

## Human s-IgA ELISA Kit Wako

«For Research Use Only»

### [1. Introduction]

Secretory IgA (s-IgA) is a type of immunoglobulin that is most abundant in exocrine secretions. It plays a major role in mucosal immunity and functions as the front line of immune response in the gastrointestinal and respiratory tracts. s-IgA levels in saliva are useful as a biomarker in various mental stress and psychological studies.

This ELISA kit is designed for specific and simple measurement of s-IgA in human saliva.

### [2. Kit Performance]

Calibration curve range	0.082-20 $\mu\text{g/mL}$
Sample	Human saliva
Sample amount required	5 $\mu\text{L}$
Assay time	About 2.5 hours
Intra-assay CV (%)	CV < 6%
Inter-assay CV (%)	CV < 12%

### [3. Materials supplied]

Components	State	Amount
Antibody-coated Plate	Use after washing	96 wells (8 × 12) / plate
s-IgA Standard	Lyophilized product, use after reconstitution	1 vial
Anti-Human s-IgA Antibody, HRP-conjugated	Ready-to-use	12 mL × 1 vial
TMB Solution	Ready-to-use	12 mL × 1 vial
Stop Solution	Ready-to-use	12 mL × 1 vial
Buffer (2×)	Use after preparation	25 mL × 1 vial
Wash Solution (20×)	Use after preparation	50 mL × 1 vial
Plate Seal	Ready-to-use	3 sheets
Instruction Manual	—	1 copy

### [4. Assay Principle]

Mouse anti-human s-IgA antibody is immobilized in each well of the assay plate. The standard solutions or samples are added to these wells and allowed to react with the antibody. Next, Anti-Human s-IgA Antibody, HRP-conjugated is added to the wells. Finally, the concentrations of s-IgA in the samples can be determined by measuring the peroxidase activity in the wells.

### [5. Supplies and Equipment]

- Micropipettes and disposable tips (5 to 1,000  $\mu\text{L}$ ) (8- or 12-channel pipettes are recommended.)
- Microplate reader which can read extinction 3.0 at 450 nm

- Microplate shaker or conventional shaker
- Test tubes for dilution of standard solutions and samples (glass or polypropylene)
- Microplate washer (For manual operation, a continuous dispenser, needle dispenser, and an aspirator or vacuum pump are recommended.)
- Graduated cylinder (1,000 mL)
- Distilled or deionized water

### [6. Reagent preparation]

The reagents in the kit must be brought to room temperature (20-30°C) before use (about 2 hours).

#### 6.1 Preparation of Standard Solution

To prepare a 20  $\mu\text{g/mL}$  (0.5 mL) standard solution, add 0.5 mL of the Buffer to the vial containing the standard, allow to stand for about 10 minutes to dissolve, and mix thoroughly. Take 0.1 mL of the standard stock solution and dilute with 0.2 mL of the Buffer to make a 6.67  $\mu\text{g/mL}$  standard solution. Repeat the same dilution procedure to prepare standard solutions of 2.22, 0.74, 0.25, and 0.082  $\mu\text{g/mL}$ . For 0  $\mu\text{g/mL}$  standard solution, use the Buffer.

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume of standard solution	Buffer
6.67	Standard stock solution : 0.1 mL	0.2 mL
2.22	6.67 $\mu\text{g/mL}$ standard solution : 0.1 mL	0.2 mL
0.74	2.22 $\mu\text{g/mL}$ standard solution : 0.1 mL	0.2 mL
0.25	0.74 $\mu\text{g/mL}$ standard solution : 0.1 mL	0.2 mL
0.082	0.25 $\mu\text{g/mL}$ standard solution : 0.1 mL	0.2 mL
0 (Blank)	—	0.2 mL

#### 6.2 Buffer (2×)

Dilute necessary amount of the Buffer (2×) 2-fold with distilled water.

#### 6.3 Wash Solution (20×)

Dilute 50 mL (the whole amount) of the Wash Solution (20×) with 950 mL of distilled water.

If diluted wash solution is stored in a refrigerator, bring it to room temperature before use.

○ Other reagents are ready to use.

### [7. Sample Preparation]

Frozen saliva samples should be thawed at room temperature and stirred well. Dilute saliva samples 80-fold with the Buffer prepared in 6.2, "Buffer (2×)."

1. Prepare 1 test tube for each saliva sample and dispense 395  $\mu\text{L}$  of the Buffer into each test tube.
2. Add 5  $\mu\text{L}$  of saliva sample to each tube and mix well.

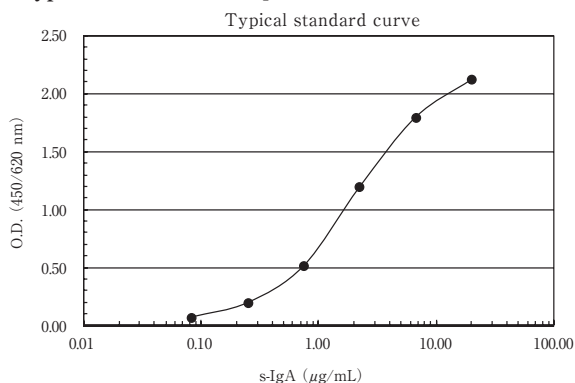
### [8. Assay Procedure]

1. Bring the kit components to room temperature (20-30°C). Prepare Standard Solutions, Buffer (2×), Wash Solution

(20×), and diluted samples as described above.

2. Add 350  $\mu\text{L}$  of the Wash Solution into each well and aspirate the solution. Alternatively, invert the plate, discard the buffer, and then remove the remaining solution by blotting on a paper towel. Repeat this washing procedure further twice (total 3 times).
3. Add 100  $\mu\text{L}$  of the Buffer into each well, then add 50  $\mu\text{L}$  of standard solutions (0, 0.082, 0.25, 0.74, 2.22, 6.67, and 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or diluted samples.
4. Agitate the plate on a microplate shaker for 1 minute (500 rpm). Cover with the plate seal, and incubate for 1 hour at room temperature with shaking (approximately 100 rpm).
5. After the reaction is complete, discard the solution from each well and wash as in step 2, 6 times in total.
6. Add 100  $\mu\text{L}$  of Anti-Human s-IgA Antibody, HRP-conjugated into each well.
7. Cover with the plate seal and incubate for 1 hour at room temperature with shaking (approximately 100 rpm).
8. Discard the solution from each well and wash as in step 2, 6 times in total.
9. Add 100  $\mu\text{L}$  of TMB Solution into each well and allow to stand in a dark place for 30 minutes at room temperature.
10. Add 100  $\mu\text{L}$  of the Stop Solution to each well.
11. Measure the absorbance at 450 nm (sub-wavelength : 620 nm) using a microplate reader.
12. Using commercially available software, create a standard curve from the measured values of each s-IgA standard solution using a 5 (or 4)-parameter regression equation and determine s-IgA concentrations of the diluted samples. Multiply the obtained concentrations by 80 to calculate the s-IgA concentrations of the original saliva samples. When using semi-log graph paper, plot the concentration of the standard solution on the x axis (log scale) and the absorbance of the standard solution at each concentration on the y axis (linear scale) to create a standard curve. Determine the s-IgA concentration that corresponds to the absorbance of each sample using the standard curve.

#### [9. Typical Standard Curve]



#### [10. Precautions]

1. Saliva samples should be stored frozen at  $-30^{\circ}\text{C}$  or below.

Avoid repeated freezing and thawing of samples.

2. In general, reagents should be freshly prepared. In particular, the standard solutions should be used immediately after preparation. If the kit is used in portions, the prepared standard solutions should be divided into small portions and stored frozen at  $-30^{\circ}\text{C}$  or below.
3. Precipitates may form in the Wash Solution (20×) during storage. The precipitates will dissolve with dilution, and the quality will not be affected.
4. When diluting standard solution, be sure to use a new tip for each dilution step. Dispensing to each well should be performed accurately, as it affects the accuracy of the assay. When adding samples into wells, use a new tip for each sample and take care to avoid cross-contamination.
5. If the concentration of a diluted sample exceeds 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , dilute the 80-fold diluted sample further with the Buffer and use for the assay.
6. For incubation at room temperature, always use a microplate shaker to shake the assay plate (except for the chromogenic reaction). Shaking should be done slowly (about 100 rpm) to prevent splashing of the reaction solution on the plate seal.
7. All measurements should be performed in duplicate.
8. Absorbance should be taken immediately after the reaction is stopped.
9. The coloration level of the substrate may be slightly affected by the reaction temperature, time, degree of shaking of the assay plate, etc. Therefore, the standard curve must be prepared for each assay.
10. Avoid exposure to strong light during storage or use of each reagent.
11. Do not combine kits from different lots.
12. TMB Solution should be brought to room temperature in dark place before use.
13. Some of the reagents contain biological materials of human origin and should be handled accordingly.

#### [11. Measurement Examples]

##### 11.1 Spiked Recovery Test

	Spiked s-IgA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Assay value ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Recovery (%)
Saliva sample 1	0	64.8	—
	40	108.8	103.8
	160	220.8	98.2
	400	404.8	87.1
Saliva sample 2	0	46.4	—
	40	96.0	111.1
	160	196.0	95.0
	400	432.0	96.8
Saliva sample 3	0	120.8	—
	40	189.6	117.9
	160	274.4	97.7
	400	476.0	91.4

	Spiked s-IgA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Assay value ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)
Saliva sample 4	0	112.0	—
	40	157.6	103.7
	160	244.8	90.0
	400	441.6	86.3
Saliva sample 5	0	105.6	—
	40	152.0	104.4
	160	250.4	94.3
	400	600.8	118.8

### 11.2 Dilution Linearity Test

	Dilution	Measured value ( $\mu\text{g/mL}$ )
Saliva sample 1	1/1	363.5
	1/2	201.7
	1/4	107.7
	1/8	53.6
Saliva sample 2	1/1	237.4
	1/2	123.9
	1/4	65.3
	1/8	32.5
Saliva sample 3	1/1	310.0
	1/2	167.3
	1/4	89.5
	1/8	42.7
Saliva sample 4	1/1	293.3
	1/2	145.3
	1/4	74.7
	1/8	38.3
Saliva sample 5	1/1	188.2
	1/2	97.5
	1/4	47.4
	1/8	26.8

### 11.3 Cross-reactivity

Related antibody	Cross-reactivity (%)
Serum IgG (Human)	< 0.1
Serum IgA (Human)	0.3
Serum IgM (Human)	0.0
Serum IgE (Human)	0.0

## [12. Assay Procedure Summary]

Ensure that you read the instruction manual and check the sample conditions, assay conditions, and assay procedure before beginning the assay.

<input type="checkbox"/>	Thoroughly equilibrate the plates and reagents to room temperature (20°C to 30°C) before use (approx. 2 hours)
<input type="checkbox"/>	Dilution of Buffer (2×) and Wash Solution (20×) : Dilute the Buffer (2×) 2-fold and Wash Solution (20×) 20-fold with distilled water.

<div><div></div><div></div></div>	<p>Preparation of Standard Solutions (example) :</p> <p>To prepare a 20 <math>\mu\text{g/mL}</math> Standard Stock Solution, add 0.5 mL of the Buffer to the vial of s-IgA standard, allow to stand for about 10 minutes to dissolve thoroughly, and mix. Dilute with the Buffer as below to prepare standard solutions of 6.67, 2.22, 0.74, 0.25, and 0.082 <math>\mu\text{g/mL}</math>.</p>																					
Dilution example	<table><tr><td>Concentration (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</td><td>6.67</td><td>2.22</td><td>0.74</td><td>0.25</td><td>0.082</td><td>0</td></tr><tr><td>Standard Solution (mL) Original :</td><td>0.1</td><td>0.1*</td><td>0.1*</td><td>0.1*</td><td>0.1*</td><td>—</td></tr><tr><td>Buffer (mL)</td><td>0.2</td><td>0.2</td><td>0.2</td><td>0.2</td><td>0.2</td><td>0.2</td></tr></table>	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	6.67	2.22	0.74	0.25	0.082	0	Standard Solution (mL) Original :	0.1	0.1*	0.1*	0.1*	0.1*	—	Buffer (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	6.67	2.22	0.74	0.25	0.082	0																
Standard Solution (mL) Original :	0.1	0.1*	0.1*	0.1*	0.1*	—																
Buffer (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2																
	* : Standard solution at 1 step higher concentration																					

<input type="checkbox"/>	<b>Assay plate with immobilized antibody</b>
<input type="checkbox"/>	↓ Wash 3 times.
<input type="checkbox"/>	<b>Buffer</b> 100 $\mu\text{L}$
<input type="checkbox"/>	<b>Samples or Standard Solutions</b> 50 $\mu\text{L}$
<input type="checkbox"/>	↓ Agitate the plate in on a microplate shaker for 1 minute (approximately 500 rpm).
<input type="checkbox"/>	↓ Cover with the plate seal and incubate for 1 hour at room temperature with shaking (approximately 100 rpm).
<input type="checkbox"/>	↓ Wash 6 times.
<input type="checkbox"/>	<b>Anti-Human s-IgA Antibody, HRP-conjugated</b> 100 $\mu\text{L}$
<input type="checkbox"/>	↓ Cover with the plate seal and incubate for 1 hour at room temperature with shaking (approximately 100 rpm).
<input type="checkbox"/>	↓ Wash 6 times.
<input type="checkbox"/>	<b>TMB Solution</b> 100 $\mu\text{L}$
<input type="checkbox"/>	↓ Allowed to stand for 30 minutes at room temperature in dark.
<input type="checkbox"/>	<b>Stop Solution</b> 100 $\mu\text{L}$
<input type="checkbox"/>	<b>Absorbance measurement (primary wavelength at 450 nm, secondary wavelength at 620 nm)</b>

### [Storage]

Store at 2-10°C

### [Expiration date]

Indicated on the label

### [Package]

For 96 assays

## 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  
<http://fwk.fujifilm.co.jp>

### FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road  
 Richmond, VA 23237  
 U.S.A.  
 Telephone : + 1-804-271-7677  
 Facsimile : + 1-804-271-7791  
<http://www.wakousa.com>

### FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12  
 D-41468 Neuss  
 Germany  
 Telephone : + 49-2131-311-0  
 Facsimile : + 49-2131-311100  
<http://www.wako-chemicals.de>

## ヒト s-IgA ELISA キットワコー

### 【1. はじめに】

分泌型 IgA (Secretory IgA, s-IgA) は免疫グロブリンの一種で、外分泌液中に最も豊富に含まれます。粘膜免疫の主役であり、消化管や呼吸器における免疫機構の最前線として機能するほか、唾液中の s-IgA 濃度は、種々のストレス、心理学的研究において有用な生体指標として用いられています。

本品は、ヒト唾液中の s-IgA を特異的かつ簡便に測定できる ELISA キットです。

### 【2. キット性能】

検量線範囲	0.082 ～ 20 $\mu\text{g/mL}$
測定対象検体	ヒト唾液
必要検体量	5 $\mu\text{L}$
測定時間	約 2.5 時間
同時再現性	CV < 6%
日差再現性	CV < 12%

### 【3. キット内容】

構成品	状態	容量
Antibody-coated Plate/ 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12)/ 1 プレート
s-IgA Standard/s-IgA 標準品	凍結乾燥品・溶解後使用	1 本
Anti-Human s-IgA Antibody, HRP-conjugated/HRP 標識抗ヒト s-IgA 抗体	そのまま使用	12mL×1 本
TMB Solution/TMB 溶液	そのまま使用	12mL×1 本
Stop Solution/ 反応停止液	そのまま使用	12mL×1 本
Buffer(2×)/濃縮緩衝液(2×)	調製後使用	25mL×1 本
Wash Solution (20×)/濃縮洗浄液 (20×)	調製後使用	50mL×1 本
Plate Seal/ プレートシール	そのまま使用	3 枚
取扱説明書	—	1 部

### 【4. 測定原理】

測定プレート (96 ウェル) の各ウェルには、マウス抗ヒト s-IgA 抗体が固相化されています。このウェルに標準溶液または検体を入れて抗体に s-IgA を結合させます。その後 HRP 標識抗ヒト s-IgA 抗体を反応させます。最後にウェル中のペルオキシダーゼ活性を測定することにより、検体中の s-IgA 濃度を求めることができます。

### 【5. 使用器具および装置】

- ☐ マイクロピペットおよびチップ (5 ～ 1,000  $\mu\text{L}$ ) (8 連または 12 連のマルチチャンネルピペット推奨)
- ☐ マイクロプレートリーダー (測定波長 450nm で吸光度 3.0 まで測定できる装置)
- ☐ マイクロプレート用振とう機またはシェーカー

- ☐ 標準溶液 / 検体希釈用試験管 (ガラス製またはポリプロピレン製)
- ☐ マイクロプレート用洗浄装置 (用手法の場合は連続分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプ推奨)
- ☐ メスシリンダー (1,000mL)
- ☐ 蒸留水または脱イオン水

### 【6. 試薬類の調製法】

キットの試薬は使用前に必ず室温 (20 ～ 30℃) に戻して下さい (2 時間程度)。

#### 6.1 標準溶液

標準品の容器に緩衝液 0.5mL を加え、約 10 分間静置して内容物を溶解後、十分に攪拌し、20  $\mu\text{g/mL}$  (0.5mL) の標準溶液を調製します。  
この標準溶液から 0.1mL をとり、これを緩衝液 0.2mL で希釈し、6.67  $\mu\text{g/mL}$  の標準溶液を調製します。以下同様の希釈操作を繰り返し、2.22、0.74、0.25、0.082  $\mu\text{g/mL}$  の各標準溶液を調製します。0  $\mu\text{g/mL}$  の標準溶液は、緩衝液をそのまま使用します。

濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	標準溶液の容量	緩衝液
6.67	標準品原液 : 0.1mL	0.2mL
2.22	6.67 $\mu\text{g/mL}$ 溶液 : 0.1mL	0.2mL
0.74	2.22 $\mu\text{g/mL}$ 溶液 : 0.1mL	0.2mL
0.25	0.74 $\mu\text{g/mL}$ 溶液 : 0.1mL	0.2mL
0.082	0.25 $\mu\text{g/mL}$ 溶液 : 0.1mL	0.2mL
0 (Blank)	—	0.2mL

#### 6.2 緩衝液

濃縮緩衝液 (2×) 適量を蒸留水で 2 倍に希釈して使用します。

#### 6.3 洗浄液

濃縮洗浄液 (20×) 50mL (全量) を蒸留水 950mL にて希釈して使用します。  
希釈した洗浄液を冷蔵保存した場合は、完全に室温に戻してから使用します。

○その他の試薬はそのまま使用します。

### 【7. 検体調製方法】

凍結保存していた唾液検体は、室温で融解後よく攪拌して下さい。唾液検体を「6.2 緩衝液」で調製した緩衝液で 80 倍希釈します。

- 唾液検体数の試験管を準備し、各試験管に緩衝液を 395  $\mu\text{L}$  ずつ分注します。
- 各唾液検体を 5  $\mu\text{L}$  ずつ加え、よく攪拌します。

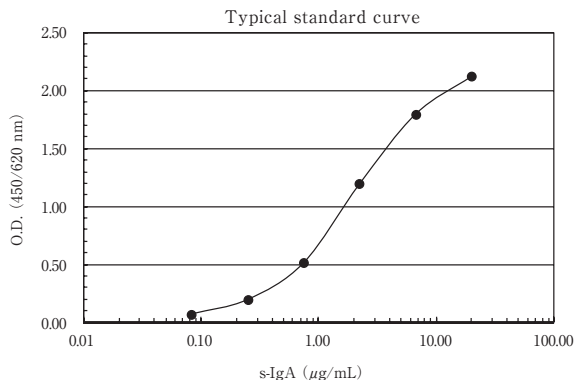
### 【8. 測定操作】

- キットの部材を室温 (20 ～ 30℃) において、室温平衡します。標準溶液、緩衝液、洗浄液および希釈検体を上記の方法に従って調製します。
- 各ウェルに、洗浄液 350  $\mu\text{L}$  を分注し、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除きます。

この操作をさらに2回繰り返し、合計3回の洗浄操作を行います。

- 各ウエルに緩衝液 100  $\mu$ L を分注し、ついで標準溶液 (0、0.082、0.25、0.74、2.22、6.67、20  $\mu$ g/mL) または希釈検体 50  $\mu$ L を加えます。
  - 測定プレートでプレートミキサーで1分間攪拌 (500rpm) した後、プレートシールでシールし、室温で1時間振とうします (約 100rpm)。
  - 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計6回行います。
  - 各ウエルに HRP 標識抗ヒト s-IgA 抗体 100  $\mu$ L を分注します。
  - 測定プレートをプレートシールでシールし、室温で1時間振とうします (約 100rpm)。
  - 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計6回行います。
  - 各ウエルに TMB 溶液 100  $\mu$ L を分注し、遮光状態で静置し、室温で30分間反応させます。
  - 各ウエルに反応停止液 100  $\mu$ L を加えます。
  - マイクロプレートリーダーにて 450nm/620nm の吸光度を測定します。
  - 市販のソフトウェアを用いて、5 (or 4)-Parameter の回帰式を使用し、s-IgA 標準溶液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、希釈検体の s-IgA 濃度を求めます。求めた濃度を80倍し、元の唾液検体中の s-IgA 濃度を算出します。
- 片対数方眼紙を用いる場合は、横軸 (Log 側) に標準液の濃度を、縦軸 (Linear 側) に標準液各濃度の吸光度をプロットして標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、s-IgA の濃度を読み取ります。

#### 【9. 標準曲線例】



#### 【10. 使用上の注意】

- 唾液検体は  $-30^{\circ}\text{C}$  以下で凍結保存して下さい。検体の凍結融解を繰り返さないようにして下さい。
- 試薬は用時調製を原則として下さい。特に、標準品は調製後、直ちに使用して下さい。なお、キットを分割使用する場合、調製後の標準品は適宜小分けして、 $-30^{\circ}\text{C}$  以下で凍結保存して下さい。
- 濃縮洗浄液 (20 $\times$ ) は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解しますので、品質には問題ございません。
- 標準溶液を希釈するときは、希釈段階ごとに必ず新しいチップ

プを使用して下さい。また、各ウエルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行ってください。検体をウェルに注入する場合は、検体ごとに新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意して下さい。

- 希釈検体が 20  $\mu$ g/mL を超える高値検体の場合は、80 倍希釈検体をさらに緩衝液にて希釈して測定して下さい。
- 室温での反応には必ずマイクロプレート用振とう機を用い、測定プレートを振とうして下さい (呈色反応の場合を除く)。なお、振とうはプレートシールに反応液がはねないようにゆっくりに行って下さい (約 100rpm)。
- 測定はすべて2重測定で行ってください。
- 反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
- 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度などでわずかですが影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごとに作成して下さい。
- 各試薬の保存中もしくは使用中に強い光が当たらないように注意して下さい。
- 異なるロットのキットを組み合わせて使用しないで下さい。
- TMB 溶液は遮光状態で室温に戻してから使用して下さい。
- 一部の試薬には、ヒト由来生物学的材料を使用していますので取り扱いに注意して下さい。

#### 【11. 測定例】

##### 11.1 添加回収試験

	添加 ( $\mu$ g/mL)	測定値 ( $\mu$ g/mL)	回収率 (%)
唾液検体 1	0	64.8	—
	40	108.8	103.8
	160	220.8	98.2
	400	404.8	87.1
唾液検体 2	0	46.4	—
	40	96.0	111.1
	160	196.0	95.0
	400	432.0	96.8
唾液検体 3	0	120.8	—
	40	189.6	117.9
	160	274.4	97.7
	400	476.0	91.4
唾液検体 4	0	112.0	—
	40	157.6	103.7
	160	244.8	90.0
	400	441.6	86.3
唾液検体 5	0	105.6	—
	40	152.0	104.4
	160	250.4	94.3
	400	600.8	118.8

##### 11.2 希釈直線性試験

	希釈倍率	測定値 ( $\mu$ g/mL)
唾液検体 1	1/1	363.5
	1/2	201.7
	1/4	107.7
	1/8	53.6



