

LBIS™ Mouse IL-6 ELISA Kit

Please, read this instruction carefully before use.

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

1. Intended use

Mouse IL-6 is a secreted glycoprotein of 187 amino acids and it was discovered to be a cytokine that differentiates B cells into antibody-producing cells. It is also known to play an important role in various physiological processes such as immune response, inflammatory response, hematopoiesis, and the proliferation and differentiation of nervous system cells. After being produced by T cells, monocytes, fibroblasts, endothelial cells, keratinocytes, etc., it binds to the IL-6 receptor, which consists of two chains of IL-6R α and gp130, and signals are transduced. There is also a study that suggested that a possible correlation exists between IL-6 levels and disease activity in rheumatoid arthritis, and it is also attracting attention in the field of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and inflammatory diseases.

This kit is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of mouse IL-6. It can measure IL-6 in mouse serum (plasma) and culture supernatant, specifically and with high sensitivity. This product is intended for research use only. Not for use in diagnostics procedures.

2. Assay principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS™ Mouse IL-6 ELISA Kit, standards or samples are incubated in monoclonal antibody-coated wells to capture mouse IL-6. After 2 hours' incubation and washing, biotin-conjugated antibody is added and incubated for a further 1 hour to bind with captured mouse IL-6. After washing, peroxidase-conjugated streptavidin is added, and incubated for 30 minutes. After washing, bound peroxidase-conjugated streptavidin is reacted with a chromogen (TMB) for 20 minutes, and the reaction is stopped by addition of an acidic solution, and absorbance of yellow product is measured spectrophotometrically at 450 nm. The absorbance is nearly proportional to mouse IL-6 concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against standard mouse IL-6 concentrations. Mouse IL-6 concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

3. Performance characteristics

- Assay Range

2.05 pg/mL ~ 500 pg/mL

- Precision of assay (Within assay variation)

2 serum samples, 5 replicates assay

n / ID	Sample1 (pg/mL)	Sample2 (pg/mL)
1	281	18.7
2	285	19.1
3	281	18.7
4	282	18.7
5	291	19.6
mean	284	19.0
SD	4.18	0.390
CV(%)	1.47	2.06

- Reproducibility (Between assay variation)

3 serum samples, 4 days, 3 replicates assay

Day /ID	Sample1 (pg/mL)	Sample2 (pg/mL)	Sample3 (pg/mL)
0	246	84.0	15.1
1	230	78.8	13.9
2	254	86.2	15.3
3	244	84.9	14.4
mean	244	83.5	14.7
SD	9.90	3.23	0.658
CV(%)	4.07	3.87	4.49

- Recovery test (Standard mouse IL-6 was added in 4 concentrations to a serum or plasma sample and assayed. The recoveries were 88.4 % - 96.9 %

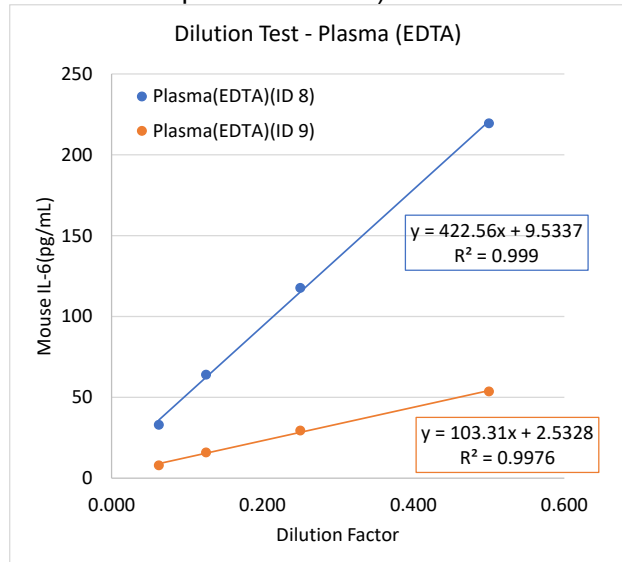
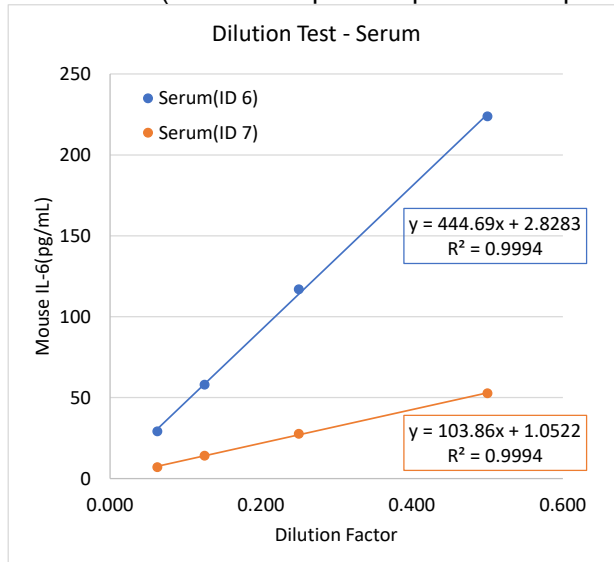
Serum sample

Added (pg/mL)	Found (pg/mL)	Recovered (pg/mL)	Recovery (%)
0	4.8	-	-
22.8	26.9	22.1	96.9
46.0	49.0	44.2	96.0
96.4	94.9	90.1	93.4
197	193	188	95.5

Plasma sample (EDTA)

Added (pg/mL)	Found (pg/mL)	Recovered (pg/mL)	Recovery (%)
0	4.4	-	-
28.1	30.6	26.2	93.0
56.0	55.0	50.5	90.2
116	107	102	88.4
227	206	202	88.8

- Dilution test (Serum sample and plasma sample underwent 3-step serial dilution.)



4. Technical tips / Precautions

- ELISA can be affected by the assay environment. Ensure that the room temperature at the places where the assay and incubation are performed is strictly controlled at 20 °C to 25 °C. Avoid performing assay under an airstream where the velocity exceeds 0.4 m/sec. and the humidity is 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 incubation step.
- To avoid denaturation of the coated antibody, do not allow the plate dry out.
- In order to avoid dryness of wells, contamination by foreign substances and evaporation of dispensed reagents, never forget to cover the well plate with the supplied plate seal, during incubation.
- 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.
- As the antibody-coated plate is a module type consisting of 8 wells × 12 strips, each strip can be separated by cutting the cover sheet with a knife and used independently.
- The chromogen (TMB) should be almost clear to pale yellow before use. It turns blue during the reaction, and gives a yellowish color after addition of the stop solution. A greenish color indicates incomplete mixing.
- Time the reaction from the pipetting of the reagent to the first well.
- Prepare a standard curve for each assay.
- For professional use only. Novices are advised to use this kit under the guidance of an experienced person. In manual operation, proficiency in pipetting technique is recommended.
- Wear protective gloves as well as protective clothing, eyewear, and face protection.
- Avoid kit reagents or specimens from coming into contact with the skin and mucous membranes. If any reagents come into contact with the eyes, skin, or mucous membranes, wash with copious amounts of water and contact a physician.
- Do not drink, eat, or smoke in the places where this kit is being used.
- The materials must not be pipetted by mouth.
- Do not combine reagents with different lot numbers.
- 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 numbers are the

same, it is preferable not to mix reagents with those that have been retained for some period.

- Handle the sample carefully, in recognition of the fact that the sample may be associated with a risk of infection. This kit contains animal-derived ingredients.
- Residual samples and used tips should be sterilized before disposal.
- Dispose of consumable materials and unused contents in accordance with applicable regional/national regulatory requirements.

5. Reagents supplied

Components	Use Status	Amount
(A) Antibody-coated Plate	Use after washing.	96 wells/1 plate
(B) Mouse IL-6 Standard	Freeze-dried. Use after reconstitution.	2 vial
(C) Buffer	Ready for use.	30 mL/1 bottle
(D) Biotin-conjugated Antibody Solution	Concentrated. Use after dilution.	100 µL/1 vial
(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Concentrated. Use after dilution.	100 µL/1 vial
(F) TMB Solution	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(G) Buffer for Standard and Sample	Ready for use.	30 mL/1 bottle
(H) Stop Solution Be careful!	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(I) Wash Solution(10×)	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle
Plate seal	-	4 sheets
Instruction Manual	-	1 sheet

【Storage and stability】

[(A) Antibody-coated Plate]

If seal is not removed, put the strip back in a plastic bag with zip lock originally used as the well-plate container and store at 2 °C - 10 °C.

[(B) Mouse IL-6 Standard (Freeze-dried)]

The reconstituted standard solution (original standard solution) should be used within 2 weeks if stored in a refrigerator. Dispose of the remaining diluted standard solutions after use.

[(C) Buffer] & [(F) TMB Solution] & [(G) Buffer for Standard and Sample]

Use only the volume required to conduct the assay. Remaining reagents should be stored at 2 °C - 10 °C in a tightly capped container. Once opened, we recommend using as soon as possible to avoid being influenced by environmental conditions.

[(D) Biotin-conjugated Antibody Solution] & [(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution]

Remaining working solution (already diluted) should be disposed of. The rest of the undiluted solution (unused) : close the cap tightly and store at 2 °C - 10 °C. Once opened, we recommend using as soon as possible to avoid being influenced by environmental conditions.

[(H) Stop Solution]

Close the cap tightly and store at 2 °C - 10 °C.

[(I) Wash Solution(10×)]

The remaining undiluted solution (unused): close the cap tightly and store at 2 °C -10 °C. Dispose of any remaining diluted buffer.

6. Equipment or supplies required but not provided in the kit Use as a check box

- Deionized water (or distilled water)
- Test tubes for preparation of standard solution series.
- Glassware for dilution of Wash Solution(10×) (a graduated cylinder, a bottle)
- Pipettes (disposable tip type). One pipette should be able to deliver 10 µL - 100 µL precisely, and another should be able to deliver 100 µL - 1000 µL.
- Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf Multipette Plus which can dispense 100 µL.
- Paper towel to remove washing buffer remaining in wells.
- A vortex-type mixer.
- A shaker for 96 well-plate (500 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.

7. Preparation of samples

- This kit is intended to measure IL-6 in mouse serum or plasma.
- Use EDTA as anticoagulant.
- Samples should be immediately assayed or stored below $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ until assay. Before starting the assay, thoroughly shake thawed samples. Do not repeat freeze-and-thaw cycles.
- Please check in advance when using serum separation promoters, etc.
- Do not use hemolyzed samples or high-lipid samples.
- Centrifuge the sample to remove turbidity or insoluble matter where necessary before use in the assay.
- 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 (G) Buffer for standard and sample prior to adding them to wells.

8. Preparation of reagents

- ◆ Bring all reagents of the kit to room temperature ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) before use.
- ◆ Prepare reagent solutions in an appropriate volume for your assay. Do not store the diluted reagents.

[Concentrated reagents]

(B) Mouse IL-6 Standard (Freeze-dried)

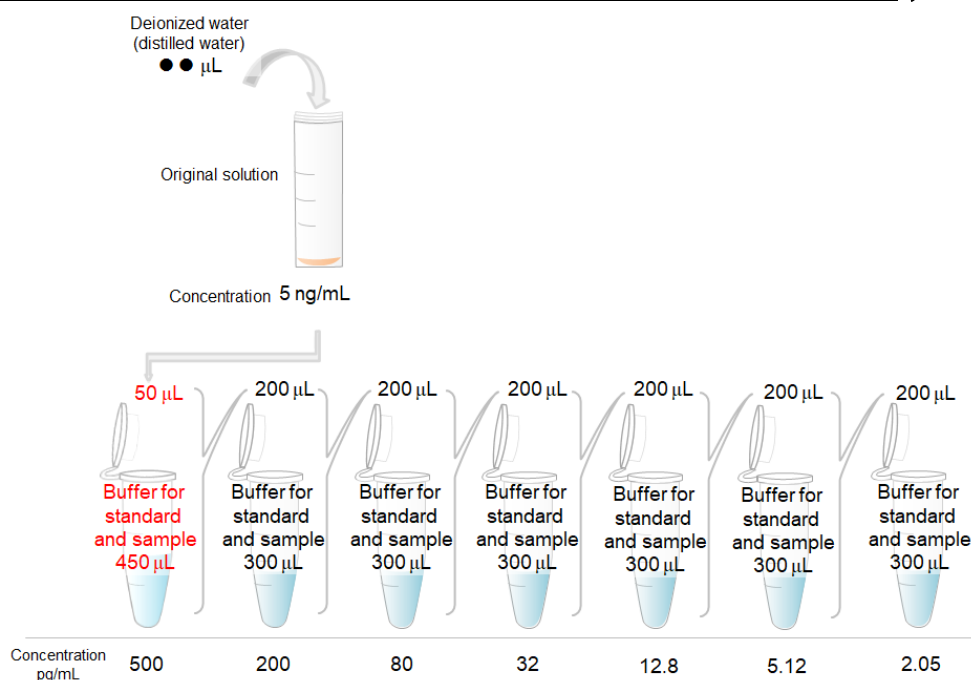
Reconstitute the (B) Mouse IL-6 Standard with volume* of deionized water (or distilled water) described in a separate sheet and allow to stand for 30 minutes to prepare the original standard solution (5000 pg/mL). Be sure to allow the solution to stand for 30 minutes, as accurate values may not be obtained. Then prepare dilution series of standard solutions as shown below using the (G) Buffer for Standard and Sample brought to room temperature.

*Because the volume of deionized water (or distilled water) to be added to the freeze-dried standard differs depending on the lot, see the specified volume in a separate sheet.

Below is an example of preparing each standard solution.

Volume of standard solution	(G) Buffer for Standard and Sample	Concentration
Original standard solution 50 μL	450 μL	500 pg/mL
500 pg/mL solution 200 μL	300 μL	200 pg/mL
200 pg/mL solution 200 μL	300 μL	80 pg/mL
80 pg/mL solution 200 μL	300 μL	32 pg/mL
32 pg/mL solution 200 μL	300 μL	12.8 pg/mL
12.8 pg/mL solution 200 μL	300 μL	5.12 pg/mL
5.12 pg/mL solution 200 μL	300 μL	2.05 pg/mL
Blank	350 μL	0

} Standard Curve



[(D) Biotin-conjugated Antibody Solution]

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) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution]

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 Solution(10×)]

Dilute 1 volume of the (I) Wash Solution(10×) to **10% solution by volume** with deionized water (or distilled water) to prepare the washing solution. Example: 100 mL of the (I) Wash Solution(10×) and 900 mL of deionized water (or distilled water).

Caution: Be sure to use the (I) Wash Solution(10×) included in this kit. Do not use the (I) Wash Solution(10×) included in another kit.

9. Assay procedure

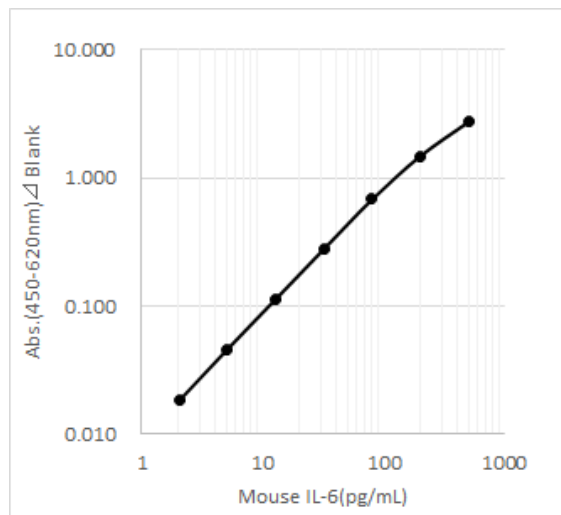
Remove the cover sheet of the (A) Antibody-coated Plate after bringing up to room temperature.

- (1) Wash the (A) Antibody-coated Plate by filling the wells with washing solution and discard 4 times (*①), then tap the plate upside-down onto several sheets of folded paper towels to remove residual washing solution in the wells (*⑤).
- (2) Pipette **50 µL** of standard solution to the wells designated for standards.
- (3) Pipette **25 µL** of (G) Buffer for Standard and Sample to the sample wells, and then add **25 µL** of sample to the wells.
- (4) Shake the plate gently on a plate shaker (*②).
- (5) Affix a plate seal (*③) on the plate and incubate for 2 hours at 20 °C - 25 °C.
- (6) Discard the reaction mixture and rinse the wells as described in step (1).
- (7) Pipette **50 µL** of biotin-conjugated antibody solution to all wells, and shake as described in step (4).
- (8) Affix a plate seal (*③) on the plate and incubate the plate for 1 hour at 20 °C - 25 °C.
- (9) Discard the reaction mixture and rinse wells as described in step (1).
- (10) Pipette **50 µL** of peroxidase-conjugated streptavidin solution to all wells, and shake as described in step (4).
- (11) Affix a plate seal (*③) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at 20 °C - 25 °C.
- (12) Discard the reaction mixture and rinse wells as described in step (1).
- (13) Pipette **50 µL** of (F) TMB Solution to wells, and shake as described in step (4).
- (14) Affix a plate seal (*③) on the plate and incubate the plate for 20 minutes at 20 °C - 25 °C.
- (15) Add **50 µL** of the (H) Stop Solution to all wells and shake as described in step (4).
- (16) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620 nm (*④)) immediately using a plate reader.

*Refer to 13. Summary assay of procedure for notes on *①, *②, *③, *④, and *⑤.

10. Calculations

- (1) Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a 3rd order regression curve, or 4 or 5 parameters. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the mouse IL-6 concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data.
- (2) Using the standard curve, read the mouse IL-6 concentration of samples at its absorbance, and multiply the assay value by the dilution factor if the sample has been diluted. The standard operation method is 5-fold dilution.



11. Calibration

The measured value obtained by this kit can be converted to the unit concentration based on NIBSC/WHO standard mouse IL-6 (Code: 93/730) by multiplying with the conversion factor specified in a separate sheet according to the following calculation formula.

NIBSC/WHO (93/730) unit concentration (U/mL) = conversion factor (*1) × measured mouse IL-6 value (pg/mL) (*2)

(*1) The exchange rate is different depending on the lot. Please see the specified conversion factor in the annex document.

(*2) Use the assay value that is multiplied by the dilution rate.

12. Troubleshooting

● Low absorbance in all wells

Possible explanations:

- 1) The standard or samples might not have been added.
- 2) Reagents necessary for coloration such as biotinylated anti-Mouse IL-6 antibody, HRP-conjugated streptavidin, or chromogen (TMB) might not have been added.
- 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of biotinylated anti-Mouse IL-6 antibody or HRP-conjugated streptavidin.
- 4) Contamination of enzyme inhibitor(s).
- 5) Influence of the temperature under which the kits had been stored.
- 6) Excessively 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 (2.05 pg/mL).

Possible explanations:

Improper or inadequate washing. (Change washing frequency from 4 times to 5 - 8 times 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 additional testing?

A-1: Yes, cut off the clear seal on the plate with a cutter along the strip. Move the residual plate, which still has the seal on it, promptly to a refrigerator.

● Q-2: I found that the 96 well-plate was empty when I opened the box.

A-2: As this kit is the dried type, no preservation stabilizer is added.

● Q-3: When I thawed the sample, there was some undissolved matter. Will this affect the measurement?

A-3: There may be an impact. The measured value may be low or below the lower measurement limit.

● Q-4: Can it be measured using plasma?

A-4: It can also be measured in plasma. Use EDTA as an anticoagulant when collecting plasma.

13. Summary of assay procedure : Use as a check box

*First, read this instruction manual carefully and start your assay after confirming the details.

- Return the (A) Antibody-coated Plate and all reagents back to room temperature (**20 °C - 25 °C**). This takes about **2 hours**.
- (I) Wash Solution(10×) must be diluted **10-fold** by deionized water (or distilled water) at room temperature (20 °C - 25 °C).
- Standard solution dilution example
Reconstitute the (B) Mouse IL-6 Standard with volume* of deionized water (or distilled water) described in a separate sheet and allow to stand for 30 minutes to prepare the original standard solution (5000 pg/mL). Be sure to allow the solution for 30 minutes, as accurate values may not be obtained. Then prepare a dilution series of standard solutions as shown below using the (G) Buffer for Standard and Sample brought to room temperature.

*Because the volume of deionized water (or distilled water) to be added to the freeze-dried standard differs depending on the lot, see the specified volume in a separate sheet.

Preparation of diluted Mouse IL-6 standard solutions:

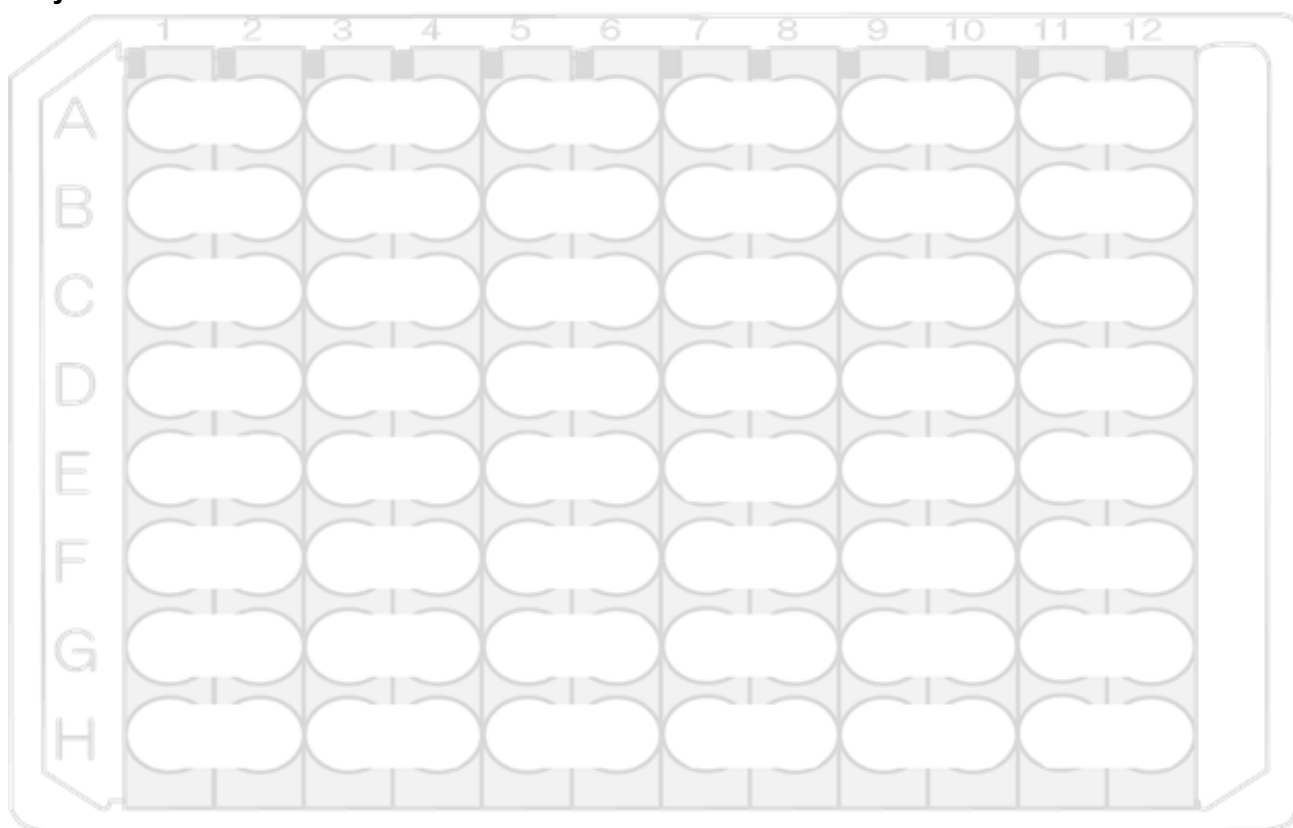
Conc.(pg/mL)	500	200	80	32	12.8	5.12	2.05	0
Std. sol.(μL)	50	200*	200*	200*	200*	200*	200	—
Buffer for Standard and Sample (μL)	450	300	300	300	300	300	300	350

*One rank higher standard.

□ (A) Antibody-coated Plate	
□ ↓Washing 4 times (*①), (*⑤)	
□ Samples (diluted sample : (G) Buffer for Standard and Sample 25 μL + Sample 25 μL), or Standards	50 μL
□ ↓Shaking (*②), Incubation for 2 hours at 20 °C - 25 °C. (Standing (*③))	
□ Dilute (D) Biotin-conjugated Antibody Solution 100-fold with the (C) Buffer at room temperature (20 °C - 25 °C). (This should be prepared during incubation.)	
□ ↓Washing 4 times (*①), (*⑤)	
□ Biotin-conjugated antibody solution (Diluted)	50 μL
□ ↓Shaking (*②), Incubation for 1 hour at 20 °C - 25 °C. (Standing (*③))	
□ Dilute (E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution 100-fold with the (C) Buffer at room temperature (20 °C - 25 °C). (This should be prepared during incubation.)	
□ ↓Washing 4 times(*①), (*⑤)	
□ Peroxidase-conjugated streptavidin solution (Diluted)	50 μL
□ ↓Shaking (*②), Incubation for 30 minutes at 20 °C - 25 °C. (Standing (*③))	
□ ↓Washing 4 times(*①), (*⑤)	
□ (F) TMB Solution	50 μL
□ After dispensing, the color turns to blue depending on the concentration.	
□ ↓Shaking (*②), Incubation for 20 minutes at 20 °C - 25 °C. (Standing (*③))	
□ (H) Stop Solution	50 μL
□ After dispensing, the color turns to yellow depending on the concentration.	
□ ↓Shaking (*②) Immediately shake.	
□ Measurement of absorbance (450 nm, Ref 620 nm (*④)) immediately.	
□ Ref. wave cancels the dirt in the back of plate.	

- *① After dispensing wash buffer into the wells, lightly shake the plate on your palm for 10 sec and remove the buffer. Guideline for washing volume: 300 μ L/well for an automatic washer and for a pipette if the washing buffer is added by pipette. Where washing is conducted using an 8 channel pipette, sometimes the background tends to be high. If so, change washing frequency from 4 times to 5 - 8 times after the reaction with peroxidase-conjugated streptavidin.
Standard of plate-washing pressure: 5 mL/min - 25 mL/min. (Adjust it depending on the nozzle's diameter.)
- *② Guideline for shaking: 600 rpm - 1,200 rpm for 10 seconds \times 3 times.
- *③ Seal the plate during the reaction after shaking. Peel off the protective paper from the seal and affix the seal on the plate. Do not reuse a plate seal that has already been used once.
- *④ 600 nm - 650 nm can be used as reference wavelength.
- *⑤ After removal of wash buffer, immediately dispense the next reagent.

Assay worksheet



14.Storage and expiration

When the complete kit is stored at 2 °C – 10 °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 less than optimal assay performance caused by storage environment.

LBIS™ Mouse IL-6 ELISA Kit

[Storage condition] Store the kit at 2 °C - 10 °C (Do not freeze)

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

[Cat #] 299-96001

レビス™ Mouse IL-6 ELISA Kit

1. イントロダクション

マウス IL-6 は 187 アミノ酸の分泌性の糖タンパク質で、B 細胞を抗体産生細胞に分化させるサイトカインとして見出されましたが、免疫応答、炎症反応をはじめ、造血、神経系細胞の増殖・分化など多彩な生理作用において重要な役割を果たしていることが知られています。T 細胞、単球、線維芽細胞、血管内皮細胞、ケラチノサイトなどにより産生された後、IL-6Ra と gp130 の 2 本鎖からなる IL-6 受容体と結合し、シグナルが伝達されます。IL-6 は関節リウマチの病態の活動性と相関するという報告もあり、関節リウマチなど自己免疫疾患、炎症疾患の分野でも注目されています。

本キットはマウス IL-6 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試薬で、マウス血清（血漿）、培養上清中の IL-6 を特異的かつ高感度に測定することができます。本キットは研究目的にのみご使用ください。

◆ 製品の特長

- マウス血清（血漿）、培養上清中の IL-6 を特異的かつ高感度に測定できます。
- 全反応時間は 3 時間 50 分です。
- 標準品は大腸菌リコンビナントで、カルタヘナ法非該当です。

2. 測定原理

本キットは標準品、検体を抗体固相化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、ビオチン結合抗体溶液を加え 1 時間インキュベートします。再度の洗浄後、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を加え、30 分インキュベートします。洗浄後、ウェルに残ったペルオキシダーゼを TMB 溶液と 20 分間反応させます。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。吸光度はマウス IL-6 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することで検量線が作られ、この検量線を使って未知検体中の濃度が決定されます。

3. キットの性能

● 測定範囲

2.05 pg/mL ~ 500 pg/mL

● 精度試験（アッセイ内変動）

正常血清に異なる濃度のマウス IL-6 を添加した 2 検体を 5 重測定

n / ID	Sample1 (pg/mL)	Sample2 (pg/mL)
1	281	18.7
2	285	19.1
3	281	18.7
4	282	18.7
5	291	19.6
mean	284	19.0
SD	4.18	0.390
CV(%)	1.47	2.06

● 再現性試験（アッセイ間変動）

正常血清に異なる濃度のマウス IL-6 を添加した 3 検体を 4 日間 3 重測定

Day / ID	Sample1 (pg/mL)	Sample2 (pg/mL)	Sample3 (pg/mL)
0 日目	246	84.0	15.1
1 日目	230	78.8	13.9
2 日目	254	86.2	15.3
3 日目	244	84.9	14.4
mean	244	83.5	14.7
SD	9.90	3.23	0.658
CV(%)	4.07	3.87	4.49

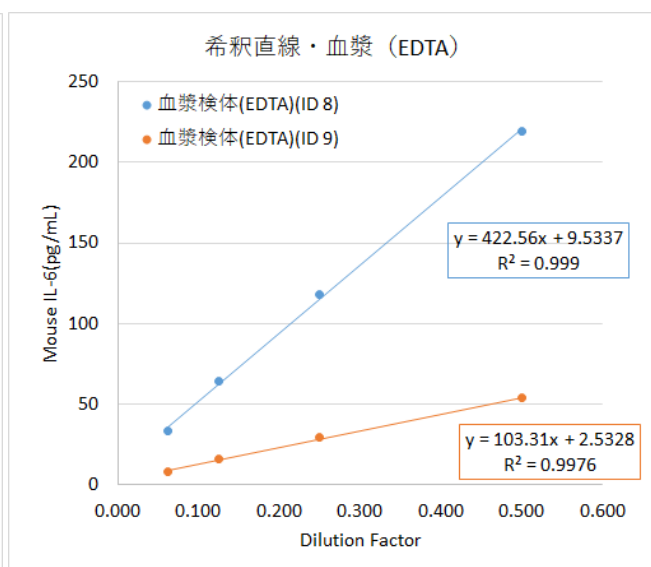
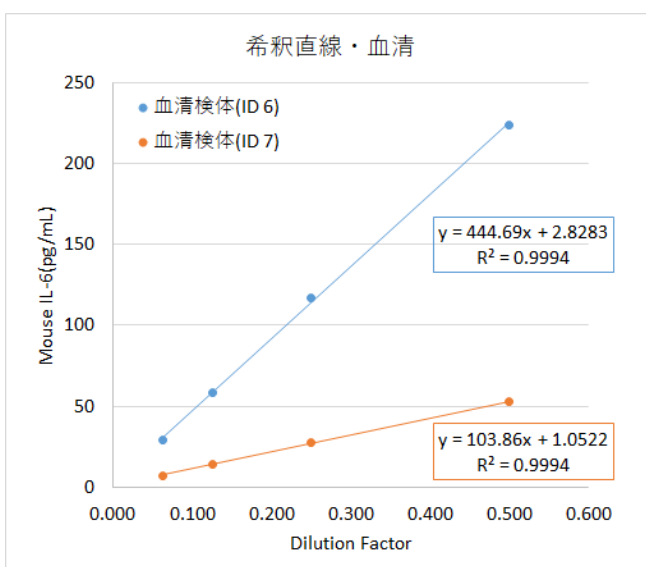
- 添加回収試験（正常血清または血漿検体に異なる4濃度のマウスIL-6を添加し測定）回収率は88.4% - 96.9%

血清検体			
添加量 (pg/mL)	実測値 (pg/mL)	回収量 (pg/mL)	回収率 (%)
0	4.8	—	—
22.8	26.9	22.1	96.9
46.0	49.0	44.2	96.0
96.4	94.9	90.1	93.4
197	193	188	95.5

血漿検体(EDTA)			
添加量 (pg/mL)	実測値 (pg/mL)	回収量 (pg/mL)	回収率 (%)
0	4.4	—	—
28.1	30.6	26.2	93.0
56.0	55.0	50.5	90.2
116	107	102	88.4
227	206	202	88.8

- 希釈直線性

（正常血清または血漿に異なる濃度のマウスIL-6を添加した2検体を、連続的に”標準品・検体用緩衝液”で3段階希釈し測定）



4.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。静置反応場所については、弊社 Web サイトの動画「反応条件」でご確認ください。
- 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。
- 反応停止液には硫酸を使用しています。取り扱いに注意してください。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、定法に従い滅菌処理してください。処理した検体や消耗品、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。

5. 構成品

構成品	状態	容量
(A) Antibody-coated Plate 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96 wells(8×12)/1枚
(B) Mouse IL-6 Standard マウス IL-6 標準品	凍結乾燥品・溶解後使用	2本
(C) Buffer 緩衝液	そのまま使用	30 mL/1本
(D) Biotin-conjugated Antibody Solution ビオチン結合抗体溶液	希釈後使用	100 µL/1本
(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液	希釈後使用	100 µL/1本
(F) TMB Solution TMB 溶液	そのまま使用	12 mL/1本
(G) Buffer for standard and sample 標準品・検体用緩衝液	そのまま使用	30 mL/1本
(H) Stop Solution 反応停止液	Be careful! 取扱注意	そのまま使用
(I) Wash Solution(10×) 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

【各試薬の安定性と保存方法】

(A) Antibody-coated Plate

未使用抗体固相化ストリップはジップシールパックに戻し、そのまま 2℃～10℃で保存してください。

(B) Mouse IL-6 Standard

凍結乾燥状態で有効期限内安定性を保ちます。精製水を加え溶液化した標準品原液は 2℃～10℃で保存し、2週間以内に使用してください。緩衝液で希釈調製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 及び (F) TMB Solution 及び (G) Buffer for Standard and Sample

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℃～10℃で保存してください。

(D) Biotin-conjugated Antibody Solution 及び (E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

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℃～10℃で保存してください。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℃～10℃で保存してください。

(I) Wash Solution(10×)

Wash Solution(10×) を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存してください。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄してください。

6. キット以外に測定に必要な器具 チェックリスト

精製水 (蒸留水) 試験管 洗浄液希釈用器具 チップ交換型ピペット (10 µL～100 µL 及び 100～1000 µL を正確に採取できるもの) 連続分注ピペット ペーパータオル等 (洗浄時に使用) 攪拌器 (Vortex タイプ) プレート振とう器 (約 500 rpm～1200 rpm) プレート用洗浄機 (あれば好ましい) または噴射ビン プレートリーダー(450 ± 10 nm / 600 nm～650 nm) データ計算用ソフトウェア

7. 検体の調製

- 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。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。また、検体を希釈する場合は用時調製としてください。
- 検体は定法に従い採血、分離したマウス血清及び血漿を使用してください。
- 血漿採血時の抗凝固剤には EDTA を使用してください。
- 血清分離促進剤等を使用する際は事前確認をしてください。

- 溶血した検体や高脂質検体は使わないでください。
- 濁り及び不溶物のある検体は遠心分離等で除去後測定に用いてください。
- 妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、異なる 2 ポイント以上の希釈率で希釈直線性を確認してください。
- 検体を希釈する場合は、あらかじめ試験管(PP、PE)等を用いて (G) 標準品・検体用緩衝液で希釈し測定ウェルに分注してください。

8. 試薬の調製

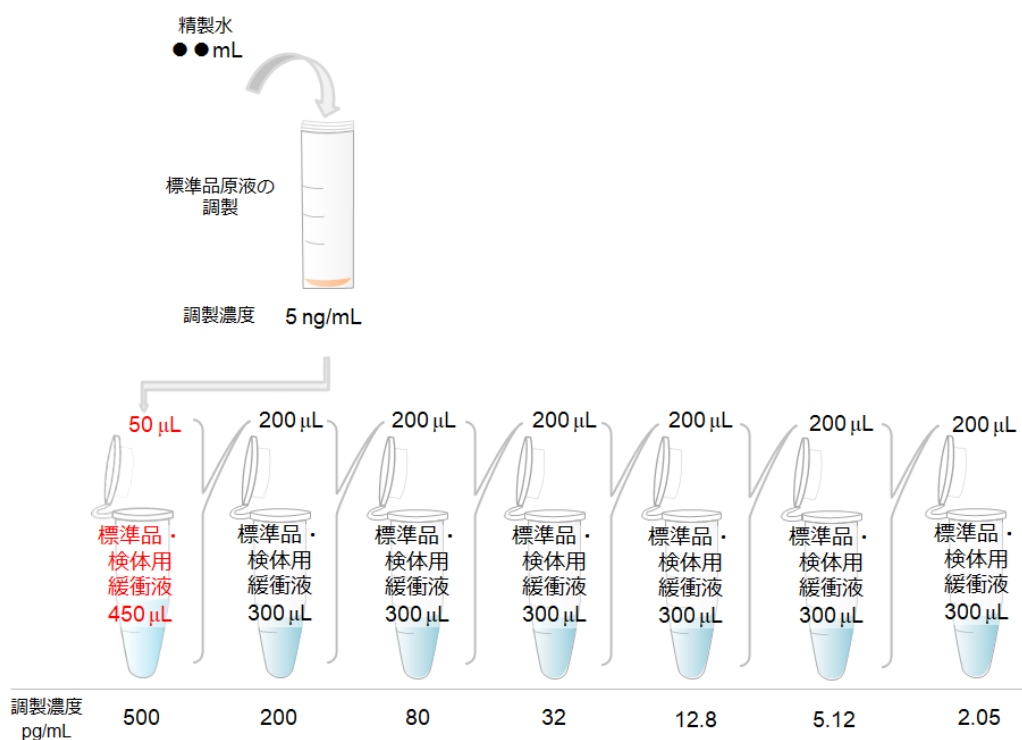
- * キットの試薬は使用前に必ず室温 (20 °C ~ 25 °C) に戻してください (2 時間位が目安です)。
- * 5. で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「溶解後使用」、「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で調製してください。
- * 測定に必要な分だけ試薬を調製してください。

【濃縮された試薬類の希釈】

(B) Mouse IL-6 Standard ; 検量線作成用

(B) Mouse IL-6 Standard に精製水を別紙に記載の指定量 * を加え混合後、30 分静置して溶解し、標準品原液 (5000 pg/mL) を調製してください。正確な値が得られないことがあるため、必ず 30 分静置してください。その後室温化されたキット添付 (G) Buffer for Standard and Sample で調製してください。加える精製水の量は別紙をご参照ください。* ロットにより精製水を添加する量が異なるため、別紙に記載の指定量をご確認ください。下記は一例です。

標準溶液の容量	(G) Buffer for Standard and Sample	濃度 (pg/mL)
標準品原液 : 50 μ L	450 μ L	500
500 pg/mL 溶液 : 200 μ L	300 μ L	200
200 pg/mL 溶液 : 200 μ L	300 μ L	80
80 pg/mL 溶液 : 200 μ L	300 μ L	32
32 pg/mL 溶液 : 200 μ L	300 μ L	12.8
12.8 pg/mL 溶液 : 200 μ L	300 μ L	5.12
5.12 pg/mL 溶液 : 200 μ L	300 μ L	2.05
Blank	350 μ L	0



(D) Biotin-conjugated Antibody Solution

(C) Buffer で 100 倍に希釈してください。

(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

(C) Buffer で **100 倍**に希釈してください。

(I) Wash Solution(10×)

洗浄液(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 の洗浄液(10×)+900 mL の精製水（蒸留水）（96 ウェル全てを使用する場合）

注意：他のレビスシリーズのキットの洗浄液(10×)は使用せず、必ず本キットの洗浄液(10×)を使用してください。

9.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。

- (1) あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし、4 回洗浄（*①）します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
- (2) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を **50 μL** ずつ分注します。
- (3) 検体測定ウェルに (G) 標準品・検体用緩衝液を **25 μL** ずつ分注し、さらに検体を **25 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(*③)、室温（20℃～25℃）で2時間静置します。
- (6) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし、4 回洗浄（*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) 各ウェルに調製したビオチン結合抗体溶液を **50 μL** ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌（*②）します。
- (8) プレートシールを貼り(*③)、室温（20℃～25℃）で1時間静置します。
- (9) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし4 回洗浄（*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)各ウェルに調製したペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を **50 μL** ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌（*②）します。
- (11)プレートシールを貼り(*③)、室温（20℃～25℃）で30分間静置します。
- (12)反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし4 回洗浄（*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(*③)、室温（20℃～25℃）で20分間静置します。
- (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。

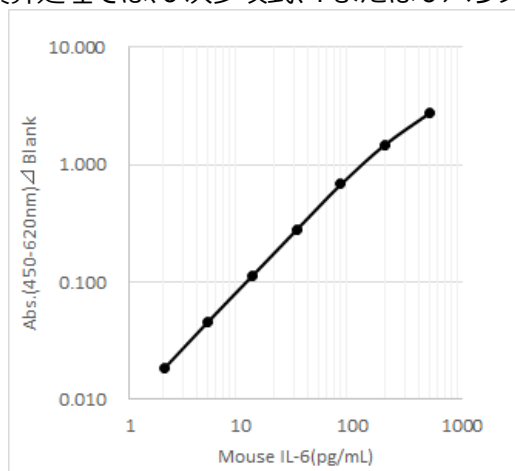
(*①)、(*②)、(*③) 13.【測定手順概要とチェックリスト】をご参照ください。

10.計算

- (1) 測定毎に検量線を作成します。X軸を標準溶液濃度 (pg/mL)、Y軸を吸光度の検量線グラフを作成してください。
- (2) 検量線より、(希釈) 検体の吸光度に対応する濃度 (pg/mL) を読み取ります。読み取った濃度に検体希釈率を乗じ測定値とします。(標準操作法では2倍希釈になります。)

* 検体の吸光度が検量線吸光度より外れた場合は (G) 標準品・検体用緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施してください。

* コンピュータソフトでの演算処理では、3次多項式、4または5パラメーターの使用をお勧め致します。



11. キャリブレーション

本キットによって得られた測定値は、下記計算式に従ってキット添付の別紙に定められた換算係数を乗じることによって NIBSC/WHO 標準品 IL-6 (Code: 93/730) を基準にしたユニット濃度に換算することができます。

$$\text{NIBSC/WHO}(93/730)\text{ユニット濃度(U/mL)} = \text{換算係数} \times \text{本キット測定値(pg/mL)}$$

*換算係数は製品ロットごとに変動する場合がありますので、製品ロットごとに定められた換算係数を確認してから計算してください。

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) 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。
- 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、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。使用しないプレートはジップシールパックに戻し、冷蔵庫に保管してください。
- Q-2: プレートを取出したらウェルの中に保存液が入っていませんでしたが問題ありませんか？
 A-2: 問題ありません。このキットは乾燥プレートタイプとなっております。
- Q-3: 検体を融かしたらモヤモヤした不溶解物がありましたが測定に影響がありますか？
 A-3: 影響が出る可能性があります。測定値が低く出たり、測定下限以下になる場合があります。
- Q-4: 血漿でも測定できますか？
 A-4: 血漿でも測定できます。血漿採血時の抗凝固剤には、EDTA を使用してください。

13. 【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。

- プレート、試薬類を十分に室温(20℃～25℃)に戻してください。室温化には2時間位必要です。
- 洗浄液(10x)の希釈 : 室温化された精製水で、**10倍**に希釈してください。
- 標準溶液の希釈 (例) :
 (B)マウス IL-6 標準品に精製水を別紙に記載の指定量*を加え混合後、30分静置して溶解し、標準品原液(5000 pg/mL)を調製してください。正確な値が得られないことがあるため、必ず30分静置してください。その後室温化されたキット添付 (G) 標準品・検体用緩衝液で調製してください。加える精製水の量は別紙をご参照ください。*ロットにより精製水を添加する量が異なるため、別紙に記載の指定量をご確認ください。下記は一例です。

濃度 (pg/mL)	500	200	80	32	12.8	5.12	2.05	0
標準溶液 (μL)	50	200*	200*	200*	200*	200*	200	—
標準品・検体用緩衝液 (μL)	450	300	300	300	300	300	300	350

* : ひとつ高濃度の標準溶液

各操作注意事項

<input type="checkbox"/>	抗体固相化プレート		
<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"/>	検体 (希釈検体 : 標準品・検体用緩衝液 25 μL+検体 25 μL) または標準溶液	50 μL	* ④
<input type="checkbox"/>	↓攪拌、室温(20 °C~25 °C)、2 時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/>	(D) ビオチン結合抗体溶液の希釈。室温化した(C) 緩衝液で 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"/>	ビオチン結合抗体溶液	50 μL	* ④
<input type="checkbox"/>	↓攪拌、室温(20 °C~25 °C)、1 時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/>	(E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液の希釈。室温化した (C) 緩衝液で 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"/>	ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液	50 μL	* ④
<input type="checkbox"/>	↓攪拌、室温(20 °C~25 °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"/>	TMB 溶液 TMB が室温化されていることを確認 分注後、濃度により青色に呈色	50 μL	* ④
<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 強酸性につき取扱注意 分注後、濃度により黄褐色に変色	50 μL	* ④
<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) 洗浄毎に洗浄液をウェルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。4 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後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、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5~6 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り静置してください。

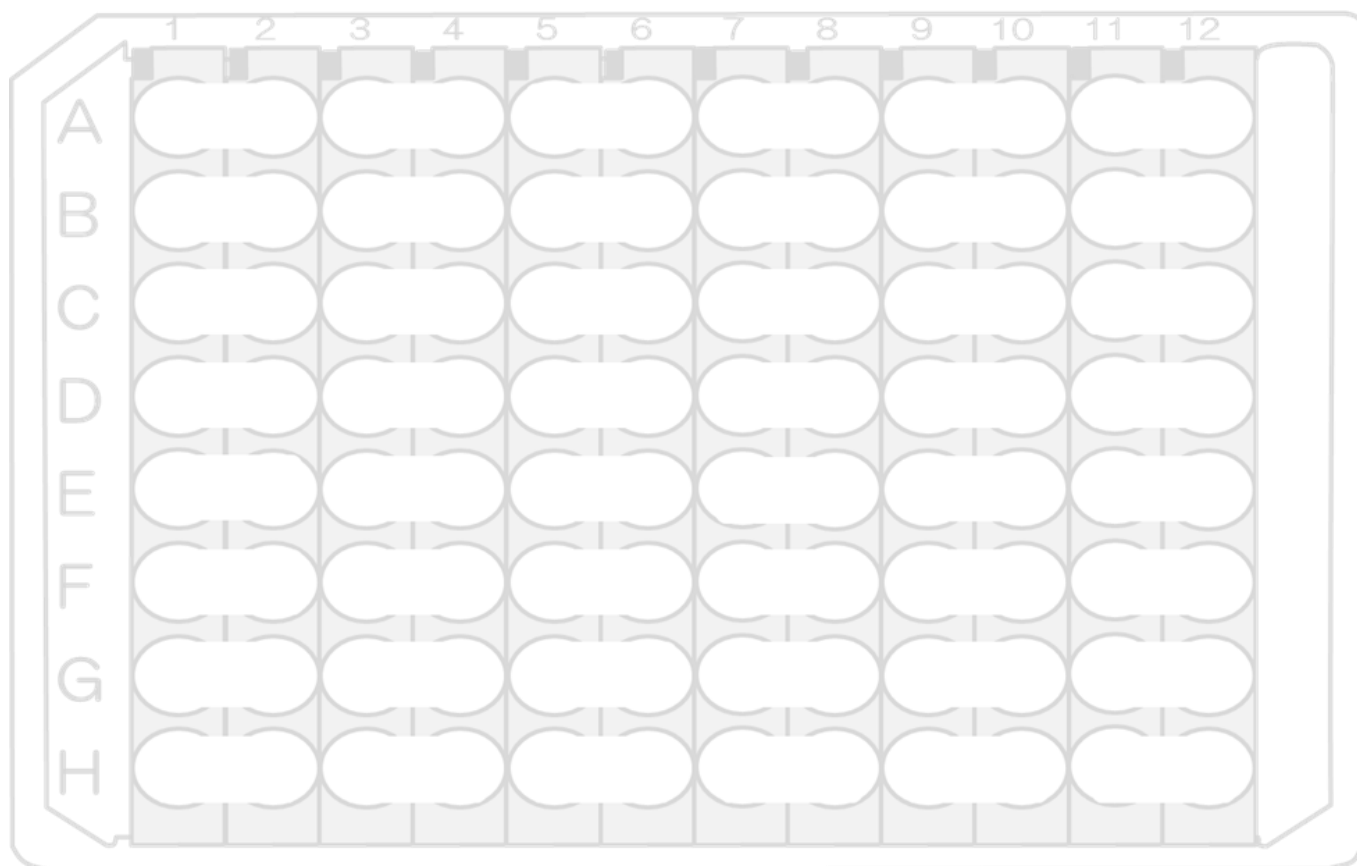
プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けてください。一度使用したプレートシールは再使用しないでください。

(* ④) ピペッティングに関する注意事項は「ピペッティング」の動画をご参照ください。

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	Std.500 pg/mL	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	Std.200 pg/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	Std.80.0 pg/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	Std.32.0 pg/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	Std.12.8 pg/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	Std.5.12 pg/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	Std.2.05 pg/mL	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
H	0	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40

ワークシート



14.キットの保存と使用期限

キットは2℃～10℃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。

【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™ Mouse IL-6 ELISA Kit

【和光コード】 299-96001

【英語表記】 LBIS™ Mouse IL-6 ELISA Kit