

## LBIS™ Rat TSH ELISA Kit

### 1. Introduction

Thyroid-stimulating hormone (TSH), also known as thyrotropin, is a glycoprotein with a molecular weight of approximately 28,000. It is a heterodimer composed of an  $\alpha$ -subunit, which shares a common structure with luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH), and a  $\beta$ -subunit specific to TSH. Variations in their sugar chain structures result in several molecular species with different isoelectric points. TSH is produced and secreted in all vertebrates by basophilic cells in the anterior pituitary gland; these basophilic cells are called thyrotrophs. TSH has various functions including increasing the synthesis and secretion of thyroid hormones by promoting the uptake of inorganic iodine and the iodination of thyroglobulin. Additionally, TSH enhances glucose and lipid metabolism in adipose tissue and can cause exophthalmos (protrusion of the eyeballs). The secretion of TSH is directly stimulated by thyrotropin-releasing hormone (TRH) and indirectly by estrogen and insulin. Cold stress can also cause an increase in TSH levels. Conversely, TSH secretion is inhibited by somatostatin, thyroid hormones, growth hormone, glucocorticoids, opioid peptides (especially  $\beta$ -endorphin), as well as physiological conditions, such as stress, that activate the sympathetic nervous system. Starvation also suppresses the release of TSH from the pituitary gland. TSH blood concentrations exhibit diurnal variations.

This kit utilizes a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative measurement of Rat TSH and is intended for research purposes use only.

### ◆Product Features

- Highly sensitive (standard curve range is 0.184 ng/mL - 18.0 ng/mL).
- Total reaction time is 4 hours.
- Measures TSH in rat serum or plasma (recommended anticoagulant is EDTA-2Na at a final concentration of 1 mg/mL).
- Each kit contains 96 wells.
- Standard is derived from rat sources.
- All reagents are provided as a solution.

### 2. Assay Principle

In the assay using this kit, standards and diluted samples are incubated in microplate wells coated with an anti-TSH antibody for 2 hours. After washing, biotin-conjugated anti-TSH antibody is added and incubated for another 1 hour. Following a second wash, peroxidase-conjugated streptavidin solution is added and incubated for 30 minutes to bind to the captured TSH. After washing, TMB Solution, which reacts with the bound peroxidase, is added. The reaction is stopped by adding an acidic solution, resulting in a yellow product that is measured colorimetrically at 450 nm (with a secondary wavelength of 620 nm). The absorbance is approximately proportional to the TSH concentration. A standard curve is created by plotting absorbance against standard concentrations. The standard curve is then used to determine the concentration in unknown samples.

### 3. Performance Characteristics

#### • Measurement Range

TSH can be measured in the range of 0.184 ng/mL - 18.0 ng/mL.

(With 5-fold dilution, the effective measurement range is 0.920 ng/mL - 90.0 ng/mL.)

#### • Specificity

The antibodies used in this ELISA system are Rat TSH-specific monoclonal antibodies.

The results of measuring related substances with this kit are shown in the table below.

Sample	Cross-reactivity	Sample	Cross-reactivity
Rat TSH	100%	Rat FSH	No cross-reactivity
Rat LH	No cross-reactivity	Rat GH	No cross-reactivity

TSH is a heterodimer composed of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits. In radioimmunoassay (RIA) based on competitive binding, only one antigen recognition site is utilized, which may result in the measurement of the  $\beta$ -subunit monomer. In contrast, our ELISA kit employs two types of antibodies, each recognizing either the  $\alpha$ - or  $\beta$ -subunit, thereby providing high specificity for native TSH. Consequently, TSH measurement values in blood, such as those after thyroidectomy or following the administration of antithyroid drugs, may not align with RIA measurement values reported to date.

Reference : Mori, M. and Oshima, K. *et al.* : *Acta Endocrinol.*, **105**, 49 (1984).

- Precision Test (intra-assay variation)

With 8 replicates of 5 samples, the mean coefficient of variation (C.V.) value was less than 10%.

- Reproducibility Test (inter-assay variation)

With 4 replicates of 2 samples over 4 days, the mean C.V. value was less than 10%.

- Spike and Recovery Test

When 5 different concentrations of TSH were added to a serum sample and measured, the recovery rates ranged from 98.3% - 101%.

- Dilution Linearity

When 3 serum samples were serially diluted with dilution Buffer through 3 dilution steps and measured, the linear regression R<sup>2</sup> value was 0.999.

#### **4. Reference Values**

Rat TSH assay data : 3.26 ng/mL - 4.65 ng/mL

Strain : CD (SD), 5 males, 9 weeks old, fasting

Rat TSH assay data : 2.50 ng/mL - 4.04 ng/mL

Strain : CD (SD), 5 males, 7 months old, non-fasting

Rat TSH assay data : 8.09 ng/mL - 11.9 ng/mL

Strain : CD (SD), 5 males, 9 weeks old, non-fasting, thyroidectomy

Assay data may vary depending on housing conditions, blood collection methods, and sample storage conditions. Please use these values for reference purposes only.

#### **5. Technical Tips/Precautions**

- Anesthesia (e.g., deep ether anesthesia) and stress during blood collection may affect assay results. If using an anesthetic, barbiturates are recommended.

- Organic solvents may affect assay results.

- To stabilize the sample pH and avoid the influence of calcium ions, EDTA-2Na at a final concentration of 1 mg/mL is recommended as an anticoagulant. Contact us for inquiries about other anticoagulants. Notably, high concentrations of heparin may result in low assay values or make the assay impossible.

- When using human blood collection tubes (with serum separation gel), check for any potential impact on the assay in advance.

- 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 - 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. If performing assays under such conditions is unavoidable, in addition to sealing the plate during each reaction step, consider conducting reactions inside an incubator or a Styrofoam box. Countermeasures may vary depending on the conditions of the laboratory. Please contact us for further details.

- 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.

- TMB Solution should be clear pale yellow before adding to a 96-well plate. Store away from light.

- The stop solution is colorless before use.

- 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, during preparation and assay with this kit.

- 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.

- 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.

- Soak used samples and consumables in 1% formalin, 2% glutaraldehyde, or a sodium hypochlorite solution of 0.1% or higher for at least 1 hour. Alternatively, autoclave with your facility's regulations and local laws.

## 6. Reagents supplied

Components	Use Status	Amount
(A) Antibody-coated Plate	Use after Washing	96 wells (8×12)/1 plate
(B) TSH Standard (18.0 ng/mL) TSH Standard (7.20 ng/mL) TSH Standard (2.88 ng/mL) TSH Standard (1.15 ng/mL) TSH Standard (0.460 ng/mL) TSH Standard (0.184 ng/mL)	Ready for use	450 $\mu$ L/1 bottle each
(C) Buffer	Ready for use	60 mL/1 bottle
(D) Biotin-conjugated Antibody Solution	Concentrated, Use after dilution	100 $\mu$ L/1 bottle
(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Concentrated, Use after dilution	100 $\mu$ L/1 bottle
(F) TMB Solution	Ready for use	12 mL/1 bottle
(H) Stop Solution	Ready for use	12 mL/1 bottle
(I) Wash Solution (10×)	Concentrated, Use after dilution	100 mL/1 bottle
(J) Plate seals	—	4 sheets

### [Storage and Stability]

#### [(A) Antibody-coated Plate]

Return any unused antibody-coated strips (kept sealed and refrigerated) to the included zip-seal bag and store them at 2°C - 10°C.

#### [(B) TSH Standard]

When using only a portion of the kit, remove the kit from the refrigerator just before use. Immediately, tightly close the cap of the remaining original solution and store it at 2°C - 10°C without allowing it to reach room temperature.

#### [(C) Buffer] and [(F) TMB Solution]

When using a portion of these solutions, transfer slightly more than needed to a separate container. Immediately, tightly close the lid of the remaining original solution and store it at 2°C - 10°C without allowing it to reach room temperature.

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

When using a portion of the kit, remove the kit from the refrigerator just before preparing dilutions. Immediately, tightly close the cap of the remaining original solution and store it at 2°C - 10°C without allowing it to reach room temperature. Discard any remaining diluted solution.

#### [(H) Stop Solution]

If storing any remaining solution, close the lid tightly and store it at 2°C - 10°C.

#### [(I) Wash Solution (10×)]

When storing the Wash Solution (10×), close the lid tightly and store it at 2°C - 10°C. Discard any remaining diluted Wash Solution.

## 7. Equipment or supplies required but not supplied Use as a check box

- Purified water (distilled water)  Test tubes for diluting standard solution  Glassware for diluting Wash Solution (graduated cylinder, beaker, bottle)  Pipette with replaceable tips (disposable tips capable of accurately pipetting 10  $\mu$ L - 100  $\mu$ L, as well as 50  $\mu$ L - 500  $\mu$ L)  Repetitive dispensing pipette (e.g., Eppendorf multipette plus) capable of dispensing 50  $\mu$ L repeatedly  Absorbent materials like paper towels (for removing remaining liquid from the plate after washing)
- Vortex mixer  Microplate shaker (approximately 600 rpm - 1,200 rpm)  96 well-plate washer (preferred if available) or wash bottle  96 well-plate reader (450 nm  $\pm$  10 nm, 620 nm : 600 nm to 650 nm)  Software for data analysis

## 8. Preparation of Sample

- This kit is intended to measure TSH in rat serum or plasma.
- Dilute the samples with (C) Buffer in advance in test tubes, mix thoroughly, and dispense into the assay wells. **The standard operating procedure calls for a 5-fold dilution.**

### Notes on Dilution with Buffer

- After dilution with (C) Buffer, ensure the sample and (C) Buffer are thoroughly mixed and equilibrated. If available, mix on a roller mixer for approximately 15 minutes. If unavailable, let the mixture stand for about 15 minutes, then mix using a vortex mixer before dispensing into the wells.
- Avoid using hemolyzed or lipemic samples, as they can lead to divergent results.

**Note : Even when diluted 5-fold, avoid using blood specimens with high lipid content or significant hemolysis, as these may cause divergent results.**

- To stabilize the sample pH and avoid the influence of calcium ions, EDTA-2Na at a final concentration of 1 mg/mL is

recommended as an anticoagulant. Contact us for inquiries about other anticoagulants. Be aware that high concentrations of heparin may result in low assay values or make the assay impossible.

### **[Sample Stability and Storage]**

For long-term storage of samples, freezing at -35°C or below is recommended. Avoid repeated freeze-thaw cycles, and prepare dilution immediately before use.

### **9. Preparation of Reagents**

- Before use, bring all reagents of the kit to room temperature (20°C - 25°C). Approximately 2 hours are needed to reach room temperature.
- Reagents labeled "Ready for use" in section 6 can be used directly after reaching room temperature. For reagents labeled "Dilute before use," prepare them according to the instructions below.
- Prepare reagent solutions in an appropriate volume for your assay. Contact us if you have any questions.

### **[Concentrated Reagents]**

#### (D) Biotin-conjugated Antibody Solution

A sufficient volume is provided to dispense 100  $\mu$ L. Prepare working solution by dilution of (D) with the (C) Buffer to **1 : 100**.

#### (E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution

A sufficient volume is provided to dispense 100  $\mu$ L. Prepare working solution by dilution of (E) with the (C) Buffer to **1 : 100**.

#### (I) Wash Solution (10 $\times$ )

Dilute 1 volume of the (I) Wash Solution (10 $\times$ ) to **10% solution by volume** with deionized water (or distilled water) at room temperature.

Example : 100 mL of (I) Wash Solution (10 $\times$ ) + 900 mL of purified water (distilled water) (when all wells in a 96 well-plate are used).

### **10. Assay Procedure**

Prepare the next reagent in advance before starting the washing steps.

Remove the seal from the (A) Antibody-coated Plate only after it has returned to room temperature.

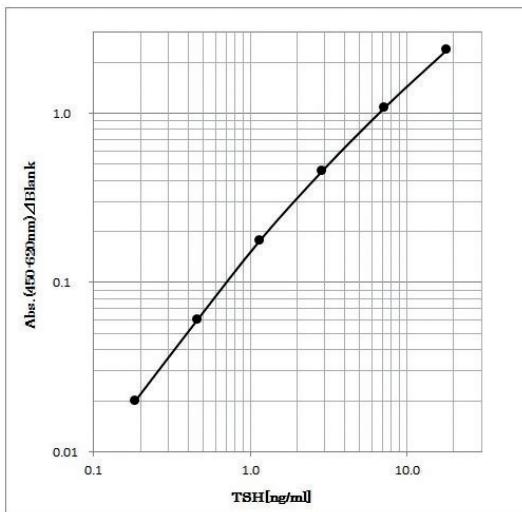
- (1) Wash the (A) Antibody-coated Plate by filling the wells with washing solution and discard 4 times (\*①), then tap the plate upside-down onto several sheets of folded paper towels to remove residual washing solution in the wells.
- (2) Pipette 100  $\mu$ L of each sample diluted with (C) Buffer to the wells designated for samples. (The standard operating procedure calls for a 5-fold dilution.)
- (3) Pipette 100  $\mu$ L of each (B) TSH Standard solutions to the wells designated for standards.
- (4) Shake the plate gently on a plate shaker (\*②).
- (5) Apply a plate seal on the plate and incubate at room temperature (20°C - 25°C) for 2 hours (\*③) without shaking.
- (6) After the reaction, discard the reaction mixture, fill each well with (I) Wash Solution, and wash 4 times (\*①). Then tap the plate upside-down onto several sheets of folded paper towels to remove residual washing solution in the wells.
- (7) Pipette 100  $\mu$ L of (D) Biotin-conjugated Antibody Solution diluted 1 : 100 with (C) Buffer to all well. Shake using a microplate shaker (\*②).
- (8) Apply a plate seal on the plate and incubate at room temperature (20°C - 25°C) for 1 hour (\*③) without shaking.
- (9) After the reaction, discard the reaction mixture, fill each well with (I) Wash Solution, and wash 4 times (\*①). Then tap the plate upside-down onto several sheets of folded paper towels to remove residual washing solution in the wells.
- (10) Pipette 100  $\mu$ L of (E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution diluted 1 : 100 with (C) Buffer to all wells. Shake using a microplate shaker (\*②).
- (11) Apply a plate seal on the plate and incubate at room temperature (20°C - 25°C) for 30 minutes (\*③) without shaking.
- (12) After the reaction, discard the reaction mixture, fill each well with (I) Wash Solution, and wash 4 times (\*①). Then tap the plate upside-down onto several sheets of folded paper towels to remove residual washing solution in the wells.
- (13) Pipette 100  $\mu$ L of (F) TMB Solution to wells. Shake using a microplate shaker (\*②).
- (14) Apply a plate seal on the plate and incubate at room temperature (20°C - 25°C) for 30 minutes without shaking.
- (15) Pipette 100  $\mu$ L of (H) Stop Solution to all wells to terminate the chromogenic reaction.
- (16) After shaking (\*②), immediately measure the absorbance at 450 nm (secondary wavelength 620 nm) using a microplate reader. A secondary wavelength of 600 nm to 650 nm may be used.

Please refer to section 13. "Summary of Assay Procedure" for details on steps (\*①), (\*②), and (\*③).

## 11. Calculations

- (1) Create a standard curve for each assay. Use a double-logarithmic scale, plotting the concentration of the standard solution (ng/mL) on the X-axis and absorbance on the Y-axis to generate the standard curve.
- (2) From the standard curve, determine the concentration (ng/mL) corresponding to the absorbance of each sample. Multiply the concentration by the sample dilution factor (5.0) to calculate the measured value.
  - If the sample absorbance falls outside the range of the standard curve, dilute the sample to an appropriate concentration with (C) Buffer and repeat the assay.
  - For data processing using computer software, it is recommended to use a cubic polynomial or a 4- or 5-parameter logistic curve fit.

The graph below is an example of a standard curve (absorbance will vary depending on assay conditions).



The plate reader used was SUNRISE (TECAN).

## 12. Troubleshooting and Q&A

- Low absorbance in all wells

Possible explanations :

- 1) The standard or samples might not have been added.
- 2) Reagents necessary for coloration might not have been added.
- 3) Wrong reagents related to coloration might have been added.
- 4) Contamination of enzyme inhibitor.
- 5) Influence of the temperature under which the kits had been stored (When frozen).
- 6) Excessively hard washing of the well plate.
- 7) Addition of (F) TMB Solution 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 (0.184 ng/mL).

Possible explanations :

Improper or inadequate washing. (Change washing frequency from 4 times to 5 - 8 times after the reaction with Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution.)

- High coefficient of variation (C.V.)

Possible explanation :

- 1) Improper or inadequate washing.
- 2) Improper mixing of standard or samples. (Ensure that mix frozen samples.)
- 3) Pipetting at irregular intervals.

- Q-1 : Can I use the kit in divided portions?

A-1 : Yes. Separate the strips by cutting the clear seal along the strip lines with a cutter knife. Immediately store the portion of the plate not used that day in the refrigerator with the seal in place.

- Q-2 : Upon opening the plate, there was liquid in the wells. What is it?

A-2 : A stabilizing solution is added to the wells prior to shipping.

## 13. Summary of Assay Procedure

Be sure to read the instructions thoroughly and confirm the sample conditions, assay conditions, and assay method before performing the assay.

Allow the Antibody-Coated Plate and reagents to reach room temperature (20°C - 25°C).

Approximately 2 hours are needed to reach room temperature.

Dilution of Wash Solution : Dilute **10 times** with purified water at room temperature.

Precautions for Each Step

**Antibody-Coated Plate**

↓ Wash 4 times (dispense the next reagent immediately after removing Wash Solution) (\*①)

**Diluted sample or TSH Standard**

100  $\mu$ L

↓ Shaking (\*②), incubation at room temperature (20°C - 25°C) for 2 hours. (Standing (\*③))

Dilution of (D) Biotin-conjugated Antibody Solution : Dilute 1 : 100 with room temperature

Buffer.

Prepare the diluted solution during the first reaction.

↓ Wash 4 times (dispense the next reagent immediately after removing Wash Solution) (\*①)

**Biotin-conjugated Antibody Solution**

100  $\mu$ L

↓ Shaking (\*②), incubation at room temperature (20°C - 25°C) for 1 hour. (Standing (\*③))

Dilution of (E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution : Dilute **1 : 100** with room temperature (C) Buffer. Prepare the diluted solution during the second reaction.

↓ Wash 4 times (dispense the next reagent immediately after removing Wash Solution) (\*①)

**Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution**

100  $\mu$ L

↓ Shaking (\*②), incubation at room temperature (20°C - 25°C) for 30 minutes. (Standing (\*③))

↓ Wash 4 times (immediately dispense TMB Solution after removing Wash Solution) (\*①)

**TMB Solution : Ensure TMB is at room temperature.**

Blue color will develop upon addition to the wells, depending on concentration.

100  $\mu$ L

↓ Shaking (\*②), incubation at room temperature (20°C - 25°C) for 30 minutes. (Standing (\*③))

**Stop Solution : Handle with care as it is strongly acidic.**

Yellow-brown color will develop upon addition to the wells, depending on concentration.

100  $\mu$ L

↓ Shaking (\*②) (immediately shake)

**Measure absorbance immediately (primary wavelength 450 nm, secondary wavelength 620**

**nm: range 600 nm - 650 nm)**

The secondary wavelength cancels out any residue on the underside of the plate.

(\*①) After dispensing the Wash Solution into the wells, gently swirl the plate on your palm for 10 seconds, then shake off the Wash Solution. Following four consecutive washes, invert the plate onto a paper towel and tap it gently to completely remove any remaining Wash Solution. Be careful to prevent the wells from drying out after removing the Wash Solution and immediately dispense the next reagent. When adding the Wash Solution with a pipette, use approximately 300  $\mu$ L per well. If the blank OD value exceeds the OD value of the lowest standard concentration (0.184 ng/mL), one possible solution is to increase the wash steps after reacting with the Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution from 4 to 5 - 8 times at the same flow rate. If using a plate washer, a pressure of 5 mL/min - 25 mL/min is recommended, depending on the nozzle diameter. During the initial wash after the first reaction, take care to avoid cross-contamination between wells.

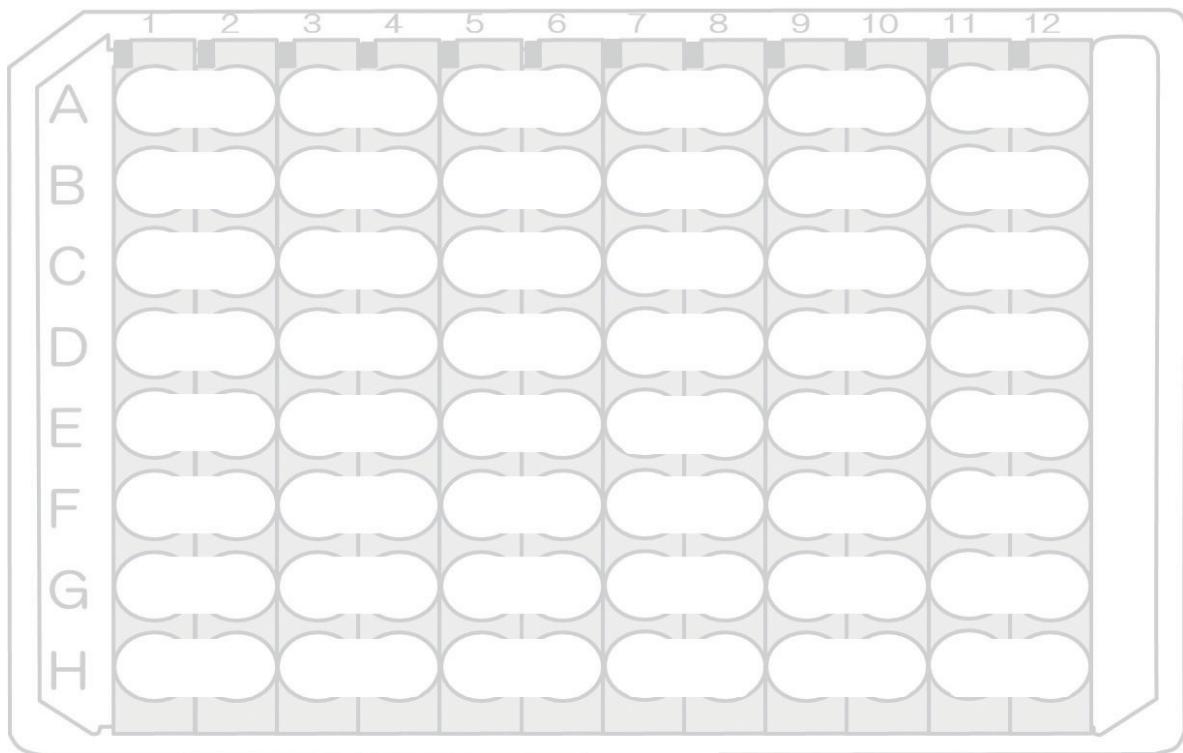
(\*②) The recommended mixing rate is 600 rpm - 1,200 rpm for 10 seconds, repeated for a total of 3 times.

(\*③) After mixing, apply a plate seal and incubate the plate without shaking.

Remove the backing from the plate seal and apply it with the adhesive side facing the plate. Do not reuse the plate seal once it has been used.

Worksheet (Example)

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	18.0 ng/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
B	7.20 ng/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
C	2.88 ng/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
D	1.15 ng/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
E	0.460 ng/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
F	0.184 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



#### 14. Storage and Expiration

Store the kit at 2°C - 10°C (do not freeze). Do not use reagents that have passed the expiration date. Once opened, use each reagent promptly, as storage conditions may affect reagent performance.

[Assay Name]

[Affiliation]

[Assay Operator]

[Assay Date]

[Lot Number]

[Expiration Date]

[Notes]

---

#### LBIS™ Rat TSH ELISA Kit

[Storage] Store at 2°C - 10°C

[Expiration Date] Indicated on the label.

[Package] For 96 tests

[Cat #] 296-88701

---

#### 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://fwwk.fujifilm.co.jp>

Group Companies



Distributors



本品は研究用試薬です。体外診断用として使用できません。

Code No. 296-88701 (96回用)

## レビス™ ラット TSH ELISA キット

### 1. イントロダクション

TSH (Thyroid-Stimulating Hormone、別名 Thyrotropin, チロトロピン) は分子量約 28,000 の糖タンパク質で、LH、FSH と共に構造をもつ  $\alpha$ -サブユニットと、TSH に特異的構造の  $\beta$ -サブユニットからなるヘテロダイマーです。糖鎖構造の違いに由来する等電点の異なる数種の分子種があります。TSH は全脊椎動物で、脳下垂体前葉のチロトローフと呼ばれる好塩基細胞で産生・分泌されます。その作用は無機ヨウ素の摂取とチログロブリンのヨウ素化促進を通して甲状腺ホルモンの合成・分泌を増大させ、脂肪組織でのグルコース、脂肪分解を亢進させ、また眼球突出を起こします。その分泌は直接的には TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone)、またエストロゲン、インスリンによって間接的に促進されます。また寒冷ストレスで亢進します。ソマトスタチン、甲状腺ホルモン、成長ホルモン、グルココルチコイド、オピオイドペプチド、特に  $\beta$ -エンドルフィン、生理状態として交感神経刺激性のストレス、飢餓などで分泌が抑制され、血中濃度には日内変動があります。

本キットはラット TSH (Thyroid-Stimulating Hormone) 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。本キットは研究にのみご使用下さい。

### ◆製品の特長

- ・高感度（標準曲線範囲は 0.184ng/mL ~ 18.0ng/mL）で測定できます。
- ・全反応時間は 4 時間です。
- ・ラット血清または血漿（抗凝固剤は EDTA-2Na；最終濃度 1mg/mL をお薦めします）中の TSH を測定します。
- ・1 キットは 96 ウエルです。
- ・標準品はラット由来のものです。
- ・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 TSH 抗体固相化マイクロプレートウェル中で 2 時間インキュベートします。洗浄後、ビオチン結合抗 TSH 抗体を加え 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、捕捉された TSH とともに 30 分間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 TSH 濃度にはほぼ比例します。標準品濃度に対して吸光度をプロットし標準曲線を作製し、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

0.184ng/mL ~ 18.0ng/mL の範囲で測定できます。  
(5.0 倍希釈時の実効測定範囲は 0.920ng/mL ~ 90.0ng/mL)

#### ・特異性

この ELISA 系で使用されている抗体はラット TSH に対して特異的なモノクローナル抗体です。

関連物質を本キットで測定した結果は下表のとおりです。

検体名	交差性	検体名	交差性
ラット TSH	100%	ラット FSH	交差性無し
ラット LH	交差性無し	ラット GH	交差性無し

TSH は  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットのヘテロダイマーです。競合的結合原理に基づく RIA は抗原認識部位が 1 箇所であるため、 $\beta$ -サブユニットを測り込んでしまう可能性があります。一方、当社の ELISA キットは  $\alpha$ -サブユニット、及び  $\beta$ -サブユニットを認識する 2 種類の抗体を使用しているため、native な TSH に対する特異性が高くなっています。したがって、例えば甲状腺摘出後や抗甲状腺薬投与による血中 TSH の測定値などが、今まで報告されている RIA 測定値と一致しない事があります。

参考文献 : Mori, M. and Oshima, K. et al. : *Acta Endocrinol.*, **105**, 49 (1984).

- ・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）(4 重測定、2 検体、4 日間) 平均 C.V. 値は 10% 未満
- ・添加回収試験

血清検体に異なる 5 濃度の TSH を添加し測定した結果、回収率は 98.3% から 101% でした。

#### ・希釈直線性試験

3 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  $R^2$  は 0.999 でした。

#### 4. 参考値

ラット TSH 測定値 : 3.26ng/mL ~ 4.65ng/mL 個体種 : CD (SD)、雄、5匹、9週齢群、絶食群  
ラット TSH 測定値 : 2.50ng/mL ~ 4.04ng/mL 個体種 : CD (SD)、雄、5匹、7カ月齢群、非絶食群  
ラット TSH 測定値 : 8.09ng/mL ~ 11.9ng/mL 個体種 : CD (SD)、雄、5匹、9週齢群、非絶食群、甲状腺除去  
※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下さい。

#### 5. 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

- ・採血時の麻酔（エーテル深麻酔等）やストレスは測定値に影響を与える場合があります。麻酔薬を使用する場合はバルビツール系をお薦めします。
- ・有機溶媒は測定値に影響を与える場合があります。
- ・抗凝固剤は検体の pH を安定させるため、またカルシウムイオンの影響を避けるため、EDTA-2Na、1mg/mL（最終濃度）を推奨しています。その他の抗凝固剤についてはお問い合わせ下さい。特にヘパリン濃度が高い場合は測定値が低くなるか、または測定できなくなります。
- ・ヒト用採血管（血清分離剤）を使用する際には、測定への影響を事前に確認する事が必要です。
- ・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°C ~ 25°C（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薦めします。
- ・TMB 溶液は 96 ウェルプレートに使用するまでは薄い黄色透明です。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、または指導者の下でご使用下さい。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。

#### 6. 構成品

構成品	状態	容量
(A) 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12) / 1 枚
(B) TSH 標準品 (18.0ng/mL) TSH 標準品 (7.20ng/mL) TSH 標準品 (2.88ng/mL) TSH 標準品 (1.15ng/mL) TSH 標準品 (0.460ng/mL) TSH 標準品 (0.184ng/mL)	そのまま使用	各 450 μL / 1 本
(C) 緩衝液	そのまま使用	60mL / 1 本
(D) ビオチン結合抗体溶液	希釈後使用	100 μL / 1 本
(E) 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 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	-	4 枚

#### 【試薬の安定性と保存方法】

##### (A) 抗体固相化プレート

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）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 ~ 10°C で保存して下さい。

#### (B) TSH 標準品

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て使用して下さい。残りの液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2°C～10°Cで保存して下さい。

#### (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°C～10°Cで保存して下さい。

#### (D) ビオチン結合抗体溶液、及び (E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

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°C～10°C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°C～10°C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°C～10°C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。

### 7. 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 μL～100 μL を正確にピッティングできるもの、及び 50 μL～500 μL を正確にピッ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 600～1200rpm）  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

### 8. 検体の調製

本キットはラット血清または血漿中の TSH を測定します。

・ 検体の希釈は、あらかじめ試験管等を用いて (C) 緩衝液で希釈し充分攪拌を行い、測定ウェルに分注して下さい。標準操作法での検体希釈は 5.0 倍です。

#### ※緩衝液での希釈について

・ 緩衝液で希釈したあと緩衝液と検体を良くなじませて下さい。ローリングミキサーがある場合にはローリングミキサーで 15 分前後攪拌して下さい。無い場合は 15 分前後静置しボルテックスタイプの攪拌器で攪拌後ウェルに分注することをお薦めします。

・ 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。

※最終希釈倍率が 5.0 倍の場合でも原検体中の脂質（乳ビ）、溶血が高い場合は異常値発生の原因となりますので測定に使用しないで下さい。

・ 抗凝固剤は検体の pH を安定させるため、またカルシウムイオンの影響を避けるため EDTA-2Na、1mg/mL（最終濃度）を推奨しています。その他の抗凝固剤についてはお問い合わせ下さい。特にヘパリン濃度が高い場合は測定値が低くなるか、または測定できなくなります。

#### 【検体の安定性と保存方法】

検体を長期に保管する場合は、-35°C 以下の凍結保管を推奨します。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。また、検体の希釈は用時調製として下さい。

### 9. 試薬の調製

\* キットの試薬は使用前に必ず室温（20°C～25°C）に戻して下さい（2 時間位が目安です）。

\* 6.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】

##### (D) ビオチン結合抗体溶液

100 μL を充分採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。

##### (E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

100 μL を充分採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)

## 10. 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。

抗体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、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) 検体測定ウェルに（C）緩衝液で希釈した希釈検体を  $100\mu\text{L}$  ずつ分注します（標準操作法では 5.0 倍希釈です）。
- (3) 標準品測定ウェルに各濃度の（B）TSH 標準溶液を  $100\mu\text{L}$  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) プレートシールを被せ、室温（20°C～25°C）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 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（C）緩衝液で 100 倍に希釈したビオチン結合抗体溶液を  $100\mu\text{L}$  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) プレートシールを被せ、室温（20°C～25°C）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 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（C）緩衝液で 100 倍に希釈したペルオキシダーゼ結合ストレプトアビシン溶液を  $100\mu\text{L}$  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) プレートシールを被せ、室温（20°C～25°C）で 30 分間静置（\*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 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、（F）TMB 溶液を  $100\mu\text{L}$  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。
- (14) プレートシールを被せ、室温（20°C～25°C）で 30 分間静置します。
- (15) ウェルに（H）反応停止液を  $100\mu\text{L}$  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 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、13. 測定手順概要とチェックリストをご参照下さい。

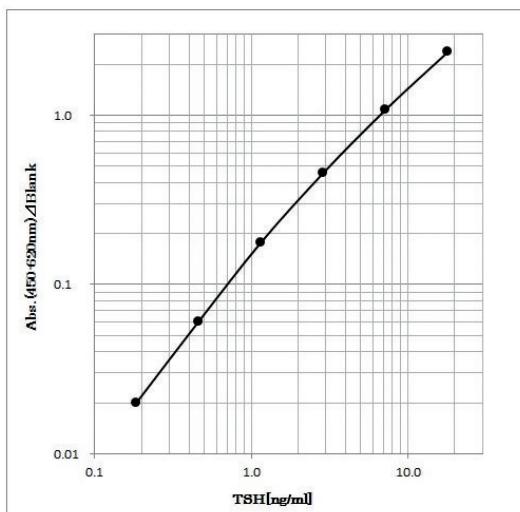
## 11. 計算

- (1) 測定毎に標準曲線を作製します。両対数を使用し 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製して下さい。
- (2) 標準曲線より、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（5.0 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）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。

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

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）。



プレートリーダーは SUNRISE (TECAN) を使用

## 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えや希釀調製不良。  
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) (F) TMB 溶液の温度が低い。  
・最小標準溶液濃度 (0.184ng/mL) の OD 値よりプランク OD 値が高くなる。  
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。  
(ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビシン溶液と反応後の洗浄回数 4 回と同じ流速で 5 回～8 回に増やして下さい。)  
・変動係数 (C.V.) 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。当日使用しないプレートはシールを貼った状態で直ちに冷蔵庫に保管して下さい。  
・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：出荷時には保存安定液が充填しております。

## 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、測定操作を行って下さい。

- 抗体固相化プレート、試薬類を充分に室温（20°C～25°C）に戻して下さい。室温化には 2 時間位必要です。
- 洗浄液の希釀：室温化された精製水で、**10 倍**に希釀して下さい。

### 各操作注意事項

<input type="checkbox"/> <b>抗体固相化プレート</b>		
<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"/> <b>希釀検体または TSH 標準品</b>	100 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) ビオチン結合抗体溶液の希釀。室温化された緩衝液で、 <b>100 倍</b> に希釀して下さい。		
<input type="checkbox"/> 希釀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"/> <b>ビオチン結合抗体溶液</b>	100 μL	
<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シン溶液の希釀。室温化された (C) 緩衝液で、 <b>100 倍</b> に希釀して下さい。希釀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"/> <b>ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビシン溶液</b>	100 μL	
<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 TMB 溶液分注）		
<input type="checkbox"/> <b>TMB 溶液</b>	<b>TMB が室温化されていることを確認</b>	
分注後、濃度により青色に変色		100 μL
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温（20°C～25°C）、30 分間反応、静置		*②*③
<input type="checkbox"/> <b>反応停止液</b>	<b>強酸性につき取扱注意</b>	
分注後、濃度により黄褐色に変色		100 μL
<input type="checkbox"/> ↓攪拌 直ちに攪拌		*②
<input type="checkbox"/> <b>直ちに吸光度測定（主波長 450nm、副波長 620nm : 600nm～650nm）</b>		
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秒ほど軽く振り廻すします。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300μL／ウェルです。万一、最小標準溶液濃度(0.184ng/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回～8回に増やして下さい。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は5～25mL／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。

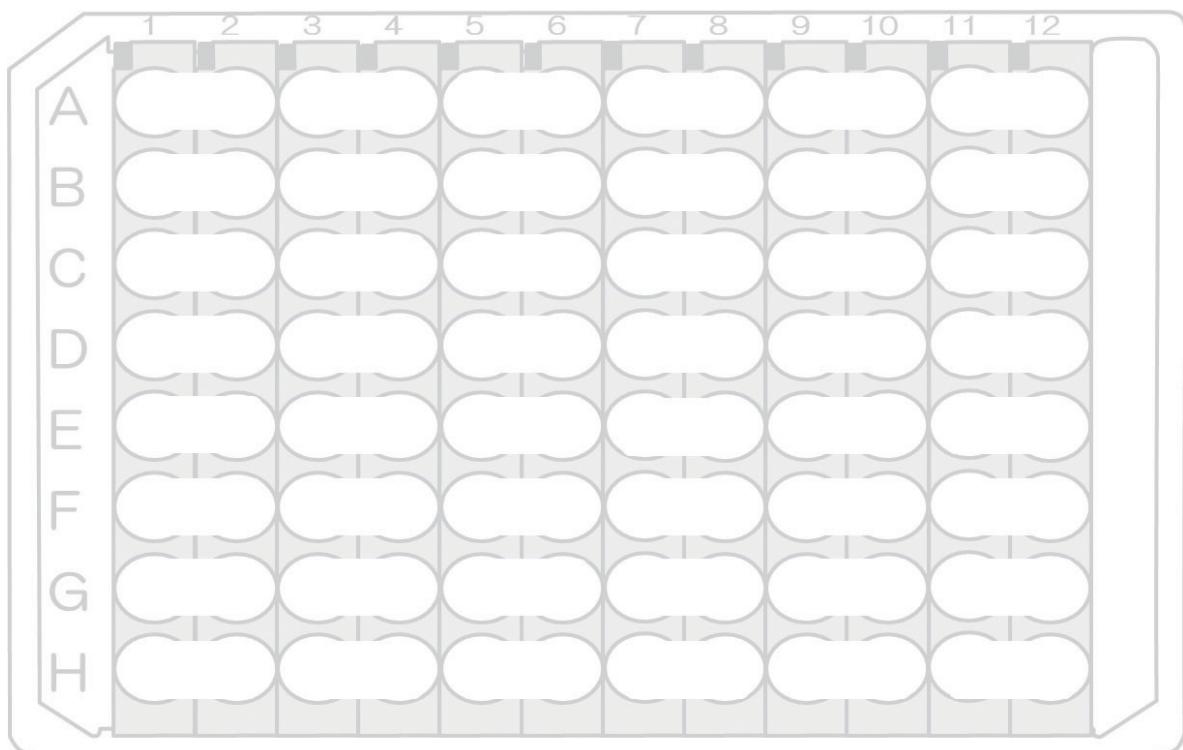
(\*③)攪拌終了後プレートシールを貼って静置して下さい。

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	18.0ng/mL	検体2	検体10	検体18	検体26	検体34
B	7.20ng/mL	検体3	検体11	検体19	検体27	検体35
C	2.88ng/mL	検体4	検体12	検体20	検体28	検体36
D	1.15ng/mL	検体5	検体13	検体21	検体29	検体37
E	0.460ng/mL	検体6	検体14	検体22	検体30	検体38
F	0.184ng/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

#### ワークシート



#### 14. キットの保存と使用期限

キットは2°C～10°C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> ラット TSH ELISA キット

【和光コード】 296-88701

【英語表記】 LBIS<sup>TM</sup> Rat TSH ELISA Kit

【貯法】 2～10°C 保存

【使用期限】 ラベルに記載

【包装】 96回用

製造発売元

富士フィルム 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

2503KA2