with Coating Buffer.
- 2) Soon after mixing by repeated inversion, dispense 100 µL to each microwell with multichannel pipette and let stand overnight at 2-8°C with seal (or other cover to avoid evaporation).
  - \* Use a new conical 15mL tube to mix the antibody solution.
  - \* Please confirm the optimal dilution ratio with the data sheet of the Ab-Match Assembly kit.

## STEP 2. (Washing)

Wash the wells with saline (saline: NaCl 9.0g / 1,000 mL) 2 times.

#### Washing Method

Discard the liquid out of the wells. Be careful not to detach strips from the microcup frame.

Gently pour wash fluid into the empty wells.

Repeat the discarding and refilling steps.

Finally, tap the plate several times on paper towel to remove any contents.

- \* If an autowasher is used, optimal washing times vary depending on the instrument used and its setting.
- \* Wash as quickly as possible, NOT let wells dry up.

#### STEP 3. (Blocking)

- 1) Add 200 µL of Blocking Agent to each well and incubate for one hour at room temperature.
- 2) Dump out the contents of the wells over sink before use.
  - \* Discarding of antibody and addition of blocking should be done as soon as possible as to not to let the cup become dry.
  - \* After completion of the blocking step, the coated plate can be stored for a long period of time when properly dried. After discarding blocking agent, apply fan or other drying method and leave at room temperature for 3 hours to overnight to ensure proper drying. Store the plate at 2-8°C, under strictly controlled moisture conditions. The color development of dried plates may be decreased when compared with plates that were never dried.

00221.0.

#### **♦** Assay procedure

Duplicate assay is recommended. A standard curve must be run with each assay.

#### STEP 1. (Sample incubation)

1) Dilute <u>standard</u> 1:10 with Sample Diluent or culture medium.

For preparing dilution series, with the 1:10 dilution as top **Conditioned standard**, 5 to 7 points should be made with <u>Sample Diluent</u> or culture medium by 2-fold serial dilution. Then use buffer solution used for preparation as Blank.

- 2) Dilute samples with optimal dilution in Sample Diluent or culture medium.
  - \* When assayed with culture supernatant as sample, culture medium should be used to dilute the standard.
  - \* Sample Diluent contains HAMA-Blocker to block the effect of human anti- mouse antibodies (HAMA) that may be present in human serum.
- 3) Add 100 µL of each **Conditioned standard** points and samples to coated well.

Incubate for 1 hour at room temperature (primary reaction)

- \* The Antigen-antibody reaction starts on addition. Addition should be completed as quickly as possible. It is recommended that standard and sample are diluted on a separate microplate in advance, then added to the antibody coated plate with a multichannel pipette.
- \* When adding solution to the microplate, avoid touching the inner wall of microcup with the pipet tip. This technique avoids non-specific reaction.

#### STEP 2. (Washing)

Wash the wells 4 times with Wash solution following the Washing Method.

For <u>Washing Method</u>, refer to "<u>♦ Microplate Coating with capture antibody</u>, STEP 2".

#### STEP 3. (Detection antibody incubation)

- 1) Add 100 µL of diluted detection antibody to each well.
- 2) Incubate for 1 hour at room temperature.
  - \* Avoid touching the inner wall of the wells with the pipette tip. Otherwise, it could cause of non-specific reaction.
  - \* Please confirm the optimal dilution ratio with the data sheet of the Ab-Match Assembly kit.

## STEP 4. (Washing)

Wash the wells 4 times with **Wash solution** following the <u>Washing Method</u>.

## **STEP 5. (SA-HRP incubation)**

In case that the detection antibody is conjugated with HRP, STEP 5 and 6 are not needed.

- 1) Add 100 µL of diluted SA-HRP solution to each well.
- 2) Incubate for 30 minutes at room temperature.
  - \* Avoid touching the inner wall of the wells with the pipette tip. Otherwise, it could cause of non-specific reaction.

#### STEP 6. (Washing)

Wash the wells 4 times with **Wash solution** following the <u>Washing Method</u>.

## **STEP 7. (Substrate incubation)**

Add 100 µL of Substrate Solution to each well. Incubate for 30 minutes at room temperature.

# **STEP 8. (Stopping reaction)**

Add 100 µL of Stop Solution to each well.

#### **♦** Reading

Using microplate reader, read the absorbance of each well at 450 nm and the reference at 620 nm.

- \* Read absorbance within 30 minutes after reaction stop.
- \* Ensure that the back of the plate is clean and dry, and that no air bubbles are present on the surface of the liquid in the wells before reading.

# **♦** Calculation of result

Calculate the mean absorbance value of each standard and plot against log standard concentration and connect the points the best fitting straight line. The concentration of the samples then can be read from this standard curve. Alternatively a suitable computer and curve-fitting program can be used. The concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

- \* If a sample's OD is out of range for the standard curve, the assay should be repeated with a higher sample dilution. ODs should always remain below 2.0 in order to remain in the dynamic range of the detection system.
- \* When computer software is used, logistic, 3 (4) -para-logit-log, or Spline may be used as calculation.
- \* A concentration conversion spreadsheet using 4-para-Logistic regression with Excel 2000 (Microsoft) is available Calculation Program Operating Manual: <a href="https://ruo.mbl.co.jp/product/cancer/img/abmatch/manual\_e.pdf">https://ruo.mbl.co.jp/product/cancer/img/abmatch/manual\_e.pdf</a>
  Calculation Program: <a href="https://ruo.mbl.co.jp/product/cancer/img/abmatch/logistic\_e.xls">https://ruo.mbl.co.jp/product/cancer/img/abmatch/logistic\_e.xls</a>

## ■ Storage and Stability

All kit components must be stored at 2~8°C. All reagents are stable for 12 months after manufacturing when stored at the indicated conditions.

#### **■** Manufacturer

MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

URL <a href="https://ruo.mbl.co.jp">https://ruo.mbl.co.jp</a>
e-mail <a href="mailto:support@mbl.co.jp">support@mbl.co.jp</a>
TEL 052-238-1904





For Research Use Only, Not for use in diagnostic procedures.

# **Ab-Match Universal kit**

技術資料や、関連情報はホームページからご利用頂けます。https://ruo.mbl.co.jp/product/cancer/abmatch.html

## ■ 特徴

Ab-Match Universal kit は、96-well マイクロプレート、各種緩衝液 (buffer)、各種希釈用緩衝液 (diluent)、酵素基質液 (Substrate Solution)、反応停止液 (Stop Solution) から構成されています。ELISA 法にて標的タンパク質を測定するためには、本製品と、別途販売している Ab-Match Assembly kit シリーズの両方が必要です。

このセットで96-wellマイクロプレート1枚分の測定が可能です。

本製品は研究用試薬です。ヒトの体内に用いたり、診断の目的に使用しないでください。

# ■ 測定原理

本製品と、別途販売している Ab-Match Assembly kit シリーズを組み合わせて使用することにより、標的タンパク質を測定するためのサンドイッチ ELISA システムを構築します。

最初に固相用抗体(capture antibody)を 96-well マイクロプレートに固相化します。ここに standard およびサンプルを添加すると、プレート上の capture antibody と標的抗原が結合します(一次反応)。プレートを洗浄し、未結合の標的抗原を除去します。

次に、検出用抗体(detection antibody)を添加し、標的抗原と結合させます(二次反応)。プレートを 洗浄し、未反応の detection antibody を除去します。

その後、酵素反応により発色させます。反応停止液(Stop Solution)を加えて酵素反応を停止させ、吸 光度(450 nm)を測定します。

一次反応で capture antibody と結合した標的抗原の量に比例してその後の反応が起きるため、得られたサンプルの吸光度は、サンプル中の標的抗原の量を反映しています。standard の吸光度からサンプル中の標的抗原の濃度を算出します。

## ■ **キット構成** 96 wells

#### **Ab-Match Universal kit:**

Name	Materials	Quantity (for 1 kit)
Microwell strips	Non coated microwell strips	$8$ -well $\times$ 12 strips
Coating Buffer	Carbonate buffer solution (ready-to-use)	$12 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$
<b>Blocking Agent</b>	Contains BSA and sucrose (ready-to-use)	$24 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$
Sample Diluent	Buffer for diluting samples (ready-to-use) Contains BSA, Tween 20 and HAMA-Blocker	$50 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$
Wash Concentrate	Buffer for washing microwells (20×) Contains Tween 20	$50 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$
SA-HRP Diluent	Buffer for diluting SA-HRP (ready-to-use) Contains BSA	$15 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$
Substrate Solution	TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> solution (ready-to-use)	$20 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$
<b>Stop Solution</b>	0.25 mol/L sulfuric acid (ready-to-use)	$20 \text{ mL} \times 1 \text{ bottle}$

注)Ab-Match Universal kit の構成品は 2-8℃ で保存してください。Microwell strips は室温でも保存可能です。 **構成品は、必ず室温(20-30℃)に戻してから使用してください。** 

## ■ 注意事項

- ・有効期限の切れた試薬は使用しないでください。
- 標準曲線は、測定ごとに設定してください。
- ・分注、および希釈操作は正確におこなってください。
- ・Substrate Solution と Stop Solution は、十分注意して取り扱ってください。もし、誤って目や口に入ったり皮膚に付着した場合は水で十分に洗い流すなどの応急処置をおこない、必要があれば、医師の手当てを受けてください。
- ・Substrate Solution は金属イオンにより酸化されやすいため、ディスポーザブルの新しい器具を 使用し、試薬ボトルからリザーバーへ移す際にもディスポーザブルのピペットを使用してくださ い。また、一度リザーバーへ移した Substrate Solution は、試薬ボトルへ戻さないでください。
- ・血清サンプル等は感染の可能性があるものとして注意して取り扱ってください。測定に使用した 器具は、次のいずれかの方法で処理した後、廃棄してください。
  - \* 2% グルタルアルデヒド溶液 (final concentration) に 1 時間以上浸漬する。
  - \* 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液(塩素がおよそ 5,000 ppm 存在下)に1時間以上浸漬する。
  - \* 121℃で20分間以上高圧蒸気滅菌する。
- ・記載の反応時間は、参考例です。静置反応中における頻繁なプレートの移動や、プレート周辺の 機器からの振動は、反応液に撹拌効果を与えます。そのことにより、通常より反応が進み、強い 発色を示すことがありますので注意してください。

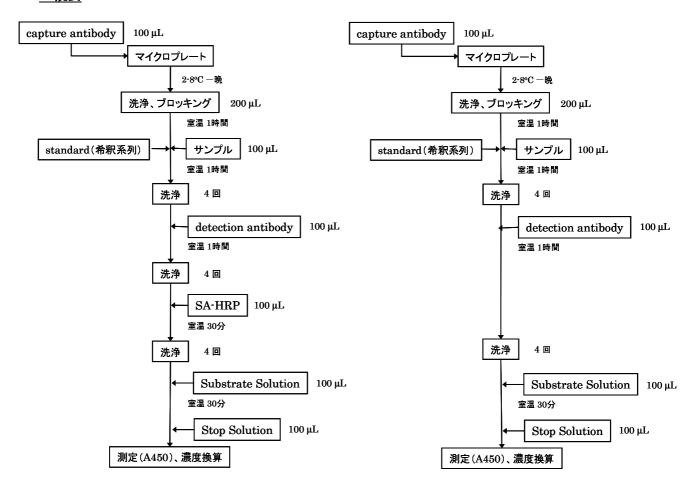
## ■ 操作法

Ab-Match Assembly kit の standard および抗体液を、Ab-Match Universal kit の各種緩衝液で調製し、使用してください。Ab-Match Universal kit には、Ab-Match Assembly kit 1キット分の調製に必要な量の 96-well マイクロプレート、各種緩衝液(buffer)、各種希釈用緩衝液(diluent)、酵素基質液(Substrate Solution)、反応停止液(Stop Solution)が入っています。

構成品は、必ず室温(20-30°C)に戻してから使用してください。

アッセイ手順は Ab-Match Assembly kit によって多少異なります。ご使用の際は、各 Ab-Match Assembly kit の添付文書をよく読み、ご確認ください。

# **◆ 概要**



\* <u>ご使用の際は、各 Ab-Match Assembly kit の添付文書をよく読み、ご確認ください。</u>

#### ◆ 試薬の調製

囲み文字 ( で示した試薬は、Ab-Match Universal kit の構成品です。各バイアルは使用前に遠心し、容器の壁について内容物を落とした後にご使用ください。

#### 1. Wash Solution

Wash Concentrate を精製水で 20 倍に希釈し、Wash Solution としてください。 (例 50 mL の Wash Concentrate を 950 mL の精製水に加える)。 調製後は 2-8℃ で保存すると 2 週間安定です。

#### 2. standard (Ab-Match Assembly kit 構成品)

Sample Diluent または培養液を用いて standard を 10 倍に希釈し、**調製済み standard** を作製します。この**調製済み standard** をスタンダードの最高濃度として、Sample Diluent または培養液を用いて 2 倍連続希釈法により 5 から 7 ポイントの希釈系列を作製します。 さらに、希釈に用いた Sample Diluent または培養液を Blank (濃度 0) とします。 standard は必ず凍結保存してください。溶解後は速やかに小分け分注して-20℃ 以下で保存してください。

## 3. capture antibody (Ab-Match Assembly kit 構成品)

Coating Buffer を用いて、<u>capture antibody</u>を希釈します。

希釈液は必要量のみ用時調製し、保存しないでください。

ご使用の際は、各 Ab-Match Assembly kit の添付文書をよく読み、ご確認ください。

## 4. detection antibody (Ab-Match Assembly kit 構成品)

Biotin conjugated <u>detection antibody</u> は <u>Sample Diluent</u> を用いて希釈します。

HRP conjugated <u>detection antibody</u> は <u>SA-HRP Diluent</u> を用いて希釈します。

希釈液は必要量のみ用時調製し、保存しないでください。

ご使用の際は、各 Ab-Match Assembly kit の添付文書をよく読み、ご確認ください。

# 5. Streptavidin conj. Peroxidase (Ab-Match Assembly kit 構成品)

**SA-HRP solution** が必要な場合は、**SA-HRP Diluent** を用いて <u>Streptavidin conj. Peroxidase</u> (SA-HRP) を希釈し、**SA-HRP solution** としてください。

希釈液は必要量のみ用時調製し、保存しないでください。

ご使用の際は、各 Ab-Match Assembly kit の添付文書をよく読み、ご確認ください。

# ◆ 抗体の固相化

囲み文字 ( ) で示した試薬は、Ab-Match Universal kit の構成品です。

# STEP 1. (固相化反応)

- 1) capture antibody を Coating Buffer を用いて希釈し、転倒混和により静かに撹拌します。
- 2) 直ちに、マルチチャンネルピペット等を用いて 100 μL ずつ各ウェルに分注します。蒸発を防ぐためにシール等をして、2-8°C で一晩静置します。
  - \* 使用する容器は、タンパク等の混入のない物を使用してください。15 mL チューブが便利です。
  - \* 希釈倍数は、ご使用になる Ab-Match Assembly kit の添付文書をご確認ください。

#### STEP 2. (洗浄)

抗体液を除去した後、直ちに生理食塩水 (NaCl 9.0 g/1,000 mL) で2回洗浄します。

#### 洗浄方法

反応液を捨てた後、洗浄ビンを用いて洗浄液を各ウェルに満たし、同様に捨てます。洗浄液を捨てる際、フレームからストリップが外れないようご注意ください。この操作を数回繰り返します。

その後、プレートをペーパータオルなどにたたきつけて完全に洗浄液を除去してください。

- \* 自動洗浄機を用いる場合、使用する機種や設定により最適洗浄回数が異なる場合があります。あらかじめ各施設で用いる自動洗浄器の最適洗浄回数を確認する事をお勧めします。
- \* ウェルを乾燥させないように、洗浄操作はできるだけ速やかにおこなってください。

#### STEP 3. (プロッキング)

- 1) マルチチャンネルピペット等を用いて  $\overline{Blocking\ Agent}$  を 200  $\mu L$  ずつ各ウェルに分注し、室温で 1 時間静置します。
- 2) ウェル内の Blocking Agent を完全に除去した後、次の操作に移ってください。
  - \* 抗体液の除去からブロッキングまではウェルが乾燥しないようにできるだけ速やかに行ってください。
  - \* ブロッキングが終了した感作プレートは、乾燥化処理を行うことで長期保存が可能です。 Blocking Agent を吸引除 去した後、扇風機などで風を送りながら室温で3時間から一晩おいて乾燥させてください。乾燥後のプレートは防 湿条件下で保管してください。なお、乾燥化の条件によっては、乾燥化しない場合よりも発色が低下することがありますのでご注意ください。

## ◆ 測定操作

Duplicate での測定(2 重測定)を推奨します。標準曲線は測定ごとに設定してください。 STEP 1. (一次反応)

- 1) Sample Diluent または培養液を用いて standard を 10 倍に希釈し、**調製済み standard** を作製します。この**調製済み standard** をスタンダードの最高濃度として、Sample Diluent または培養液を用いて 2 倍連続希釈法により 5 から 7 ポイントの希釈系列を作製します。さらに、希釈に用いた Sample Diluent または培養液を Blank としておきます。
- 2) サンプルを Sample Diluent または培養液を用いて適切に希釈調製します。
  - \* 培養上清を測定する場合、standard の希釈には培養に用いた培養液を使用してください。
  - \* Sample Diluent には、ヒト血液中に含まれるヒト抗マウス抗体 (HAMA) の影響を抑えるため、HAMA-Blocker が含まれています。
- 3) 調製した standard およびサンプルを、固相化したプレートに各ウェル 100  $\mu$ L となるように分注します。

室温で1時間静置します。

- \* ウェルにサンプルを添加した時点から抗原抗体反応が始まりますので、操作はできるだけ短時間のうちにおこなってください。あらかじめ別のマイクロプレートに standard やサンプルを希釈しておき、そこからマルチチャンネルピペット等により固相化プレートに添加することをお勧めします。
- \* ウェル間のコンタミネーションを防ぐため、分注に用いるチップは1サンプルごとに交換してください。
- \* 非特異反応の原因となりますので、できるだけウェルの内壁にチップを当てないようにして操作してください。

#### STEP 2. (洗浄)

**Wash Solution** を用いて、<u>洗浄方法</u>に従い4回洗浄します。

洗浄方法については "◆ 抗体の固相化の STEP 2"を参照ください。

#### STEP 3. (二次反応)

- 1) 希釈した detection antibody を 100 μL ずつ各ウェルに分注します。
- 2) 室温で1時間静置します。
  - \* 非特異反応の原因となりますので、できるだけウェルの内壁にチップを当てないようにして操作してください。
  - \* 希釈倍数は、ご使用になる Ab-Match Assembly kit の添付文書をご確認ください。

## STEP 4. (洗浄)

Wash Solution を用いて、洗浄方法に従い4回洗浄します。

#### STEP 5. (SA-HRP 添加)

HRP conjugated detection antibody を使用する場合は、STEP 5.、6.の操作は不要です。

- 1) 調製した SA-HRP solution を 100 μL ずつ各ウェルに分注します。
- 2) 室温で30分静置します。
  - \* 非特異反応の原因となりますので、できるだけウェルの内壁にチップを当てないようにして操作してください。

#### STEP 6. (洗浄)

Wash Solution を用いて、洗浄方法に従い4回洗浄します。

#### STEP 7. (酵素反応)

Substrate Solution を 100 μL ずつ各ウェルに分注し、室温で 30 分静置します。

# STEP 8. (反応停止)

Stop Solution を 100 μL ずつ各ウェルに添加します。

#### **CODE No. 5310**

## ◆ 吸光度の測定

マイクロプレートリーダーを用いて主波長 450 nm、副波長 620 nm にて吸光度を測定してください。

- \* 反応停止後、30分以内に吸光度の測定をおこなってください。
- \* プレートの裏側は汚れのない乾いた状態を保つようにしてください。また、吸光度を測定する前にウェル内に気泡がないことを確認してください。

# ◆ 濃度算出

濃度算出に吸光光度計付属の専用コンピューターソフトを使用する場合、プログラムの使用法に準じ、サンプル中の濃度を算出します。市販の濃度算出ソフトを用いない場合、測定した standard の濃度と得られた吸光度から標準曲線を作成します。得られたサンプルの吸光度にあたる濃度を標準曲線から読み取ります。測定時の希釈倍数を乗じてサンプルの濃度としてください。

- \* サンプルの吸光度が標準曲線の範囲に入らなかったときは、サンプルの希釈倍数を変えて測定しなおしてください。
- \* コンピューターソフトを使用する場合、回帰式としては、ロジスティック、ロジットログ3次(または4次)、スプライン等を使用してください。
- \* エクセル (Excel 2000) による Logistic 回帰式を用いた濃度換算プログラムが利用できます。弊社ホームページよりダウンロードしてください。

演算プログラム操作手順書: <a href="https://ruo.mbl.co.jp/product/cancer/img/abmatch/use.pdf">https://ruo.mbl.co.jp/product/cancer/img/abmatch/use.pdf</a> <a href="https://ruo.mbl.co.jp/product/cancer/img/abmatch/logistic.xls">https://ruo.mbl.co.jp/product/cancer/img/abmatch/use.pdf</a> <a href="https://ruo.mbl.co.jp/product/cancer/img/abmatch/logistic.xls">https://ruo.mbl.co.jp/product/cancer/img/abmatch/use.pdf</a>

# ■ 保存と有効

2~8℃にて保存してください。有効期間は製造後12ヶ月です。

## ■ 製造元

株式会社 医学生物学研究所

URL https://ruo.mbl.co.jp

e-mail support@mbl.co.ip, TEL 052-238-1904