

LBIS™ Rat LH ELISA Kit

Please, read this instruction carefully before use.

1. Intended use

LBIS™ Rat LH ELISA Kit is a sandwich ELISA system for quantitative measurement of rat LH. This is intended for research use only.

2. Introduction

LH is produced and stored in basophilic cells called gonadotrophs in the anterior pituitary gland. LH is found in all vertebrates from fishes to mammals. Some reports indicated the presence of LH-like substance in the testis.

LH has a heterodimer structure consisted of α -subunit and β -subunit with a total molecular weight of approximately 29000. α -Subunit is a glycoprotein which is common to other pituitary hormones follicle-stimulating hormone (FSH) and thyroid-stimulating hormone (TSH), while β -subunit is specific to LH, and is also a glycoprotein.

The receptor of LH is a transmembrane receptor of G-protein coupled type, which relates to PKA system and penetrates the cell membrane 7 times.

In females, LH acts on matured granulosa cells in ovarian follicle, where it causes, in cooperation with FSH, follicular maturation, estrogen production, and ovulation, and after ovulation, acts on corpora lutea and promotes progesterone production and secretion.

In males, LH acts on the interstitial cells (Leydig cells) in the testis, causing production and secretion of androgens, and secondarily promotes spermatogenesis via androgen.

Deficiency of LH leads to the lower secretion of sex steroids, atrophy of interstitial cells, and failure of ovulation and luteinization, while excessive LH causes hyperplasia of testicular interstitial cells followed by atrophy, increased secretion of estrogen or androgen, super-ovulation, and accelerated sexual maturation.

GnRH (LHRH) secreted from hypothalamus act directly on gonadotrophs and stimulate LH secretion. Physiologically, positive feedback of estrogen at preovulatory period causes LH surge via GnRH and leads to ovulation. LH secretion is promoted in postmenopausal period women and in aging in men.

LH secretion was minimized by increased blood levels of sex steroids, opioid peptides especially endorphin, in childhood, and pregnancy.

3. Assay Principle

In FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation's LBIS™ Rat LH ELISA Kit, standards or samples are incubated in monoclonal anti-LH β antibody coated wells to capture LH. After 2 hours' incubation and washing, biotinylated anti-LH α antibody is added and incubated further for 1 hour to bind with captured LH. After washing, Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution is added, and incubated for 30 minutes. After washing, HRP-complex remaining in wells are reacted with a chromogen (TMB) for 20 minutes, and reaction is stopped by addition of acidic solution, and absorbance of yellow product is measured spectrophotometrically at 450 nm. The absorbance is proportional to LH concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against standard LH concentrations. LH concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

4. Performance Characteristics

- Assay range

The assay range of the kit is 0.313 ng/mL - 10 ng/mL (for 5 \times sample dilution, 1.565 ng/mL - 50 ng/mL)

- Specificity

The kit uses monoclonal antibodies specific to LH.

- Precision of assay

Within assay variation (2 samples, 8 replicates assay) Mean CV was within 10%.

- Reproducibility

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

- Recovery test

Standard LH was added in 3 concentrations to 2 serum samples and was assayed in duplicates.

The recoveries were 95.1% - 106%.

- Dilution test

Two serum samples were serially diluted by 3 steps.

The dilution curves showed excellent linearity. ($R^2 = 0.999$).

5. Reference Assay Data

Rat LH assay data : Mean 1.93 ng/mL, SD 1.22 ng/mL (Highest : 4.33 ng/mL/Lowest : 0.925 ng/mL)

Subspecies : CD, female, n=9, 8 weeks-old, Serum, fed ad libitum

These are reference data. Blood LH levels may change due to breeding, sampling, and sample storage conditions.

6. References

- 1) Neonatal immune challenge alters reproductive development in the female rat
L Sominsky *et al.*
Horm Behav. 2012 Feb 14.
- 2) Gonadotropin-Inhibitory Hormone Inhibits GnRH-Induced Gonadotropin Subunit Gene Transcriptions by Inhibiting AC/cAMP/PKA-Dependent ERK Pathway in L β T2 Cells.
Son Y. L. *et al.* : *Endocrinology*, **153** (5), 2332 (2012).

7. Precautions

- For professional use only, beginners are advised to use this kit under the guidance of experienced person.
- Wear gloves and laboratory coats when handling assay materials.
- Do not drink, eat or smoke in the areas where assays are carried out.
- In treating assay samples of animal origin, be careful for possible biohazards.
- This kit contains components of animal origin. These materials should be handled as potentially infectious.
- Be careful not to allow the reagent solutions of the kit to touch the skin, eyes and mucus membranes. Especially be careful for the Stop Solution because it is sulfuric acid. The Stop Solution and the substrate solution may cause skin/eyes irritation. In case of contact with these wash skin/eyes thoroughly with water and seek medical attention, when necessary.
- Avoid contact with the acidic Stop Solution and TMB Solution, which contains hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine. Wear gloves and eye-glasses and protective clothing when handling these reagents.
- The materials must not be pipetted by mouth.
- Unused samples and used tips should be rinsed in 1% formalin, 2% glutaraldehyde, or more than 0.1% sodium hypochlorite solution for more than 1 hour, or be treated by an autoclave before disposal.
- Dispose consumable materials and unused contents in accordance with applicable regional/national regulatory requirements.
- Use clean laboratory glassware.
- In order to avoid dryness of wells, contamination of foreign substances and evaporation of dispensed reagents, never forget to cover the well plate with a plate seal supplied, during incubation.
- ELISA can be easily affected by your laboratory environment. Room temperature should be at 20°C - 25°C strictly. Avoid airstream velocity over 0.4 m/sec. (including wind from air conditioner), and humidity less than 30%.

8. Reagents supplied

Components	Use Status	Amount
(A) Antibody-coated Plate	Use after washing	96 wells/1 plate
(B) Rat LH Standard	Concentrated. Use after dilution	200 μ L/1 bottle
(C) Buffer	Ready for use.	60 mL/1 bottle
(D) Biotin-conjugated Antibody Solution	Concentrated. Use after dilution.	100 μ L/1 bottle*
(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution	Concentrated. Use after dilution.	100 μ L/1 bottle*
(F) TMB Solution	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(G) Buffer for Sample	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(H) Stop Solution	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(I) Wash Solution (10 \times)	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle
(J) Plate Seal	—	4 sheets

* You can take out 100 μ L from vials.

【Storage and Stability】

[(A) Antibody-coated Plate]

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

[(B) Rat LH Standard Solution]

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

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

If not opened, store at 2°C - 10°C. Once opened, we recommend using them as soon as possible to avoid influence by environmental condition.

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

Unused working solution (already diluted) should be disposed.

[(H) Stop Solution]

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

[(I) Wash Solution (10×)]

The rest of undiluted buffer : store at 2°C - 10°C. Dispose any unused diluted buffer.

9. Equipments or supplies required but not supplied Use as a check box

- Deionized water (or Distilled water) Test tubes for preparation of standard solution series.
- Glassware for dilution of Wash Solution (10×) (a graduated cylinder, a bottle)
- Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 10 μ L precisely, and another for 10 μ L - 100 μ L and 100 μ L - 500 μ L. Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipette plus which can dispense 50 μ L. Paper towel to remove washing buffer remaining in wells. A vortex-type mixer. A shaker for 96 well-plate (600 rpm - 1200 rpm)
- An automatic washer for 96 well-plate (if available), or a wash bottle with a jet nozzle. A 96 well-plate reader (450 nm \pm 10 nm, 620 nm : 600 nm - 650 nm) Software for data analysis.

10. Preparation of Samples

This kit is intended to measure rat serum (do not use serum-separation-accelerant such as Serum Gel for fear of low assay value) and plasma.

The necessary sample volume for the standard procedure is 10 μ L.

• **Dilute rat serum (plasma) to 2× using (G) Buffer for Sample. Mix and let it stand still for 10 min at 20 - 25°C, then further dilute it to 2.5× using (C) Buffer (final dilution rate is 5×)**, and add it to wells for assay. If sample is in good condition, the limit of final dilution rate would be 2.5×. In this case, dilute sample to 2× using (G) Buffer for Sample, mix and let it stand still for 10 min and dilute it further 1.25× using (C) Buffer.

*** To avoid influence of blood (high lipid or hemolysis, etc.), 5× at the final dilution is recommended for assay. Even if the final dilution is 5×, abnormal value might be obtained when original sample had heavy chyle or hemolysis.**

- When plasma samples are used, we recommend EDTA-2Na (at a final concentration of 1 mg/mL) to keep samples' pH and avoid interference of Ca²⁺. Heparin is not suitable.
- Anesthesia while sampling may influence the assay system. We do not recommend ether anesthesia.
- Don't use sample tubes for human when collecting blood. We have not checked all kinds of sample tubes. Please contact us if necessary.
- Turbid samples or those containing insoluble materials should be centrifuged before testing to remove any particulate matter.
- If presence of interfering substance is suspected, examine by dilution test at more than 2 points.

Storage and stability

Samples should be immediately assayed or stored below -35°C. Defrosted samples should be mixed thoroughly for best results. LH in samples will be inactivated if stored at 2°C - 10°C. If you have to store assay samples for a longer period, snap-freeze samples and keep them below -35°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Sample dilution should be made just before your assay.

11. Preparation of Reagents

- ◆ Bring all reagents of the kit to room temperature (20°C - 25°C) before use.
- ◆ Prepare reagent solutions in appropriate volume for your assay. Do not store the diluted reagents.

[Concentrated reagents]

[(B) Rat LH Standard]

Make a serial dilution of master standard solutions using (C) Buffer to prepare each standard solution.

Volume of standard solution	(C) Buffer	Concentration (ng/mL)
Original solution : 50 μ L	450 μ L	10.0
10 ng/mL solution : 200 μ L	200 μ L	5.0
5 ng/mL solution : 200 μ L	200 μ L	2.5
2.5 ng/mL solution : 200 μ L	200 μ L	1.25
1.25 ng/mL solution : 200 μ L	200 μ L	0.625
0.625 ng/mL solution : 200 μ L	200 μ L	0.313
0 (Blank)	200 μ L	0

[(D) Biotin-conjugated Antibody Solution]

Prepare working solution by dilution of (D) with (C) Buffer to **1 : 100**.

[(E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution]

Prepare working solution by dilution of (E) with (C) Buffer solution to **1 : 100**.

[(I) Wash Solution (10 \times)]

Dilute 1 volume of the concentrated Wash Solution (10 \times) to **10 volume** with deionized water (or distilled water) to prepare working solution. Example : 100 mL of concentrated Wash Solution (10 \times) and 900 mL of deionized water (or distilled water).

12. Assay Procedure

Remove the cover sheet of the Antibody-coated Plate after bringing up to 20 $^{\circ}$ C - 25 $^{\circ}$ C.

- (1) Wash the (A) Antibody-coated Plate by filling the well with 300 μ L of washing buffer and discard 4 times (*①), then strike the plate upside-down onto several layers of paper towels to remove residual buffer in the wells (*⑤).
- (2) Pipette 50 μ L of properly diluted sample to the designated sample wells. (Limit of dilution is 5 \times in standard assay procedure)
- (3) Pipette 50 μ L of standard solution to the wells designated for standards.
- (4) Shake the plate gently on a plate shaker (*②).
- (5) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate for 2 hours at 20 $^{\circ}$ C - 25 $^{\circ}$ C.
- (6) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (7) Pipette 50 μ L of Biotin-conjugated Antibody Solution to all wells, and shake as step (4).
- (8) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate the plate for 1 hour at 20 $^{\circ}$ C - 25 $^{\circ}$ C.
- (9) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (10) Pipette 50 μ L of Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to all wells, and shake as step (4).
- (11) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate the plate for 30 minutes at 20 $^{\circ}$ C - 25 $^{\circ}$ C.
- (12) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (13) Pipette 50 μ L of (F) TMB Solution to wells, and shake as step (4).
- (14) Stick a Plate Seal (*③) on the plate and incubate the plate for 20 minutes at 20 $^{\circ}$ C - 25 $^{\circ}$ C.
- (15) Add 50 μ L of the (H) Stop Solution to all wells and shake as step (4).
- (16) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620 nm (*④)) immediately using a plate reader.

*Refer to 16. Summary of Assay Procedure for notes of *①, *②, *③, *④, and *⑤.

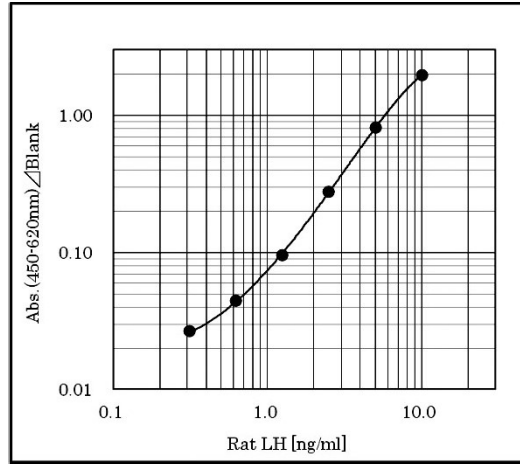
13. Technical Tips

- For manual operation, proficiency in pipetting technique is recommended.
- The reagents are prepared to give accurate results only when used in combination within the same box. Therefore, do not combine the reagents from kits with different lot numbers. Even if the lot number is the same, it is best not to mix the reagents with those that have been preserved for some period.
- Be careful to avoid any contamination of assay samples and reagents. We recommend the use of disposal pipette tips, and 1 tip for 1 well.
- Optimally, the reagent solutions of the kit should be used immediately after reconstitution.
- Time the reaction from the pipetting of the reagent to the first well.
- Prepare a standard curve for each assay.
- Dilution of the assay sample must be carried out using the buffer solution provided in the kit.
- The TMB Solution should be almost clear pale yellow before use. It turns blue during reaction, and gives yellowish color after addition of Stop Solution. Greenish color means incomplete mixing.
- To avoid denaturation of the coated antibody, do not let the plate go dry.
- As the Antibody-coated Plate is module type of 8 wells \times 12 strips, each strip can be separated by cutting the cover sheet with a knife and used independently.
- When ELISA has to be done under the airstream velocity over 0.4 m/sec. and the humidity less than 30%, seal the well plate with a plate seal and place the well plate in an incubator or a styrofoam box in each step of incubation.

14. Calculations

- (1) Prepare a standard curve using semi-logarithmic or two-way logarithmic section paper by plotting absorbance* (Y-axis) against LH concentration (ng/mL) on X-axis.
- (2) Using the standard curve, read the LH concentration of a sample at its absorbance*, and multiply the assay value by dilution factor if the sample has been diluted. Though the assay range is wide enough, in case the absorbance of some samples is higher than that of the highest standard, repeat the assay after proper dilution of samples with (C) Buffer.

* We recommend the use of 3rd order regression curve for log-log plot, or 4 or 5 parameters method for log-normal plot in computer calculation.



Rat LH assay standard curve (an example)

Absorbance may change due to assay situation.

* Absorbance at 450 nm minus absorbance at 620 nm.

15. Trouble Shooting

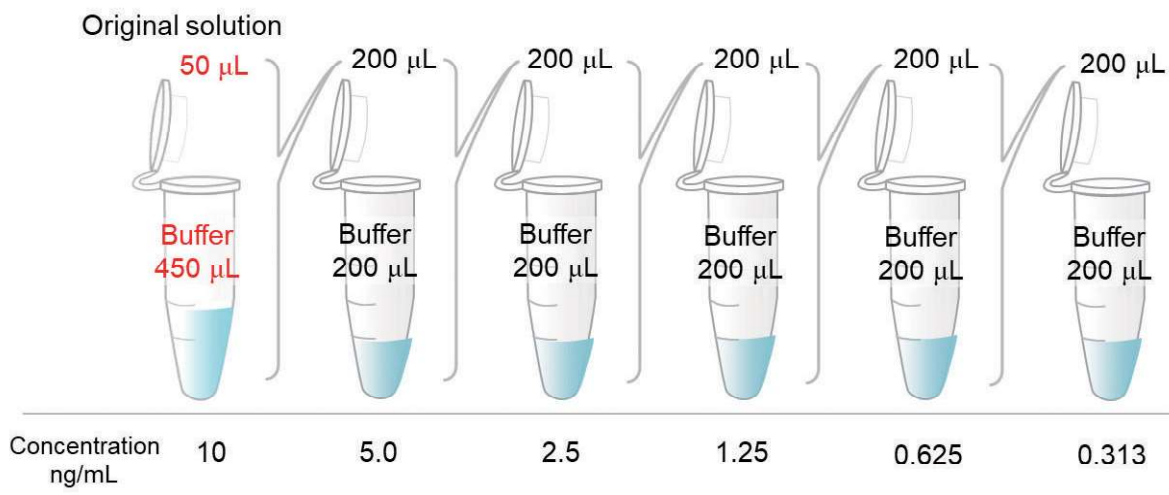
- Low absorbance in all wells
Possible explanations :
 - 1) The standard or samples might not be added.
 - 2) Reagents necessary for coloration such as Biotin-conjugated Antibody Solution, Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution, or TMB Solution might not be added.
 - 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of Biotin-conjugated Antibody Solution or Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution.
 - 4) Contamination of enzyme inhibitor (s).
 - 5) Influence of the temperature under which the kits had been stored.
 - 6) Excessive hard washing of the well plate.
 - 7) Addition of TMB Solution soon after taking out from a refrigerator might cause poor coloration owing to low temperature.
- Intense coloration in all wells including blank
Possible explanations :
 - 1) Improper or inadequate washing. (Change washing frequency from 4 times to 5 - 8 times at the constant stroke after the reaction with Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution.)
 - 2) Overdeveloping. Incubation time with TMB Solution should be decreased before addition of Stop Solution.
 - 3) Too high incubation temperature. Adjust the temperature to 20°C - 25°C.
- High coefficient of variation (CV)
Possible explanation :
 - 1) Improper or inadequate washing.
 - 2) Improper mixing of standard or samples.
 - 3) Pipetting at irregular intervals.
- Q-1 : Can I divide the plate to use it for the other testing?
A-1 : Yes, cut off the clear seal on the plate with cutter along strip. Put the residual plate, which is still the seal on, in a refrigerator soon
- Q-2 : I found there contains liquid in 96 well-plate when I opened the box. What is it?
A-2 : When we manufacture 96 well-plate, we insert preservation stabilizer in wells.

16. Summary of Assay Procedure : Use as a check box

* First, read this instruction manual carefully and start your assay after confirmation of details.

- Bring the (A) Antibody-coated Plate and all reagents to 20°C - 25°C for 2 hours.

- Wash Solution (10×) concentrate must be diluted to **10 times** by deionized water (or distilled water) that returned to 20°C - 25°C.
- Standard LH solution dilution example : Use (C) Buffer returned to 20°C - 25°C.



- Sample dilution-1 : Dilute rat sample to 2× using (G) Buffer for Sample, mix and let it stand still for 10 minutes at 20°C - 25°C.
- Sample dilution-2 : Dilute the above prepared sample to 2.5× using (C) Buffer returned to 20°C - 25°C.

- Antibody-coated Plate
- ↓ Washing 4 times (*①), (*⑤)
- Properly diluted Samples /Standards 50 µL
- ↓ Shaking (*②), Incubation for 2 hours at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- Dilute (D) Biotin-conjugated Antibody Solution to 1 : 100 with (C) Buffer returned to 20°C - 25°C. Dilute reagents during the first reaction.
- ↓ Washing 4 times (*①), (*⑤)
- Biotin-conjugated Antibody Solution 50 µL
- ↓ Shaking (*②), Incubation for 1 hour at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- Dilute (E) Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution to 1 : 100 with (C) Buffer returned to 20°C - 25°C. Dilute reagents during the second reaction.
- ↓ Washing 4 times (*①), (*⑤)
- Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution 50 µL
- ↓ Shaking (*②), Incubation for 30 minutes at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- ↓ Washing 4 times (*①), (*⑤)
- TMB Solution 50 µL
After dispense, the color turns to blue depending on the concentration
- ↓ Shaking (*②), Incubation for 20 minutes at 20°C - 25°C. (Standing (*③))
- Stop Solution 50 µL
After dispense, 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 to wells, lightly shake the plate on your palm for 10 seconds and remove the buffer. Guideline of washing volume : 300 µL/well for an automatic washer and for a pipette if the washing buffer is added by pipette. In case of washing by using 8 channel pipette, sometimes the back ground tends to be high. If so, change washing frequency from 4 times to 5 - 8 times at the constant stroke after the reaction with Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution.

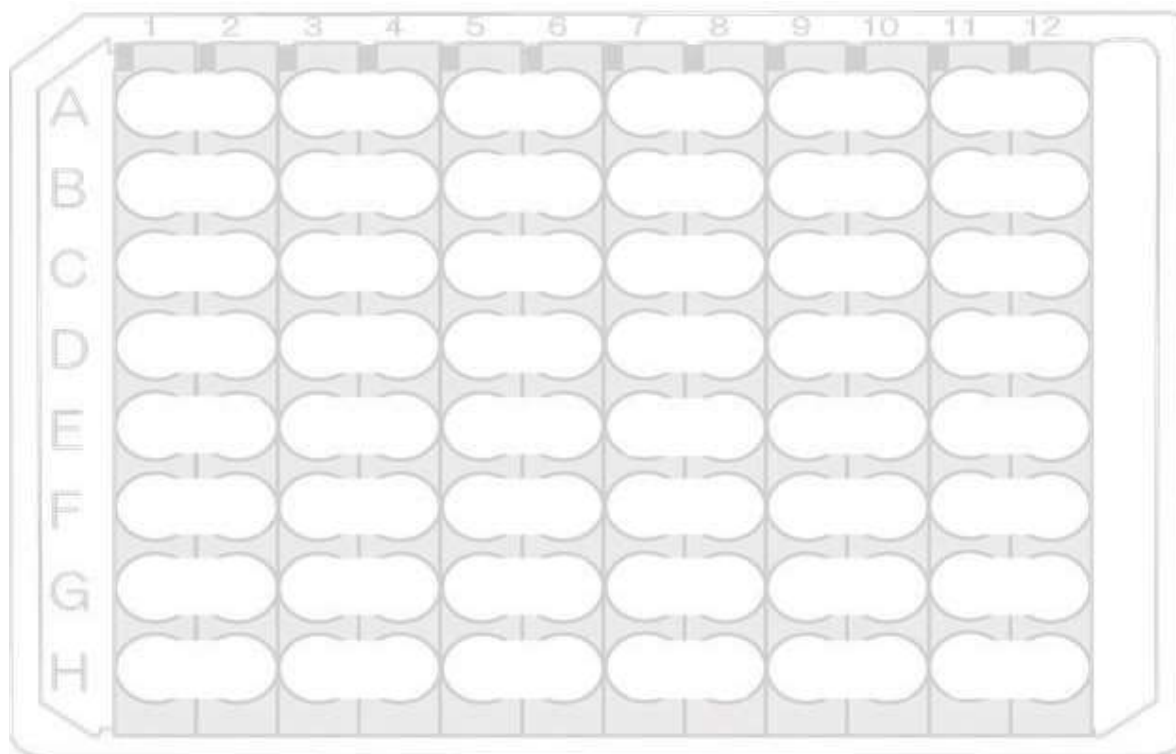
Standard of plate-washing pressure : 5 mL/min - 25 mL/min. (Adjust it depending on the nozzle's diameter.)

- *② Guideline of shaking : 600 rpm - 1200 rpm 3 times for 10 seconds.
- *③ Seal the plate during the reaction after shaking. Peel off the protective paper from the seal and stick the seal on the plate. Do not reuse the plate seal used once.
- *④ 600 nm - 650 nm can be used as reference wavelength.
- *⑤ After removal of wash buffer, immediately dispense the next reagent.

Worksheet Example

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	10 ng/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
B	5 ng/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
C	2.5 ng/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
D	1.25 ng/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
E	0.625 ng/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
F	0.313 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

Assay Worksheet



17. Storage and Expiration

The complete kit is stored at 2°C - 10°C (Do not freeze). Opened reagents should be used as soon as possible to avoid loss in optimal assay performance caused by storage environment.

LBIS™ Rat LH ELISA Kit

[Storage] Store at 2 - 10°C (Do not freeze).

[Expiration date] Indicated on the label

[Package] For 96 tests

[Cat #] 294-88501

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 Bollwood 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

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

レビス™ ラット LH ELISA キット

1. イントロダクション

LH は下垂体前葉（腺下垂体）の好塩基性性腺刺激ホルモン産生細胞（ゴナドトロフ）で FSH と共に産生、貯蔵され、視床下部ホルモン LHRH の刺激で分泌されます。精巣にも LH 様の物質が存在するという報告があります。動物種における分布は魚類－哺乳類の全脊椎動物に及びます。ラット下垂体での LH の含量は、雄では 6～7 μg/gland、雌では 3～4 μg/gland (NIH-LH1 S1 換算) と雄のほうが多く、雌では性周期に伴い変動します。

LH は分子量：約 29000 の糖蛋白質で、TSH、FSH と共通の α-サブユニットと、LH 特有の β-サブユニットからなるヘテロダイマーです。

LH の標的器官は、雌では卵胞の成熟顆粒膜細胞で、FSH と協力して卵胞の成熟とエストロゲン産生、排卵を誘発し、排卵後黄体化した後はプロゲステロン産生分泌を促進します。雄では精巣の間質細胞 (Leydig 細胞) でアンドロゲン産生分泌促進、アンドロゲンを介し 2 次的に精子形成促進に関与します。受容体は膜 7 回貫通 - G 蛋白共役型 PKA 系です。従って LH が不足すると性ステロイド分泌低下、間質細胞萎縮、排卵黄体化停止などが起こり、過剰状態では精巣間質細胞肥大とそれに続く萎縮、エストロゲン、アンドロゲンの分泌増大、早発過排、性成熟促進等が起こります。

LH の分泌は GnRH (LHRH) によって直接的に促進され、生理状態としては血中性ステロイドの低下 (間接、直接)、性周期による変動 (特に排卵前期)、更年期－閉経後に分泌は増大します。男性でも加齢によって増加します。発情前期に大量に分泌されるエストロゲンは、ポジティブフィードバックにより LHRH を介して LH の一過性大量分泌 (LH サージ) を引き起こし、排卵を誘起します。LH の分泌は血中性ステロイドの増加 (間接、直接)、オピオイドペプチド特に β-エンドルフィン、幼小児期、妊娠時、産褥期などで抑制されます。

本キットはラット LH (Luteinizing 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

- ・全反応時間は 3 時間 50 分です。
- ・ラット血清または血漿 (抗凝固剤は EDTA-2Na; 最終濃度 1.0mg/mL をお勧めします) 中の LH を測定します。ヘパリン Na 血漿の使用はできません。
- ・微量な検体 (標準操作法は 10 μL) で測定可能です。
- ・1 キットは 96 ウェルです。
- ・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、希釈調製済み検体を抗 LH 抗体固相化マイクロプレートウェル中でインキュベートします。2 時間のインキュベーションと洗浄後、ビオチン結合抗 LH 抗体を加え捕捉された LH とともに 1 時間インキュベートします。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。再度の洗浄後、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 LH 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
0.313ng/mL ~ 10ng/mL の範囲で測定できます (5 倍希釈時の実効測定範囲は 1.565ng/mL ~ 50ng/mL)。
- ・特異性
この ELISA 系で使用されている抗体はラット LH に対して特異的なモノクローナル抗体です。
- ・精度試験 (アッセイ内変動) (8 重測定、2 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、3 検体、4 日間) 平均 C.V. 値は 10% 未満
- ・添加回収試験
2 検体血清に異なる 3 濃度の LH を添加し測定した結果、回収率は 95.1% から 106%
- ・希釈直線性
2 検体血清を連続的に緩衝液で 3 段階希釈し測定した結果、直線回帰の R² は 0.999

4. 参考値

ラット LH 測定値：平均 1.74ng/mL、SD 0.33ng/mL (最大値：2.39ng/mL / 最小値 1.17ng/mL)

亜種：CD (SD)、雄、7 週齢、10 匹、血清、絶食後採血

※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ます。詳細はお問い合わせ下さい。
- ・有機溶媒は測定値に影響を与えます。
- ・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℃～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、または指導者の方のご使用下さい。用手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、保護着用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) Antibody-coated Plate 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12) / 1 枚
(B) Rat LH Standard ラット LH 標準溶液	希釈後使用	200 μL / 1 本
(C) Buffer 緩衝液	そのまま使用	60mL / 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	12mL / 1 本
(G) Buffer for Sample 検体用緩衝液	そのまま使用	12mL / 1 本
(H) Stop Solution 反応停止液	そのまま使用	12mL / 1 本
(I) Wash Solution (10×) 洗浄液 (10×)	希釈後使用	100mL / 1 本
(J) Plate Seal 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（冷蔵状態でシールを剥がしていない状態）の抗体固相化ストリップは同梱のジップシールバックに戻し、そのまま 2℃～10℃で保存して下さい。

(B) ラット LH 標準溶液、(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確実に閉め、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。

(C) 緩衝液、(F) TMB 溶液、及び (G) 検体用緩衝液

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、必要量より少し多めの量を別の容器に移し残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋を確実に閉め、2℃～10℃で保存して下さい。使用残りの希釈済み溶液は廃棄して下さい。

(H) 反応停止液

使用残りを保存する際は、蓋を確実に閉め、2℃～10℃保存で保存して下さい。

(I) 洗浄液 (10×)

洗浄液 (10×) を保存する際は、蓋を確実に閉め、2℃～10℃保存で保存して下さい。使用残りの希釈済み溶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 を正確にピペッティングできるもの、及び 10 μL ~ 100 μL、100 μL ~ 500 μL を正確にピペ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 □パータオール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) または噴射ペン □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 LH を測定します。

- ・検体は定法に従って採取し直ぐに測定するか、または -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。
- ・ラット血清 (血漿) を (G) 検体用緩衝液で 2 倍に希釈します。攪拌し、室温で 10 分間静置後、(C) 緩衝液でさらに 2.5 倍希釈した希釈液を測定に用いて下さい。最終希釈倍率 (5 倍) の希釈液を 50 μL / ウェル分注します。なお、検体の状態が良好な場合は最終希釈倍率の限界は 2.5 倍になります。その場合には (G) 検体希釈用緩衝液で 2 倍に希釈し、攪拌後室温で 10 分間静置し、(C) 緩衝液で更に 1.25 倍希釈して下さい。
- ・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。ヘパリン Na 血漿の使用はできません。他の抗凝固剤についてはお問い合わせ下さい。
- ※血液成分の影響 (高脂質・溶血等) を抑制する為に最終希釈倍率は 5 倍での測定をお勧めします。最終希釈倍率が 5 倍の場合でも原検体中の脂質 (乳び)、溶血が高い場合は異常値発生の原因となりますので測定に使用しないで下さい。
- ・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使用して下さい。
- ・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。
- ・検体の希釈調製はあらかじめ試験管 (PP、PE、ガラス製) 等で希釈する事をお勧めします。

【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℃ 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℃ ~ 25℃) 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】

(B) ラット LH 標準溶液；標準曲線作成用

(B) ラット LH 標準溶液 (原液：100ng/mL) 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。

標準溶液の容量	(C) 緩衝液	濃度 (ng/mL)
標準溶液原液 50 μL	450 μL	10
10ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	5.0
5.0ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	2.5
2.5ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	1.25
1.25ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	0.625
0.625ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	0.313
0 (Blank)	200 μL	0

(D) ビオチン結合抗体溶液

100 μ L 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** 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 μ L 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** 希釈して下さい。

(I) 洗浄液 (10 \times)

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

例：100mL の洗浄液 (10 \times) + 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、プレートが十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、希釈調製した検体を 50 μ L ずつ分注します (標準操作法では最終希釈倍率は 5 倍になります)。
 - (3) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 50 μ 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 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ 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) 各ウェルにビオチン結合抗体溶液を 50 μ 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 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ 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) 各ウェルにペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を 50 μ 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します。
 - (11) プレートシールを貼り、室温 (20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ 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 50 μ 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) プレートシールを貼り、室温 (20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) で 20 分間静置 (*③) します。
 - (15) 各ウェルに (H) 反応停止液を 50 μ 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

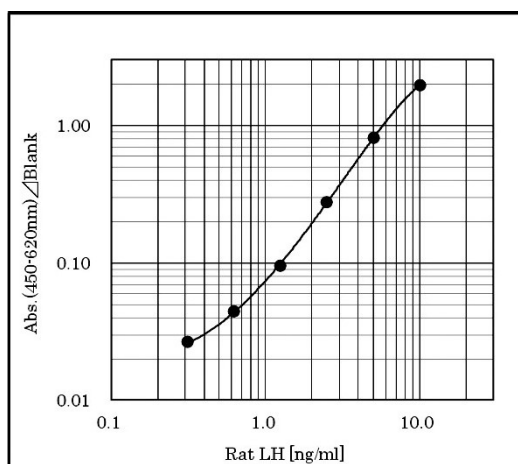
- (1) 測定毎に標準曲線を作成します。両対数を使用し X 軸を標準溶液濃度 (ng/mL)、Y 軸を吸光度の標準曲線グラフを作成して下さい。
- (2) 標準曲線より、検体の吸光度に対応する濃度 (ng/mL) を読み取ります。読み取った濃度に検体希釈率 (標準操作法では 5 倍) を乗じ測定値とします。

* 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。

* 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)。

* プレートリーダーは SUNRISE RAINBOW (TECAN) を使用



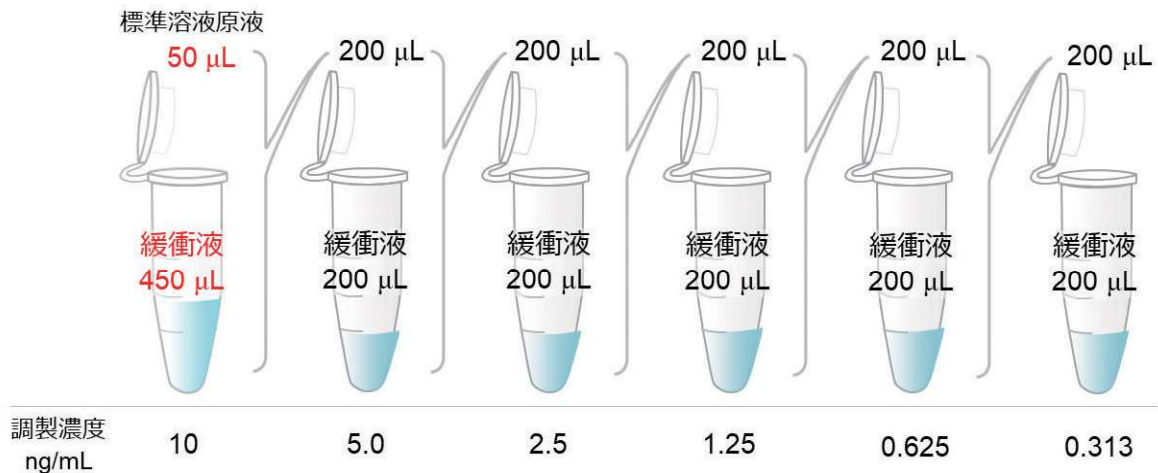
12. トラブルシューティングと Q&A

- 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（0.313ng/mL）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。
原因として考えられること
洗浄が不適當、不完全であった。
(ペルオキシダーゼ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。)
- 変動係数 (CV) が大きい
原因として考えられること
 - 1) 洗浄が不適當、不完全であった。
 - 2) 標準品や管理血清、または検体の攪拌が不充分であった（凍結検体の攪拌は充分に行ってください）。
 - 3) ピペティング操作が一定ではなかった。
- Q-1: キットは分割して使用することができますか？
A-1: できます。プレートに貼られた透明シールをストリップの間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あります。

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ください。

- 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
- (I) 洗浄液（10×）の希釈：室温化された精製水で、10 倍に希釈して下さい。
- 標準溶液の希釈（例）：室温化された（C）緩衝液で、希釈して下さい。



- 検体希釈 -1: 室温化した（G）検体用緩衝液で検体を 2 倍に希釈し 10 分間静置して下さい。
- 検体希釈 -2: 室温化した（C）緩衝液で検体希釈 -1 を 2.5 倍に希釈して下さい。

各操作注意事項並びに関連情報

- 抗体固相化プレート
- ↓洗淨 4 回 (洗淨液除去後、直ちに次の試薬分注) *①
- 希釈調製済み検体 (検体希釈 -2) または標準溶液 50 μL
- ↓攪拌、室温 (20℃～25℃)、2 時間反応、静置 *②*③
- (D) ビオチン結合抗体溶液の希釈。室温化された (C) 緩衝液で **100 倍** に希釈して下さい。
希釈溶液の調製は第一反応中に行う。
- ↓洗淨 4 回 (洗淨液除去後、直ちに次の試薬分注) *①
- ビオチン結合抗体溶液 50 μL
- ↓攪拌、室温 (20℃～25℃)、1 時間反応、静置 *②*③
- (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。室温化された (C) 緩衝液で、**100 倍** に希釈して下さい。
希釈溶液の調製は第二反応中に行う。
- ↓洗淨 4 回 (洗淨液除去後、直ちに次の試薬分注) *①
- ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液 50 μL
- ↓攪拌、室温 (20℃～25℃)、30 分間反応、静置 *②*③
- ↓洗淨 4 回 (洗淨液除去後、直ちに TMB 溶液分注) *①
- TMB 溶液 50 μL
分注後、濃度により青色に変色 **TMB が室温化されていることを確認**
- ↓攪拌、室温 (20℃～25℃)、20 分間反応、静置 *②*③
- 反応停止液 50 μL
分注後、濃度により黄褐色に変色 **強酸性につき取扱注意**
- ↓攪拌 (直ちに攪拌) *②
- 直ちに吸光度測定 (主波長 450nm、副波長 620nm : 600nm ~ 650nm)
副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします

(*①) 洗淨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 回連続洗淨後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗淨液を完全に除去します。洗淨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。洗淨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 (0.313ng/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淨回数 4 回を同じ流速で 5 回～8 回に増やして下さい。プレート洗淨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淨のみウェル間のコンタミに注意して下さい。

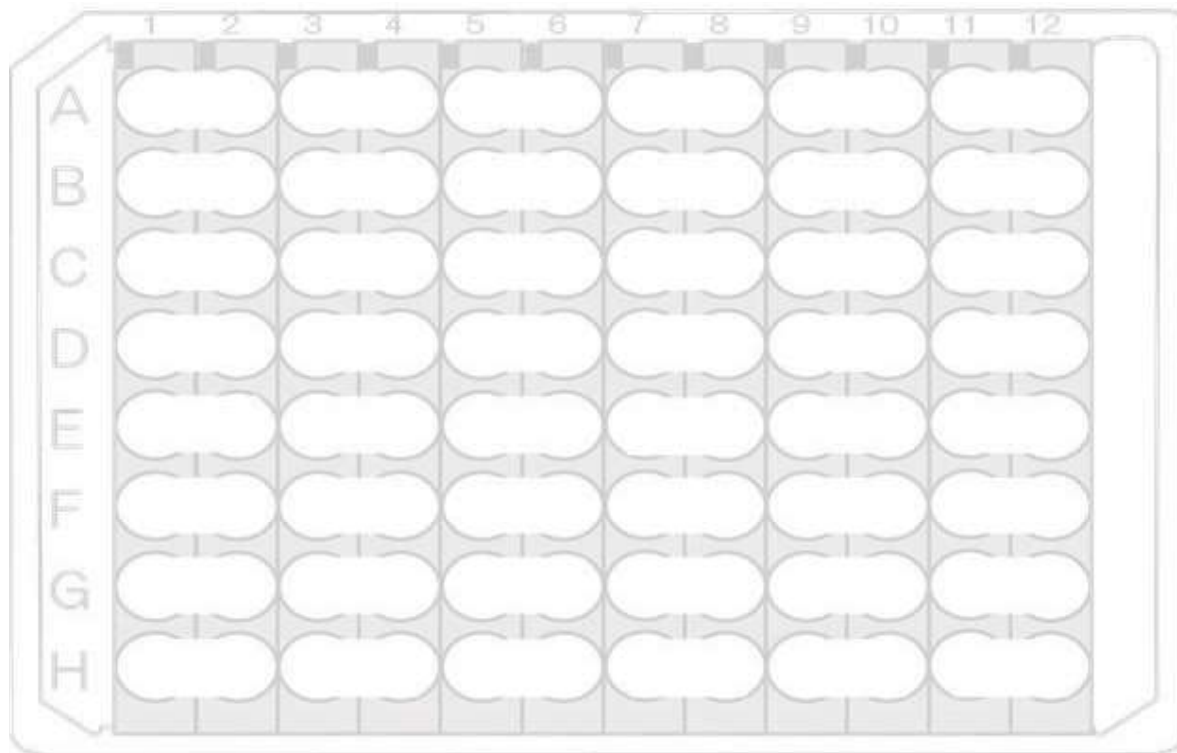
(*②) 攪拌の目安は 600rpm ~ 1200rpm-10 秒間、3 回。

(*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	10ng/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
B	5.0ng/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
C	2.5ng/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
D	1.25ng/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
E	0.625ng/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
F	0.313ng/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



14. キットの保存と使用期限

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™ ラット LH ELISA キット
 【和光コード】 294-88501
 【英語表記】 LBIS™ Rat LH ELISA Kit
 【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