

## レビス™ サル KLH-IgG ELISA キット (TDAR)

### 1. イントロダクション

医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン ICH S8 では、免疫毒性の標的が特定されていない場合には T 細胞依存性抗体産生試験 (TDAR, T cell Dependent Antibody Reaction) が推奨されています。

TDAR は T 細胞依存性抗原とされている、たとえば KLH (Keyhole limpet hemocyanin) を投与して一次抗原刺激による IgM 性抗体の産生、更に二次抗原刺激後のクラス・スイッチによる IgG 性抗体の産生を観察します。本キットはサル血液中の IgG 性の抗 KLH 濃度を簡単に測定できるもので、上記の目的には最適です。レビス™ サル KLH-IgG ELISA キット (TDAR) と併せてご使用下さい。

本キットはサル抗 KLH (Keyhole limpet hemocyanin)-IgG 抗体価を定量的に測定するための酵素免疫測定法です。本キットは研究のみにご使用下さい。

#### ◆製品の特長

- ・全反応時間は 2 時間 20 分です。
- ・サル血清または血漿中のサル抗 KLH-IgG 抗体価を測定します。
- ・微量な検体で測定可能です。
- ・1 キットは 96 ウェルです。
- ・標準品はサル由来のものです。
- ・全ての試薬は溶液タイプです。

### 2. 測定原理

本キットは KLH と標準品 (サル抗 KLH-IgG 抗体) または検体 (サル抗 KLH-IgG 抗体) が結合したサル抗 KLH-IgG 抗体を重量表示しています。

具体的には、本キットは標準品または希釈検体を KLH 固相化マイクロプレートウェル中で 1 時間インキュベートし、洗浄後、ペルオキシダーゼ結合抗サル IgG 抗体を加え、捕捉されたサル抗 KLH-IgG 抗体とともに 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 HRP を TMB 溶液と反応させます。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 450nm (副波長 620nm) で比色測定されます。吸光度はサル抗 KLH-IgG 抗体価にほぼ比例します。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. キットの性能

- ・測定範囲  
サル抗 KLH-IgG 抗体価を 1.56ng/mL ~ 100ng/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ペルオキシダーゼ結合抗体はサル IgG に対して特異的です。  
サル IgM との交差性は ELISA レベルでバックグラウンド以下です。
- ・精度試験 (アッセイ内変動) (8 重測定、5 検体) 平均 C. V. 値は 10% 未満
- ・再現性試験 (アッセイ間変動) (3 重測定、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 濃度のサル抗 KLH-IgG 抗体を添加し測定した結果、回収率は 96.3% から 104% でした。
- ・希釈直線性  
3 血清検体を連続的に希釈用緩衝液で 2 段階希釈し測定した結果、直線回帰の  $R^2$  は 0.9996 ~ 1 でした。

### 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) を厳守して下さい。また、風速 (エアコンの風も含む): 0.4m/sec 以上、湿度 30% 未満の環境下での測定は避けて下さい。やむを得ず、測定操作を風速: 0.4m/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下さい。  
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下さい。
- ・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下さい。
- ・検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけて下さい。1 ウェル / 1 チップのご使用をお勧めします。
- ・TMB 溶液は 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下さい。
- ・反応停止液は使用するまでは無色です。

- ・本キットは ELISA 法の研修を修了した方、または指導者の方でご使用下さい。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下さい。
- ・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下さい。
- ・試薬類を皮膚に付けないで下さい。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充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下さい。
- ・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下さい。
- ・試薬類は口でピペッティングしないで下さい。
- ・ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。
- ・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下さい。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 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。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下さい。
- ・本キットは動物由来の成分を含んでいます、標準品（抗体）は次より採取しました。  
カニクイザル、♂、5 頭。B ウイルス、SIV、虫卵、ランブル鞭毛虫、ミクロフィラリア、赤痢アメーバ、サルモネラ菌の検査項目は 5 頭全てが陰性を示しました。

## 5. 構成品

構 成 品	状態	容量
(A) 抗原固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12) / 1 枚
(B) 抗 KLH サル IgG 標準品	希釈後使用	200 $\mu$ L / 1 本
(C) 緩衝液	そのまま使用	100mL / 1 本
(D) ペルオキシダーゼ結合抗体溶液	希釈後使用	100 $\mu$ L / 1 本
(F) TMB 溶液	そのまま使用	12mL / 1 本
(H) 反応停止液	そのまま使用	12mL / 1 本
(I) 洗浄液 (10×)	希釈後使用	100mL / 1 本
(J) プレートシール	—	3 枚

### 【試薬の安定性と保存方法】

#### (A) 抗原固相化プレート

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）KLH 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℃～10℃で保存して下さい。

#### (B) 抗 KLH サル IgG 標準品 (500ng/mL)

本キットを分割して使用する際は使用する直前に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

#### (C) 緩衝液及び (F) TMB 溶液

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℃で保存して下さい。

#### (D) ペルオキシダーゼ結合抗体溶液

本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℃で保存して下さい。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

#### (H) 反応停止液

使用残りを保存する場合は蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。

#### (I) 洗浄液 (10×)

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

## 6. 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 10  $\mu$ L ～ 20  $\mu$ L を正確にピペッティングできるもの、及び 50  $\mu$ L ～ 500  $\mu$ 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  $\mu$ 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 600rpm ～ 1200rpm）
- ☐ 96 ウェルプレート用洗浄機（あれば好ましい）または噴射ビン

- ☐ 96 ウェルプレートリーダー（450nm ± 10nm、620nm：600nm～650nm）  
☐ データ計算用ソフトウェア

7. 検体の調製

本キットはサル血清または血漿中のサル抗 KLH-IgG 抗体価を測定します。

- ・ 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下さい。凍結した検体は測定する直前に解凍し十分に攪拌して下さい。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。正しい結果が得られない原因になります。
- ・ 溶血した検体や高脂質検体は異常値の発生原因となりますので避けて下さい。  
※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溶血・脂質（乳び）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下さい。本キットの場合、溶血は 440mg/dL 以上、乳びが 2240 ホルマジン濁度より高い場合影響が現れます。
- ・ 採血の際にヒト用の採血管をご使用になるのは避けて下さい。血清分離剤や凝固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。
- ・ 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下さい。
- ・ 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下さい。
- ・ 非特異反応を回避するため、**検体は必ず 100 倍以上に希釈して下さい**。抗体価により異なりますが検体希釈目安は 100 ～ 10000 倍です。標準曲線内に入るよう希釈調製して下さい。検体の希釈倍率は、免疫・採血条件により異なります。検体を希釈する場合はあらかじめ試験管等を用いて緩衝液で希釈し測定ウェルに分注して下さい。

検体希釈の一例	プレ希釈（10 倍）	100倍	1000倍	10000倍
検体(μL)	50	50*	50*	50*
緩衝液(μL)	450	450	450	450

註）\*ひとつ低倍率の希釈検体

【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℃～10℃で保存して下さい。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下さい。

8. 試薬の調製

- \* 本キットの試薬は使用前に必ず室温（20℃～25℃）に戻して下さい（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下さい。
- \* 測定に必要な分だけ試薬を調製して下さい（ご不明な際にはお問い合わせ下さい）。

【濃縮された試薬類】

(B) 抗 KLH サル IgG 標準品（500ng/mL）：標準曲線作成用

（B）抗 KLH サル IgG 標準品（500ng/mL）（原液）と（C）緩衝液を使って標準溶液を調製して下さい。下記は一例です。

標準品の容量	緩衝液	濃度（ng/mL）
標準品原液 100 μL	400 μL	100
100ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	50.0
50.0ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	25.0
25.0ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	12.5
12.5ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	6.25
6.25ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	3.13
3.13ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	1.56
0（Blank）	200 μL	0

重量表示法：定量法

(D) ペルオキシダーゼ結合抗体溶液

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）緩衝液で **100 倍**に希釈して下さい。

(I) 洗浄液（10×）

洗浄液（10×）を室温化された精製水（蒸留水）で **10 倍**に希釈して下さい。

例：100mL の洗浄液（10×）+ 900mL の精製水（蒸留水）（96 ウェル全てを使用する場合）

9. 測定操作法

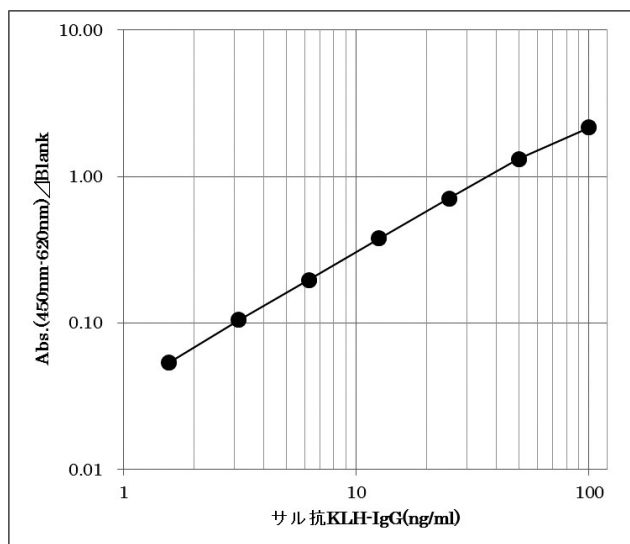
洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意して下さい。  
抗原固相化プレートのシールは、プレートが充分に室温に戻ってから剥がして下さい。

- (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) 検体測定ウェルに希釈調製済み検体を 50  $\mu$ L ずつ分注します。
  - (3) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 50  $\mu$ L 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、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) 各ウェルにペルオキシダーゼ結合抗体溶液を 50  $\mu$ L 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 TMB 溶液を 50  $\mu$ L 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20分間静置（※③）します。
  - (12) 各ウェルに反応停止液を 50  $\mu$ L ずつ分注し、発色反応を停止します。
  - (13) 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）は、12. 測定手順概要とチェックリストをご参照下さい。

## 10. 計算

- (1) 測定毎に標準曲線を作成します。両軸対数を使用し、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下さい。
  - (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）緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施して下さい。
- \* 一番高濃度の標準溶液の吸光度付近の検体は緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定することをお勧め致します。
- \* 演算処理では、3次多項式または4、または5パラメーターの使用をお勧め致します。

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）。



## 11. トラブルシューティングと Q&A

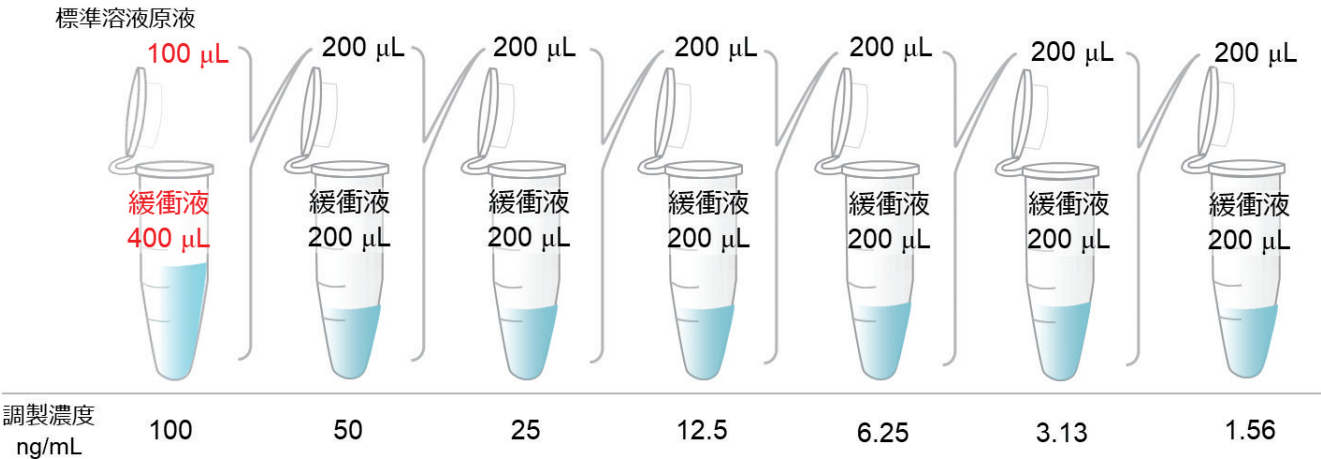
- ・すべてのウェルでの反応が弱い  
原因として考えられること
  - 1) 標準品や検体の入れ忘れ。
  - 2) 発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
  - 3) 発色に関連する試薬溶液の取り違いや希釈調製不良。
  - 4) 酵素阻害剤の混入。
  - 5) キット保管温度の影響（凍結した場合）。
  - 6) プレートの過剰な洗浄。
  - 7) TMB 溶液の温度が低かった。



- ・最小標準溶液濃度（1.56ng/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  
洗浄が不適当、不完全であった。  
（ペルオキシダーゼ結合抗体溶液と反応後の洗浄回数 3 回を同じ流速で 4 回～6 回に増やして下さい。）
- ・変動係数（CV）が大きい  
原因として考えられること
  - 1) 洗浄が不適当、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下さい）。
  - 3) ピペッ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下さい。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下さい。
- ・Q-2：プレートを取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。

12. 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下さい。
- ☐ ウェルプレート、試薬類を十分に室温（20℃～25℃）に戻して下さい。**室温化には 2 時間位必要**
  - ☐ 洗浄液の希釈：室温化された精製水で、**10 倍**に希釈して下さい。
  - ☐ 標準品の希釈（例）：室温化された緩衝液で、希釈して下さい。



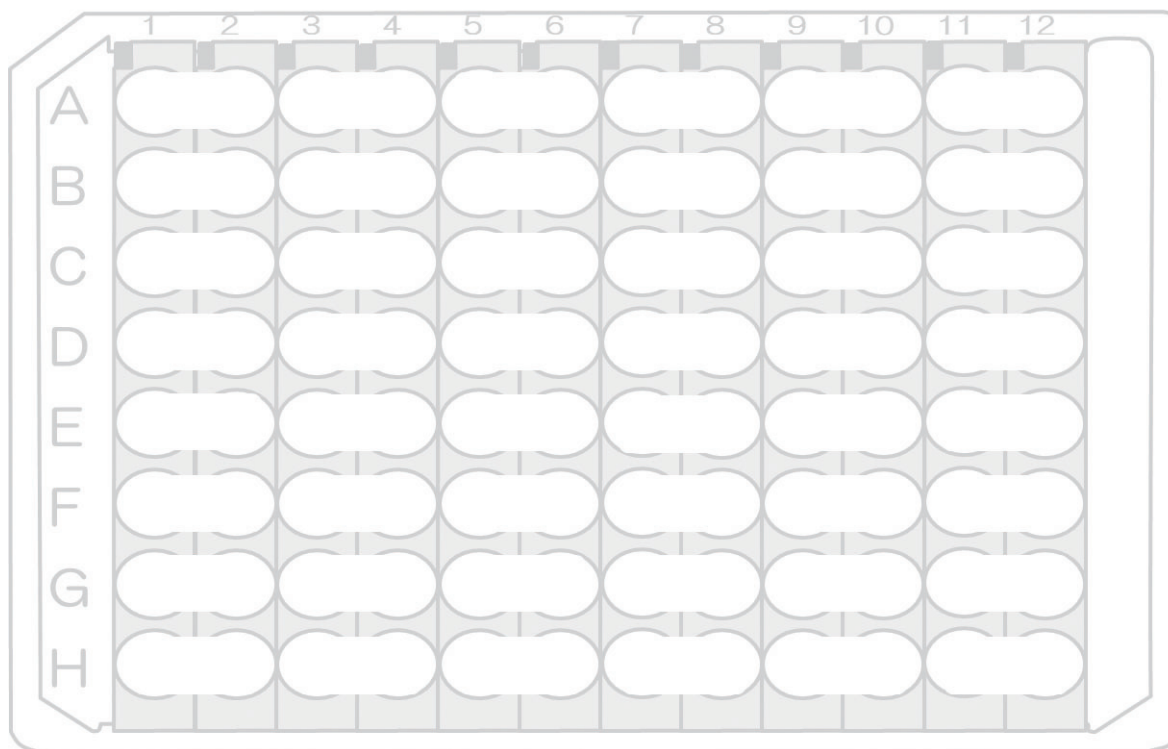
各操作注意事項並びに関連情報

- |                          |   |                    |
|--------------------------|---|--------------------|
| <input type="checkbox"/> | 抗原固相化プレート   |                    |
| <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"/> | 希釈検体または抗 KLH サル IgG 標準品   | 50 µL              |
| <input type="checkbox"/> | ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、1 時間反応、静置  | *②*③               |
| <input type="checkbox"/> | ペルオキシダーゼ結合抗体溶液の希釈。室温化された緩衝液で、 <b>100 倍</b> に希釈して下さい。<br>希釈溶液の調製は第一反応中に行う。 |                    |
| <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"/> | ペルオキシダーゼ結合抗体溶液  | 50 µL              |
| <input type="checkbox"/> | ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、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"/> | TMB 溶液  | TMB が室温化されていることを確認 |
| <input type="checkbox"/> | 分注後、濃度により青色に変色  | 50 µL              |
| <input type="checkbox"/> | ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、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         |
| <input type="checkbox"/> | 分注後、濃度により黄褐色に変色   | 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 450nm、副波長 620nm：600nm～650nm）<br>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。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  $\mu$ L / ウェルです。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は5mL / 分～25mL / 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下さい。
- (※②) 攪拌の目安は600rpm～1200rpm-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下さい。  
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下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

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	100ng/mL	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	50ng/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	25ng/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	12.5ng/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	6.25ng/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	3.13ng/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	1.56ng/mL	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
H	0 (Blank)	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40



13. キットの保存と使用期限

本キットは 2℃～10℃で保存して下さい（凍結厳禁）。使用期限の過ぎた試薬は使用しないで下さい。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】	【使用期限】
【備考】	

【製品名】	レビス <sup>TM</sup> サル KLH-IgG ELISA キット（TDAR）
【和光コード】	293-91401
【英語表記】	LBIS <sup>TM</sup> Monkey KLH-IgG ELISA Kit（TDAR）
【貯法】	2～10℃ 保存
【使用期限】	ラベルに記載
【包装】	96 回用

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