

LBIS™ Rat KLH-IgG ELISA Kit (TDAR)

Please, read this instruction carefully before use.

1. Intended use

LBIS™ Rat KLH-IgG ELISA Kit (TDAR) is a sandwich ELISA system for measurement of IgG-type anti-KLH (Keyhole limpet hemocyanin) antibody after inoculation of KLH to rat with high sensitivity. This is helpful in examining TDAR (T-cell dependent antibody reaction) in combination with LBIS™ Rat KLH-IgM ELISA Kit (TDAR). This is intended for research use only.

2. Introduction

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements of Registration of Pharmaceuticals for Human Use) issues a guideline "Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals S8" in 2005. In the guideline, TDAR (T cell Dependent Antibody Reaction) is recommended in case target of a pharmaceutical's immunotoxicity is not identified. It says "The TDAR should be performed using a recognized T-cell dependent antigen (e.g., sheep red blood cells (SRBC) or keyhole limpet hemocyanin (KLH) that results in a robust antibody response". In this study, the production of IgM-type antibody caused by the primary response to e.g., KLH, and IgG-type antibody production by "class-switch" following the secondary response are tested. This kit makes it possible to measure IgG-type anti-KLH antibody in rat blood samples, and most suitable for TDAR test when used in combination with LBIS™ Rat KLH-IgM ELISA Kit (TDAR).

3. Assay Principle

In LBIS™ Rat KLH-IgG ELISA Kit (TDAR), standards or samples are incubated in KLH coated wells to capture anti-KLH antibody. After 1 hour incubation and washing, HRP (horse radish peroxidase)-conjugated anti-rat IgG antibody is added and incubated for 1 hour together with captured anti-KLH-IgG. After washing, HRP-complex remaining in wells is 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 nearly proportional to anti-KLH-IgG concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against the standard concentrations. Anti-KLH-IgG concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

4. Performance Characteristics

- Assay Range
The assay range of the kit is 0.47 ng/mL - 30 ng/mL.
- Specificity
The Peroxidase-conjugated Antibody of this kit is specific to anti-rat IgG.
The cross-reactivity with anti-rat IgM is less than the detection limit.
- Precision of Assay
Within assay variation (2 samples, 5 replicates assay), the mean CV was less than 10%.
- Reproducibility
Between assay variation (3 samples, 4 days, 4 replicates assay), the mean CV was less than 10%
- Recovery Test
Standard anti-KLH rat IgG was added in 3 concentrations to 2 serum samples and were assayed. The recoveries were 95.5% - 101%
- Dilution Test
2 serum samples were serially diluted by 3 steps.
The dilution curves showed linearity with $R^2 = 0.999$.

5. 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.
- Wear gloves and goggles and clothing-protection when handling the Stop Solution (sulfuric acid) and the chromogen (hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine). Be careful not to allow the reagent solutions of the kit to touch the skin, eyes and mucous membrane. The Stop Solution and TMB Solution may cause skin/eyes irritation. In case of contact with these, wash the place thoroughly with enough water and seek medical attention if necessary.

- The materials must not be pipetted by mouth.
- Residual 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%.

6. Reagents supplied

Components	Use Status	Amount
(A) Antigen-coated Plate	Use after washing	96 wells/1 plate
(B) Anti-KLH Rat IgG Standard	Concentrated. Use after dilution.	200 μ L/1 bottle
(C) Buffer	Ready for use.	100 mL/1 bottle
(D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution	Concentrated. Use after dilution.	100 μ 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 \times)	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle
Plate Seal	–	3 sheets

【Storage and Stability】

[(A) Antigen-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) Anti-KLH Rat IgG Standard (300 ng/mL)]

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

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

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) Peroxidase-conjugated Antibody Solution]

Unused working solution (already diluted) should be disposed. The rest of the undiluted solution stored tightly closed at 2°C - 10°C.

[(H) Stop Solution]

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

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

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

7. Equipments 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 washing buffer (a graduated cylinder, a bottle)
- Pipettes (disposable tip type). One should be able to deliver 10 μ L - 20 μ L precisely, and another for 50 μ L - 500 μ L.
- Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipipette 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 - 1,200 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.

8. Preparation of Samples

This kit is intended to measure IgG-type anti-KLH (Keyhole limpet hemocyanin) antibody in rat serum or plasma. The necessary sample volume for the standard procedure is 10 μ L. Samples should be immediately assayed or stored below -35°C for several days. Defrosted samples should be mixed thoroughly for best results. Don't repeat freeze and thaw.

Hemolytic and hyperlipemic samples are not suitable.

***To avoid influence of blood (high lipid or hemolysis, etc.), if your original samples have heavy chyle or hemolysis, do not use them for assay. Abnormal value might be obtained with hemolysis above 160 mg/dL with this kit.**

If presence of interfering substance is suspected, examine by dilution test at more than 2 points. Turbid samples or those containing insoluble materials should be centrifuged before testing to remove any particulate matter.

Make sure to dilute samples more than 1 : 500 to avoid any nonspecific reaction. Recommended dilution rate is 1 : 500 - 50,000 depending on the antibody titer. Dilution should be carried out with the buffer solution of the kit using small test tubes before assay so as to be within the standard curve range. Dilution rate should be different depending on the immune or sampling conditions.

Example of dilution:	Rate	(50×)	500×	5,000×	50,000×
Sample (μL)	10	20*	20*	20*	20*
Buffer (μL)	490	180	180	180	180

*One rank lower diluted sample

Storage and Stability

Sample is stable at 2°C - 10°C within a week. If you have to store assay samples for a longer period, snap-freeze samples and keep them below -35°C. Avoid repeated freezing and thawing cycles.

9. 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) Anti-KLH Rat IgG Standard (300 ng/mL)]

Make a serial dilution of original standard solution to prepare each standard solution. Example is shown below.

Volume of standard solution	(C) Buffer	Concentration (ng/mL)
Original solution : 50 μL	450 μL	30
30 ng/mL solution : 200 μL	200 μL	15
15 ng/mL solution : 200 μL	200 μL	7.5
7.5 ng/mL solution : 200 μL	200 μL	3.75
3.75 ng/mL solution : 200 μL	200 μL	1.88
1.88 ng/mL solution : 200 μL	200 μL	0.94
0.94 ng/mL solution : 200 μL	200 μL	0.47
0 (Blank)	200 μL	0

[(D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution]

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

[(I) Wash Solution (10×)]

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

10. Assay Procedure

Remove the cover sheet of the 96 well-plate after bringing up to room temperature.

- (1) Wash the (A) Antigen-coated Plate by filling the well with washing buffer and discard 3 times (*①), then strike the plate upside-down onto several layers of paper towels to remove residual buffer in the wells.
- (2) Pipette 50 μL of standards or diluted samples to the wells designated for each.
- (3) Shake the plate gently on a plate shaker (*②).
- (4) Stick a Plate Seal on the plate and incubate for 1 hour at 20°C - 25°C (*③).
- (5) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1) (*①).
- (6) Pipette 50 μL of (D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution to all wells, and shake as step (3) (*②).
- (7) Stick a Plate Seal on the plate and incubate the plate for 1 hour at 20°C - 25°C (*③).
- (8) Discard the reaction mixture. Rinse wells as step (1) (*①).
- (9) Pipette 50 μL of (F) TMB Solution to wells, and shake as step (3) (*②).
- (10) Stick a Plate Seal on the plate and incubate the plate for 20 minutes at 20°C - 25°C (*③).
- (11) Add 50 μL of the (H) Stop Solution to all wells and shake as step (3) (*②).

(12) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620 nm : 600 nm - 650 nm can be used as reference wavelength.) immediately using a plate reader.

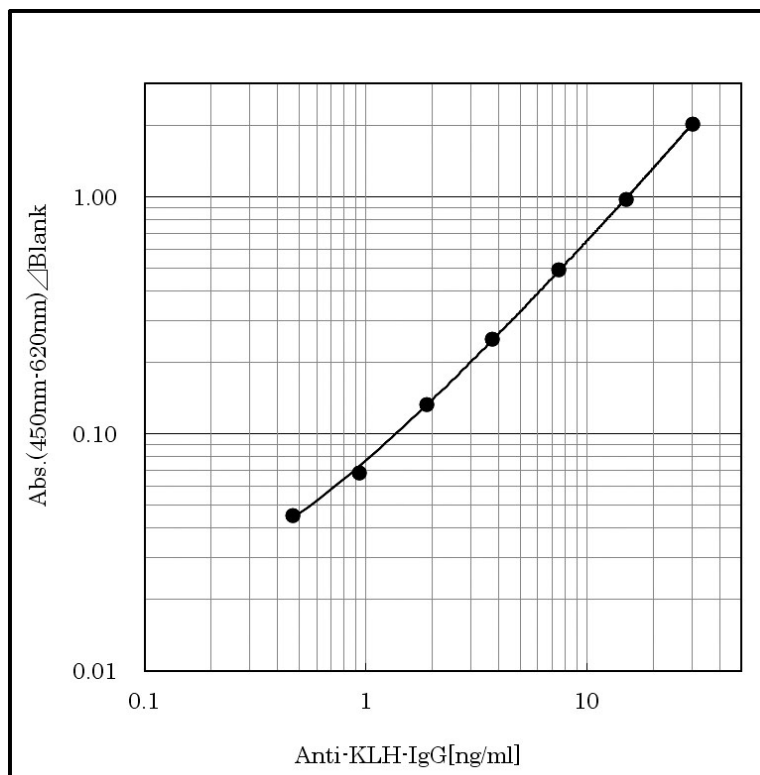
* Refer to 14. Summary of Assay Procedure for notes of *①, *② and *③.

11. Technical Tips

- In 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. Otherwise, store them in a dark place at 2°C - 10°C.
- 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 colorless 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 KLH, do not let the plate go dry.
- As the Antigen-coated Plate is module type of 8 wells × 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.

12. Calculations

- (1) Prepare a standard curve using a two-way logarithmic section paper by plotting absorbance* (Y-axis) against Anti-KLH-IgG concentration (ng/mL) on X-axis.
 - (2) Using the standard curve, read the Anti-KLH-IgG concentration of a sample at its absorbance*, and multiply the assay value by dilution factor. Though the assay range is wide enough, in case the absorbance of some samples is higher than that of the highest standard, please repeat the assay after proper dilution of samples with the buffer solution.
- * We recommend the use of 3rd order regression curve for log-log plot, or 4 parameters or 5 parameters method for log-normal plot in computer calculation.



Anti-KLH Rat IgG assay standard curve (an example)
Absorbance may change due to assay situation.

13. 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 Peroxidase-conjugated Antibody Solution or TMB Solution might not be added.
- 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of Peroxidase-conjugated Antibody 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.

- Blank OD was higher than that of the lowest standard concentration (0.47 ng/mL).

Possible explanations :

Improper or inadequate washing. (Change washing frequency from 3 times to 4 - 6 times at the constant stroke after the reaction with Peroxidase-conjugated Antibody Solution.)

- High coefficient of variation (CV)

Possible explanations :

- 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

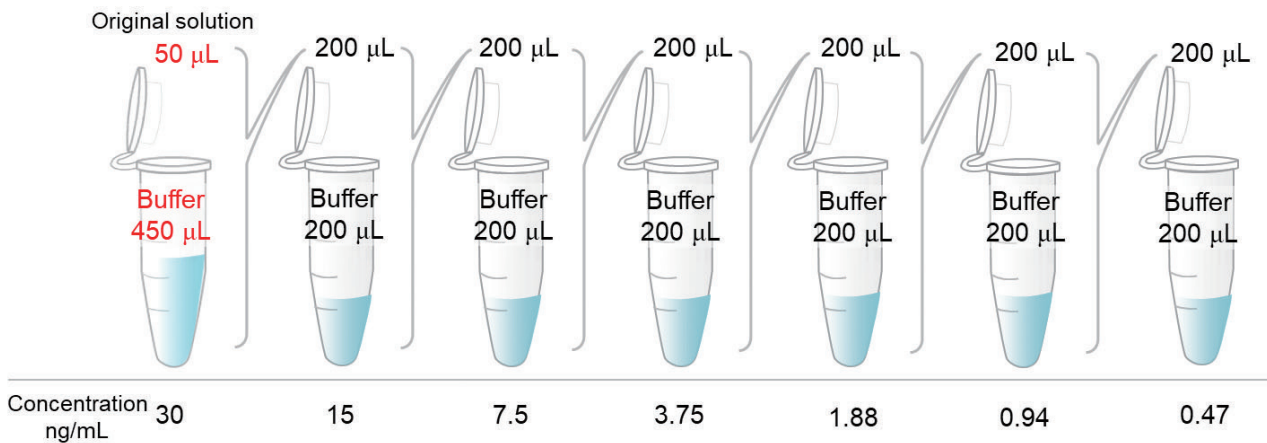
- Q-2 : I found there contains liquid in 96 well-plate when I opened the box. What is it?

A-2 : When we manufacture 96 well-plate, we insert preservation stabilizer in wells.

14. 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 well-plate and all reagents to **20°C - 25°C for 2 hours**.
- (I) Wash Solution (10×) must be diluted to **10 times** by purified water.
- Standard solution dilution example :



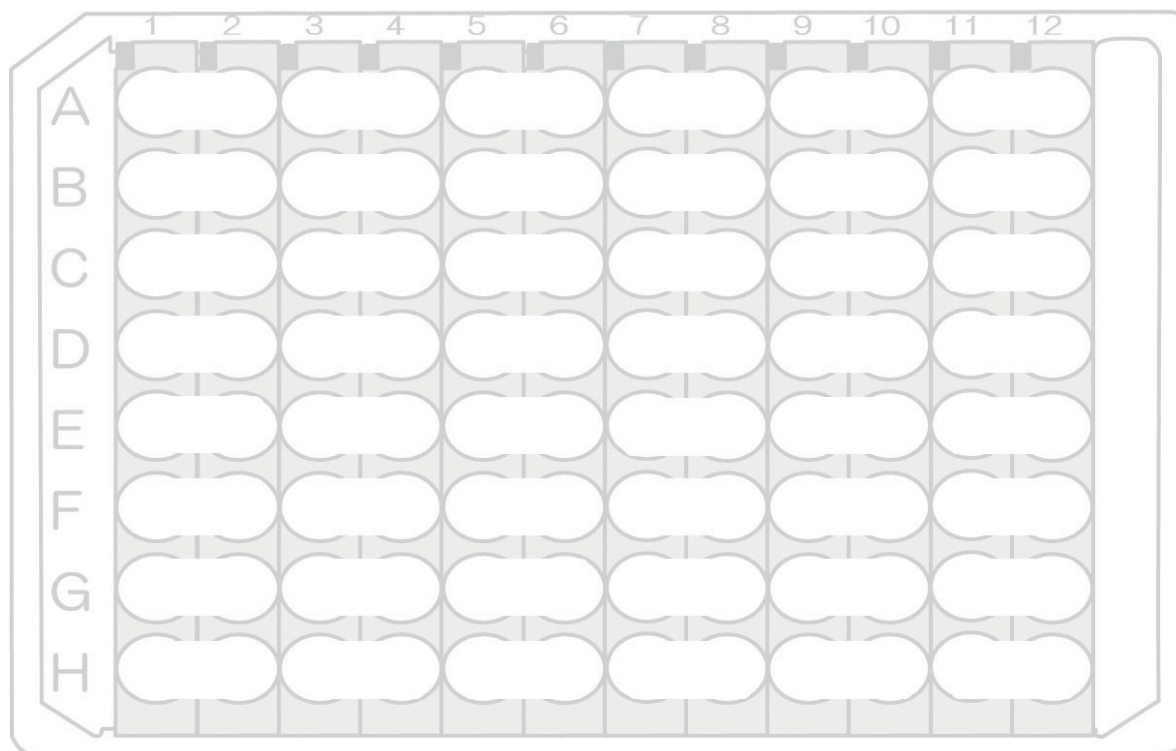
- Antigen-coated Plate
- ↓ Washing 3 times (After removal of wash buffer, immediately dispense the next reagent.) *①
- Diluted Samples / Standards 50 μ L
- ↓ Shaking, Incubation for 1 hour at 20°C - 25°C (Standing) *②*③
- Meanwhile, Dilute (D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution to **1 : 100** with (C) Buffer returned to 20°C - 25°C.
- ↓ Washing 3 times (After removal of wash buffer, immediately dispense the next reagent.) *①
- Peroxidase-conjugated Antibody Solution 50 μ L
- ↓ Shaking, Incubation for 1 hour at 20°C - 25°C (Standing) *②*③
- ↓ Washing 3 times (After removal of wash buffer, immediately dispense the next reagent.) *①
- TMB Solution 50 μ L
(After dispense, the color turns to blue depending on the concentration.)
- ↓ Shaking, Incubation for 20 min at 20°C - 25°C (Standing) *②*③
- Stop Solution 50 μ L
(After dispense, the color turns to yellow depending on the concentration.)
- ↓ Shaking (Immediately shake) *②
- Measurement of absorbance (450 nm, Ref 620 nm : 600 nm - 650 nm) immediately using a plate reader.
(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 sec and remove the buffer. Guideline of washing volume : 300 μ L/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 3 times to 4 - 6 times at the constant stroke after the reaction with Peroxidase-conjugated Antibody 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 - 1,200 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.

Worksheet Example

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	30 ng/mL	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
B	15 ng/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
C	7.5 ng/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
D	3.75 ng/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
E	1.88 ng/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
F	0.94 ng/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
G	0.47 ng/mL	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39
H	0 (Blank)	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32	Sample 40

Assay Worksheet



15. Storage and Expiration

The intact kit is stored at 2°C - 10°C. Reagents, once opened, should be used as soon as possible to avoid losing its optimal assay performance by storage environment.

LBIS™ Rat KLH-IgG ELISA Kit (TDAR)

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

[Expiration date] Indicated on the container

[Package] For 96 tests

[Cat #] 291-91201

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://ffwk.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 : + 49-2131-31100
<http://www.wako-chemicals.de>

レビス™ラット 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。本キットはラット血液中の 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™ラット KLH-IgM ELISA キット (TDAR) と併せてご使用下さい。

本キットはラット抗 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。
- ・ラット血清または血漿中のラット抗 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 KLH 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。1 時間のインキュベーションと洗浄後、ペルオキシダーゼ結合抗ラット IgG 抗体を加え、捕捉されたラット抗 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。吸光度はラット抗 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
ラット抗 KLH-IgG 抗体価を 0.47ng/mL ~ 30ng/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ラット IgG に対して特異的です。
ラット 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) (5 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
血清 2 検体に異なる 3 濃度のラット抗 KLH-IgG 抗体を添加し測定した結果、回収率は 95.5% から 101% でした。
- ・希釈直線性
血清 2 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. 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。
- ・発色液は 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。

5. 構成品

構成品	状態	容量
(A) Antigen-coated Plate 抗原固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12) / 1枚
(B) Anti-KLH Rat IgG Standard 抗KLHラットIgG標準品	希釈後使用	200 μ L / 1本
(C) Buffer 緩衝液	そのまま使用	100mL / 1本
(D) Peroxidase-conjugated Antibody Solution ペルオキシダーゼ結合抗体溶液	希釈後使用	100 μ L / 1本
(F) TMB Solution TMB溶液	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
Plate Seal 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ラットIgG標準品 (300ng/mL)

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

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・ピッカー・瓶）
- チップ交換型ピペット（使い捨てチップで10 μ L～20 μ Lを正確にピペティングできるもの、及び50 μ L～500 μ Lを正確にピペティングできるもの）
- 連続分注ピペット（例Eppendorfのmultipette plus）、50 μ 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 ~ 1,200rpm）
- 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

本キットはラット血清または血漿中のラット抗 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脂質（乳ビ）・溶血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 160mg/dL 以上で影響が現れます。

- ・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 500 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 500 ~ 50,000 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	ブレ希釈 (50 倍)	500倍	5,000倍	50,000倍
検体(μL)	10	20*	20*	20*
緩衝液(μL)	490	180	180	180

註) *ひとつ低倍率側の希釈検体

【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

- *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 ラット IgG 標準品 (300ng/mL) ; 標準曲線作成用

(B) 抗 KLH ラット IgG 標準品 (300ng/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	(C) 緩衝液	濃度 (ng/mL)
標準品原液 50 μL	450 μL	30
30ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	15
15ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	7.5
7.5ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	3.75
3.75ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	1.88
1.88ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	0.94
0.94ng/mL 溶液 200 μL	200 μL	0.47
0 (Blank)	200 μL	0

(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 (I) 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。

(A) 抗原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、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 μ 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 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 (H) ペルオキシダーゼ結合抗体を 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 (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。
- (11) 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。
- (12) 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。
- (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。

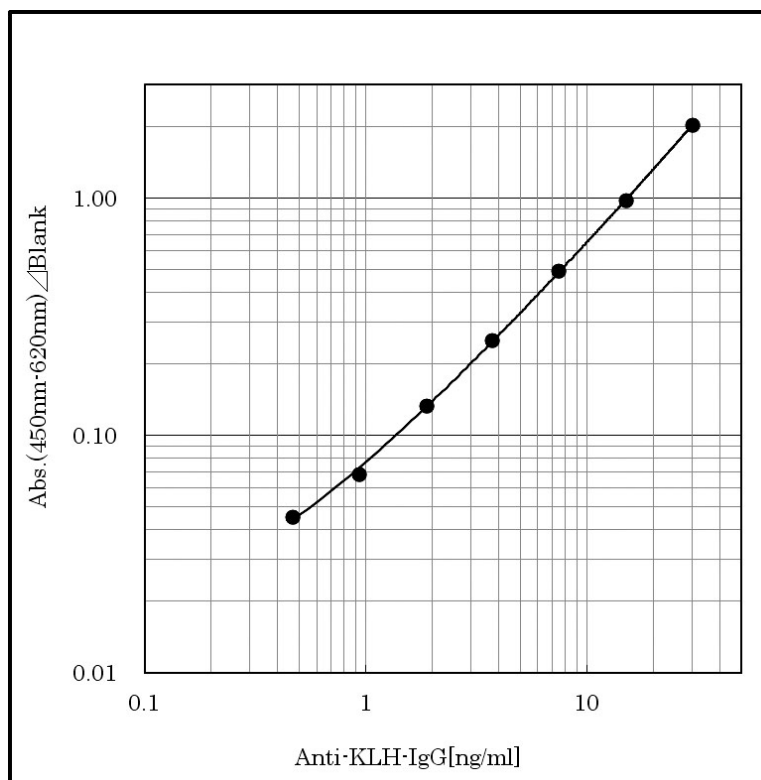
10. 計算

- (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 (C) 緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定することをお薦め致します。

* 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)。

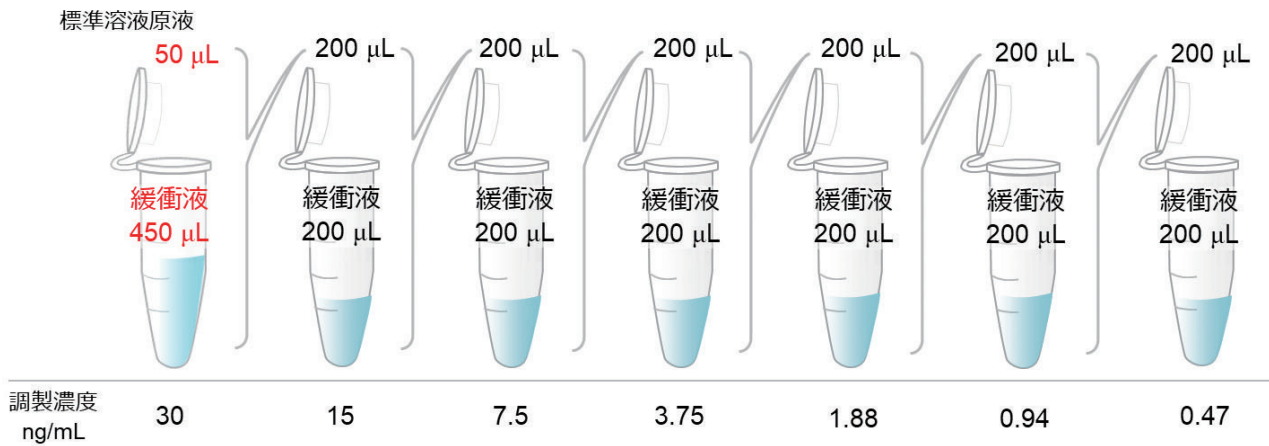
11. トラブルシューティングと Q&A

- 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) 発色液の温度が低かった。
- 最小標準溶液濃度（0.47ng/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抗体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下さい）。
 - 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。

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。

- 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。
- 標準溶液の希釈（例）：室温化された（C）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

- 抗原固相化プレート
- ↓洗淨 3 回 (洗淨液除去後、直ちに次の試薬分注) *①
- 希釈検体または抗 KLH ラット IgG 標準品 50 μL
- ↓攪拌、室温 (20℃～25℃)、1 時間反応、静置 *②*③
- (D) ペルオキシダーゼ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 3 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抗体溶液 50 μL
- ↓攪拌、室温 (20℃～25℃)、1 時間反応、静置 *②*③
- ↓洗淨 3 回 (洗淨液除去後、直ちに次の試薬分注) *①
- TMB 溶液 **TMB が室温化されていることを確認** 50 μL
分注後、濃度により青色に変色
- ↓攪拌、室温 (20℃～25℃)、20 分間反応、静置 *②*③
- 反応停止液 **強酸性につき取扱注意** 50 μL
分注後、濃度により黄褐色に変色
- ↓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。3 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。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。

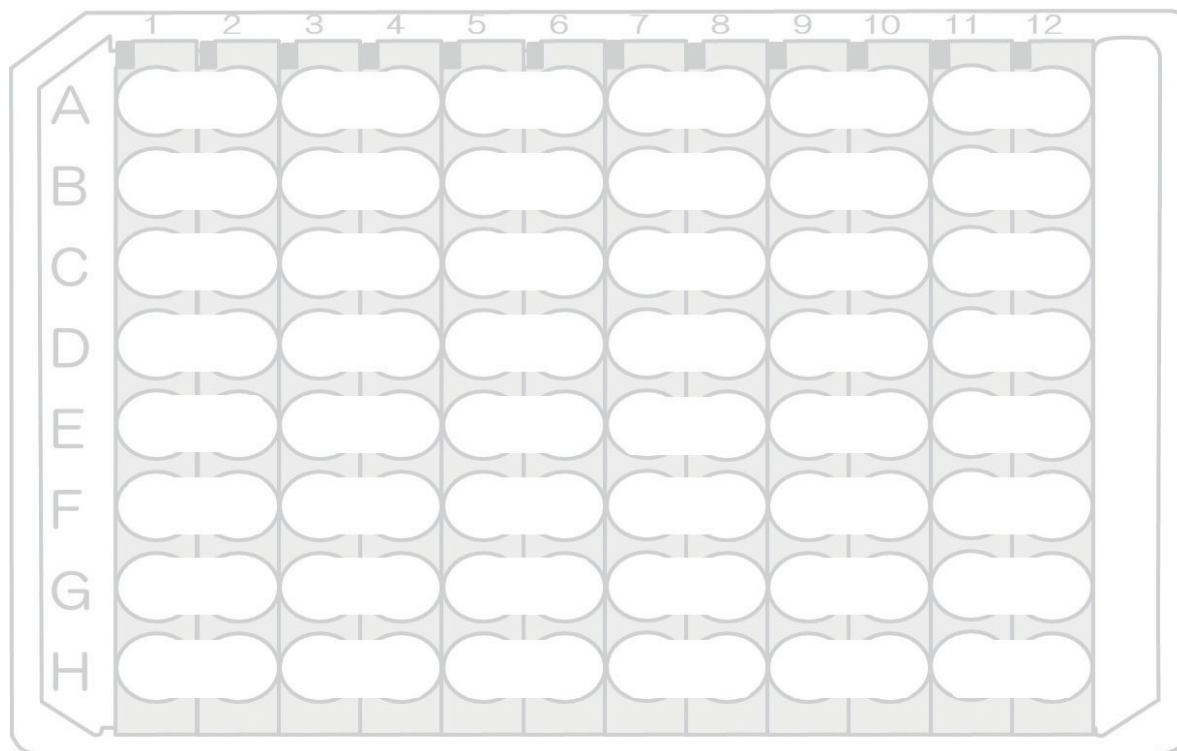
(*②) 攪拌の目安は 600rpm ~ 1,200rpm-10 秒間、3 回。

(*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	30ng/mL	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	15ng/mL	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	7.5ng/mL	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	3.75ng/mL	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	1.88ng/mL	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	0.94ng/mL	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	0.47ng/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

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 KLH-IgG ELISA キット (TDAR)

【和光コード】 291-91201

【英語表記】 LBIS™ Rat 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

大阪府中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741