

[LBIS Mouse IgE ELISA Kit]

Cat # 639-02891

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 Mouse IgE ELISA Kit is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of mouse IgE. This 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

IgE (Immunoglobulin E) is a glycoprotein with a molecular size of 190 kDa composed of 2 light chains and 2 heavy chains (H ϵ). In electrophoresis, it moves to γ 1 region. Its biological half life is about 3 days, and its blood level in normal human subject is very low, about 300ng/mL. The blood level of IgE increases markedly in parasite infection and in hay fever. IgE that is responsible for allergy has been called "reagin". Sensitization by an allergen increases reagin IgE which binds to Fc ϵ R1 receptor in basophilic leucocytes and mast cells at Fc region and sensitizes those cells. If the allergen binds the sensitized cells, those cells will be degranulated and release histamine, serotonin, protease, heparin, chemotactic factor, prostaglandins, leukotrienes, and so on, causing bronchoconstriction, mucous edema, and hypersecretion, and leads to type I allergic reactions like bronchial asthma, hives, allergic rhinitis, anaphylaxis, and so on. This is the assay kit for total mouse IgE. FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation is also providing assay kits for allergen (OVA) -specific mouse IgE.

4. Assay principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS Mouse IgE ELISA Kit, standards or samples are incubated in monoclonal antibody coated wells to capture IgE. After 2 hours' incubation and washing, biotinylated anti-mouse IgE antibody is added and incubated further for 2 hours' to bind with captured IgE. After washing, HRP (horse radish peroxidase)-conjugated streptavidin is added, and incubated for 1 hour. 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 IgE concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against standard IgE concentrations. IgE 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.
- In treating assay samples of animal origin, be careful for possible biohazards.
- 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 mucous 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.

LBIS Mouse IgE ELISA Kit

- 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) Antibody coated plate	Use after washing	96 wells/1 plate
(B) IgE Standard solution (100 ng/mL) (derived from mouse)	Concentrated. Use after dilution	600 µL/1 vial
(C) Buffer solution	Ready for use.	60 mL/1 bottle
(D) Biotinylated anti-mouse IgE antibody	Concentrated. Use after dilution.	10 µL/1 vial
(E) HRP-conjugated streptavidin	Concentrated. Use after dilution.	20 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 5 µL precisely, and another for 10µL - 100 µL and 100 µL - 500 µL. Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipette 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 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) IgE Standard solution (100 ng/mL)]

Make a serial dilution of master standard (100 ng/mL) solution to prepare each standard solution.

Volume of standard solution	(C) Buffer solution	Concentration (ng/mL)
Original solution	0 µL	100
Original solution 150 µL	50 µL	75
Original solution 100 µL	100 µL	50
Original solution 50 µL	150 µL	25
Original solution 20 µL	180 µL	10
Original solution 5 µL	495 µL	1.0
0 (Blank)	200 µL	0

[(D) Biotinylated anti-mouse IgE antibody]

Prepare working solution by dilution of (D) with the buffer solution (C) to **1:1000**.

[(E) HRP-conjugated streptavidin]

LBIS Mouse IgE ELISA Kit

Prepare working solution by dilution of (E) with the buffer solution (C) to **1:2000**.

[(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) Antibody coated plate]

If seal is not removed, put the strip back in a plastic bag with zip-seal originally used for well-plate container and store at 2 °C - 8 °C. The strip will be stable until expiration date.

[(B) IgE Standard solution (100 ng/mL)]

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

The rest of original standard: if stored tightly closed at 2 °C – 8 °C, it is stable until expiration date.

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

If not opened, store at 2 °C - 8 °C. It maintains stability until expiration date. Once opened, we recommend using as soon as possible to avoid influence by environmental condition.

[(D) Biotinylated anti-mouse IgE 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 blue 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 IgE in mouse serum or plasma. The necessary sample volume for the standard procedure is 5 µL.

Samples should be immediately assayed or stored below –35 °C until assay. Dilution of a sample should be made in a test tube using buffer solution prior to adding them to wells. Turbid samples or those containing insoluble materials should be centrifuged before testing to remove any particulate matter.

Hemolytic and hyperlipemic serum 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 80 mg/dL with this kit.**

If presence of interfering substance is suspected, examine by dilution test at more than 2 points.

Storage and stability

LBIS Mouse IgE ELISA Kit

Use samples soon after collected. Collected samples can be stable within 1 week after collection if stored at 2 °C - 8 °C. 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 antibody coated plate (A) by filling the wells with 300 μ L of washing buffer and discard 3 times (*②), then strike the plate upside-down onto several sheets of paper towel to remove residual buffer in the wells.
- (2) Pipette 50 μ L of properly diluted samples to the designated sample wells.
- (3) Pipette 50 μ L 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 2 hours at 20 °C - 25 °C.
- (6) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (7) Pipette 50 μ L of biotinylated anti-mouse IgE antibody to all wells, and shake as step (4).
- (8) Stick a plate seal (*④) on the plate and incubate the plate for 2 hours at 20 °C - 25 °C.
- (9) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (10) Pipette 50 μ L 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 1 hour at 20 °C - 25 °C.
- (12) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (13) Pipette 50 μ L 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 μ L 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.

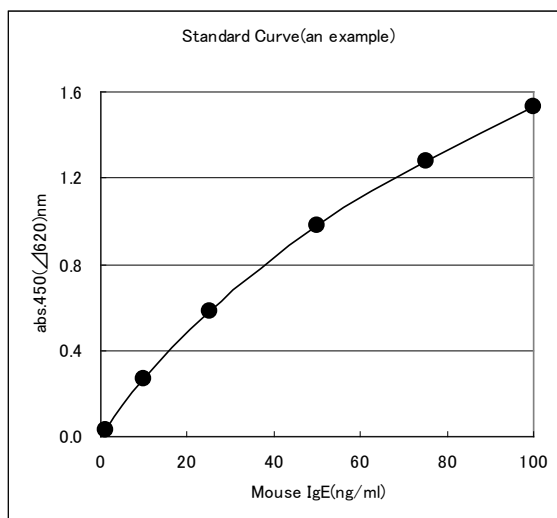
*Refer to the page 6-7 for notes of *②, *③ and *④.

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



Absorbance may change due to assay environment

13. Performance characteristics

● Assay range

The assay range of the kit is 1 ng/mL ~ 100 ng/mL.

● Specificity

The antibodies used in this kit are specific to IgE. Cross-reactivity of the kit is shown below.

Substances	Cross-reactivity	Concentration
Mouse IgE	100 %	100 ng/mL
Mouse IgG	< 0.01 %	1 mg/mL
Mouse IgA	< 0.01 %	1 mg/mL
Mouse IgM	< 0.01 %	1 mg/mL
Rat IgE	< 0.1 %	100 ng/mL
Human IgE	< 0.1 %	100 ng/mL
BSA	< 0.01 %	10 mg/mL

● Precision of assay

Within assay variation (3 samples, 5 replicates assay) Mean CV was within 10 %.

● Reproducibility

Between assay variation (3 samples, 4 days, 5 replicates assay) Mean CV was within 10 %.

● Recovery test

Standard IgE was added in 2 concentrations to 2 serum samples and were assayed.

The recoveries were 99.7 % - 103 %.

● Dilution test

Serum sample was serially diluted by 3 steps.

The dilution curves showed linearity with $R^2 = 0.999$.

14. Reference assay data

Mouse IgE assay data

Mean assay value: 85 ng/mL, SD: 18 ng/mL

Mouse strains: NC/Nga, female, 5 weeks-old

Number of animals: 24 Samples: serum

These data should be considered as guidance only. Each laboratory should establish its own normal and pathological reference ranges for IgE 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-mouse IgE antibody, HRP-conjugated streptavidin, or chromogen (TMB) might not be added.
- 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of biotin-conjugated anti-IgE antibody or HRP-conjugated streptavidin.
- 4) Contamination of peroxidase 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 (1.0 ng/mL).

Possible explanations:

Improper or inadequate washing. (Change washing frequency from 3 times to 4-6 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?

LBIS Mouse IgE ELISA Kit

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.

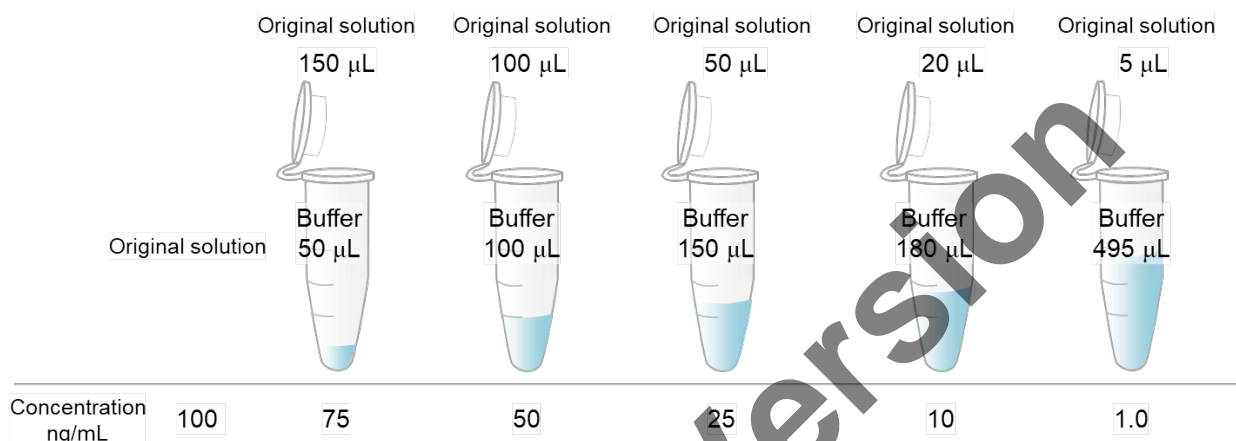
Summary of assay procedure : Use as a check box

*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).

IgE Standard solution dilution example:



<input type="checkbox"/> Antibody coated plate		
<input type="checkbox"/> ↓Washing 3 times (*②)		*⑥
<input type="checkbox"/> Diluted samples, or Standards	50 μL	
<input type="checkbox"/> ↓Shaking (*③), Incubation for 2 hours at 20 °C - 25 °C (Standing (*④))		
<input type="checkbox"/> Dilute biotinylated anti-mouse IgE antibody (D) to 1000× with buffer (C) returned to 20 °C - 25 °C .		
<input type="checkbox"/> ↓Washing 3 times (*②)		*⑥
<input type="checkbox"/> Biotinylated anti-mouse IgE antibody	50 μL	
<input type="checkbox"/> ↓Shaking (*③), Incubation for 2 hours at 20 °C - 25 °C. (Standing (*④))		
<input type="checkbox"/> Dilute HRP-conjugated streptavidin (E) to 2000× with buffer (C) returned to 20 °C - 25°C.		
<input type="checkbox"/> ↓Washing 3 times (*②)		*⑥
<input type="checkbox"/> HRP-conjugated streptavidin	50 μL	
<input type="checkbox"/> ↓Shaking (*③), Incubation for 1 hour at 20 °C - 25 °C. (Standing (*④))		
<input type="checkbox"/> ↓Washing 3 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) immediately using a plate reader. (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 3 times to 4-6 times at the constant stroke after

LBIS Mouse IgE ELISA Kit

the reaction with HRP-conjugated streptavidin.

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

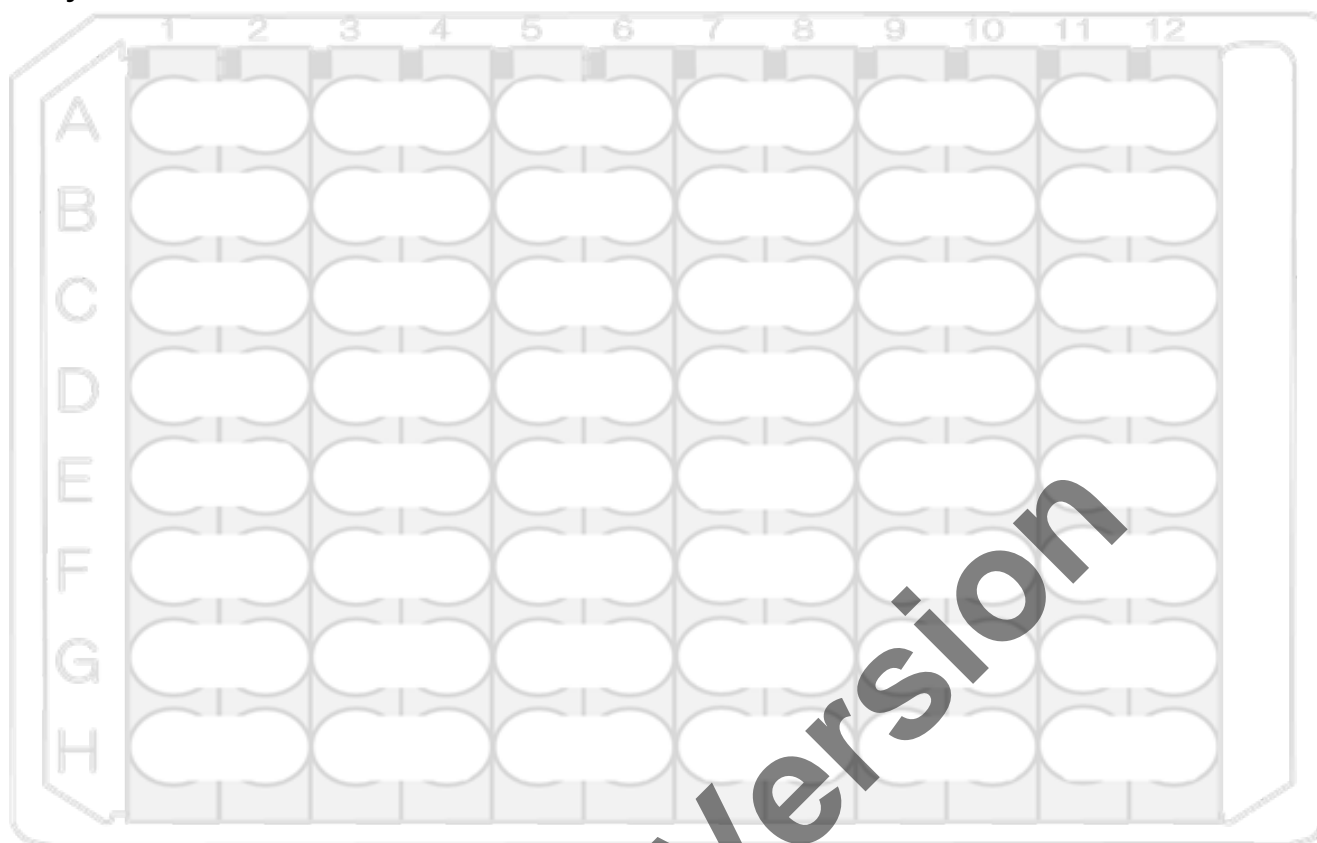
- *③ Guideline of shaking: 600 rpm - 1,200 rpm for 10 seconds × 3 times.
- *④ Seal the plate during the reaction after shaking. Peel off the protective paper from the seal and stick the seal on the plate. Do not reuse the plate seal used once.
- *⑤ 600 nm - 650 nm can be used as reference wavelength.
- *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	100 ng/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
B	75 ng/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
C	50 ng/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
D	25 ng/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
E	10 ng/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
F	1.0 ng/mL	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39
G	0 (Blank)	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32	Sample 40
H	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33	Sample 41

Example Version

Assay worksheet



LBIS Mouse IgE 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 #] 639-02891

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>

『レビス® IgE - ELISA キット (マウス)』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

IgE (Immunoglobulin E、免疫グロブリン E) は5番目に発見された免疫グロブリンで、ドメイン5個 (VH、CH_ε 1~4) から構成されているH_ε鎖2本とL鎖2本からなる分子量約190000の糖タンパク質で、電気泳動的にはγ1領域に移動します。代謝半減期は約3日で、正常人の血清中での濃度はきわめて低く300 ng/mL程度ですが、寄生虫の感染や枯草熱で増加します。アレルギーに関与するIgEはレアギンと呼ばれていますが、アレルギーで感作された際増加したレアギンは皮膚、呼吸器、消化器などに存在する好塩基性顆粒球や肥満細胞のFcεR1受容体とFc部位で結合し、細胞を感作し、これにアレルギーが結合すると細胞は脱顆粒を起こしてヒスタミン、セロトニン、プロテアーゼ、ヘパリン、化学走性因子、プロスタグランジン、ロイコトリエン等を放出させ、気管支収縮や粘膜浮腫、分泌高進などにより、気管支喘息、一部のじんま疹、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー等のI型アレルギー反応を惹き起こします。

弊社では全般的なマウスIgE及び特定のアレルゲン(OVA)に特異的なマウスIgE測定キットを提供しております。

本キットはマウスIgE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5時間20分です。
- マウス血清または血漿中のIgEを測定します。
- 微量な検体(標準操作法は5 µL)で測定可能です。
- 1キットは96ウェルです。
- 標準品はマウス由来のものです。
- 全ての試薬は溶液タイプです。

2. 測定原理

本キットは標準品、希釈検体を抗IgE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。2時間のインキュベーションと洗浄後、ビオチン結合抗IgEモノクローナル抗体を加え捕捉されたIgEとともに2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、1時間インキュベートします。再度の洗浄後、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IgE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℃~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。

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5 µLを正確にピペティングできるもの、及び10 µL~100 µL、100 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)、50 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. 構成品

構成品	状態	容量
(A) Antibody 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) IgE Standard solution (100 ng/mL) 標準 IgE 溶液 (マウス) (100 ng/mL)	希釈後使用	600 µL/1 本
(C) Buffer solution 緩衝液	そのまま使用	60 mL/1 本
(D) Biotinylated anti-mouse IgE antibody ビオチン結合抗 IgE 抗体	希釈後使用	10 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	20 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	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 (10×)	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 °C~25 °C)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) IgE Standard solution (100 ng/mL)] ; 標準曲線作成用

(B) IgE Standard solution (100 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	(C) Buffer solution	濃度 (ng/mL)
標準溶液原液	0 µL	100
原液 150 µL	50 µL	75
原液 100 µL	100 µL	50
原液 50 µL	150 µL	25
原液 20 µL	180 µL	10
原液 5 µL	495 µL	1.0
0 (Blank)	200 µL	0

[(D) Biotinylated anti-mouse IgE antibody]

10 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 **1000 倍** に希釈してください。2 段階希釈をお勧めします。

[(E) HRP-conjugated streptavidin]

20 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 **2000 倍** に希釈してください。2 段階希釈をお勧めします。

[(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) Antibody 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 °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) IgE Standard solution (100 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

LBIS Mouse IgE ELISA Kit

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。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 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-mouse IgE 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×)

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

本キットはマウス血清または血漿中の IgE を測定します。

- 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。
- 採血の際にヒト用の採血管をご使用になるのは避けてください。血清分離促進剤等の添加剤が測定系に影響を与える可能性が考えられます。
- 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）を抑制する為に原検体中の脂質（乳び）・溶血が高い場合は異常値発生の原因となる場合がありますので測定に使用しないでください。本キットの場合、溶血は 80 mg/dL 以上で影響が現れます。
- 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。
- 検体は測定範囲に入るよう、キット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（PP、PE、ガラス製）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。

【検体の安定性と保存方法】

検体は採取後すぐに測定するか、1週間以内に測定する場合は 2℃～8℃で保存してください。また、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。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。

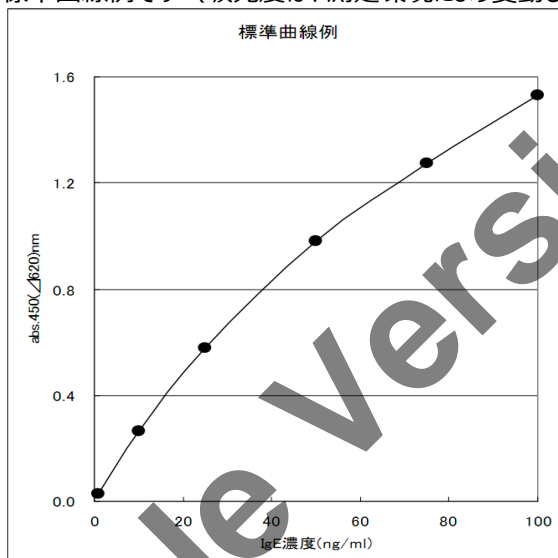
抗体固相化プレートのシールは、プレートが十分に室温に戻ってから剥がしてください。

- (1) あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし、3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) 検体測定ウェルに予め適度に希釈した検体を 50 µL ずつ分注します。標準操作法では 10 倍希釈（緩衝液を 45 µL、検体を 5 µL）。
 - (3) 標準品測定ウェルに各 IgE 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 2 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、3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 IgE 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 2 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 3 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 1 時間静置（*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 3 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 50 µL 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 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（14、15 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。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、希釈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（本測定法では 10 倍）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。
- (3) 反応温度が高い場合、吸光度が全体的に高くなります。測定機器によりますが吸光度の信頼性のない領域の標準曲線は使用しないでください。また、反応温度を 20 °C～25 °C 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。
 - * マウス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必要があります。

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

マウス IgE を 1 ng/mL～100 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マウス IgE に対して特異的です。関連物質を本キットで測定しました結果は下表の通りです。

検体名	交差性	対象物質濃度
マウス IgE	100 %	100 ng/mL
マウス IgG	< 0.01 %	1 mg/mL
マウス IgA	< 0.01 %	1 mg/mL
マウス IgM	< 0.01 %	1 mg/mL
ラット IgE	< 0.1 %	100 ng/mL
ヒト IgE	< 0.1 %	100 ng/mL
BSA	< 0.01 %	10 mg/mL

●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）（5 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 2 濃度の IgE を添加し測定した結果、回収率は 99.7 %から 103 %でした。

●希釈直線性

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 0.9997 でした。

11. 参考値

マウス IgE 測定値 : 平均 85 ng/mL、SD 18 ng/mL

亜種 : NC/Nga、雌、5 週齢、24 匹、血清

飼育条件、採血条件、検体保管条件により測定値は変動しますので、この測定値は目安としてお使いください。

12. トラブルシューティングと Q&A

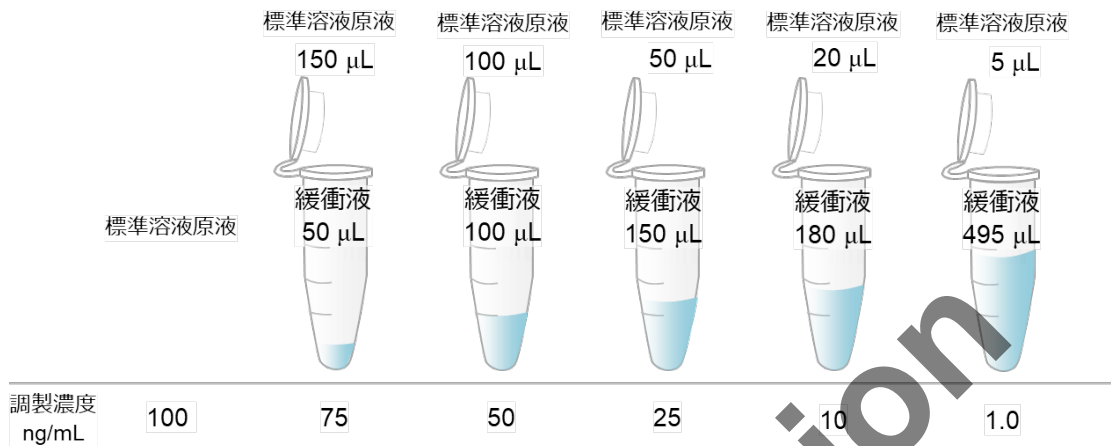
- すべてのウェルでの反応が弱い
原因として考えられること
 - 1) 標準品や検体の入れ忘れ。
 - 2) 発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
 - 3) 発色に関連する試薬溶液の取り違いや希釈調製不良。
 - 4) ペルオキシダーゼ酵素阻害剤の混入。
 - 5) キット保管温度の影響（凍結した場合）。
 - 6) プレートの過剰な洗浄。
 - 7) 発色液の温度が低かった。
- 最小標準溶液濃度 (1.0 ng/mL) の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。
原因として考えられること
洗浄が不適當、不完全であった。
(ペルオキシダーゼ・アビジン結合物と反応後の洗浄回数 3 回を同じ流速で 4 回～6 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を切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 : 出荷時に保存安定液が充填してあります。

LBIS Mouse IgE ELISA Kit

【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×) の希釈 : 室温化された精製水で、**10 倍**に希釈してください。
- (B) IgE Standard solution (100 ng/mL) の希釈 (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		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 3 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> 希釈検体 (例えば緩衝液 45 µL+検体 5 µL) または標準溶液	50 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20 °C~25 °C)、2 時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> (D) Biotinylated anti-mouse IgE antibody の希釈。室温化された (C) Buffer solution で、 1000 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。2 段階希釈をお勧めします。		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 3 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 IgE 抗体	50 µL	
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20 °C~25 °C)、2 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、 2000 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。2 段階希釈をお勧めします。		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄 3 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 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 3 回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> 発色液 (TMB) 分注後、濃度により青色に変色	TMB が室温化されていることを確認	50 µL
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20 °C~25 °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	強酸性につき取扱注意	50 µL
<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。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。3 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 (1.0 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 3 回を同じ流速で 4 回~6 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

LBIS Mouse IgE ELISA Kit

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。

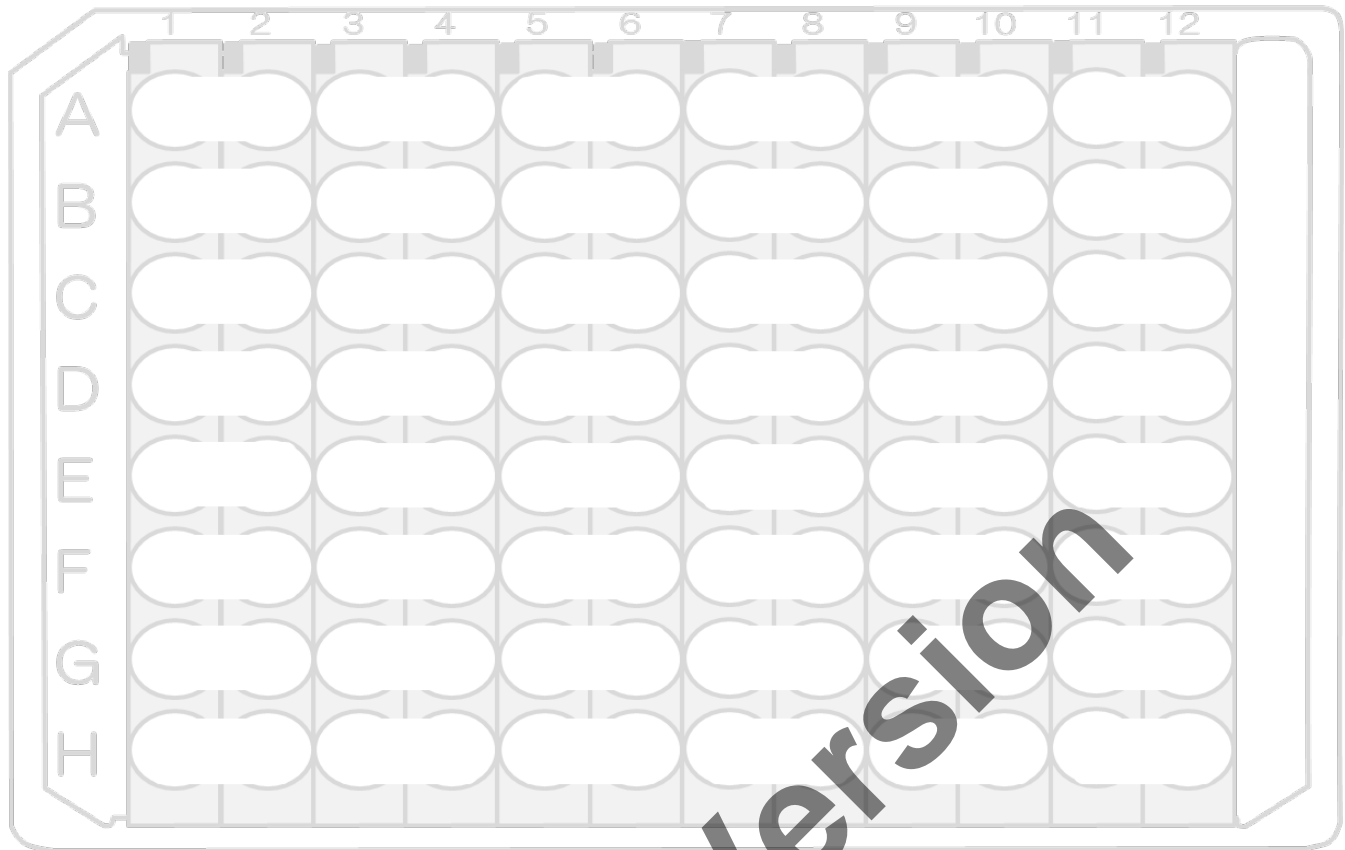
プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けてください。一度使用したプレートシールは再使用しないでください。

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	100 ng/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
B	75 ng/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
C	50 ng/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
D	25 ng/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
E	10 ng/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
F	1.0 ng/mL	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
G	0 (Blank)	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40
H	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33	検体 41

◆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℃～25℃（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青色透明です。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。



【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® IgE-ELISA キット (マウス)

【和光コード】

639-02891

【英語表記】

LBIS Mouse IgE 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>