

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedure.

May.10. 2022. Ver. JE1

## [LBIS KLH (TDAR) Rat-IgM ELISA Kit]

Cat # 639-13761 (Manufacture # AKRKM-010)

Please, read this instruction carefully before use.

This kit is manufactured by FUJIFILM Wako Shibayagi Corporation. Use only the current version of Instruction Manual enclosed with the kit!

### 1. Intended use

LBIS KLH (TDAR) Rat-IgM ELISA Kit is a sandwich ELISA system for measurement of IgM-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 KLH (TDAR) Rat-IgG ELISA Kit. This is intended for research use only.

### 2. Storage and expiration

When the intact kit is stored at 2 °C - 8 °C, the kit is stable until the expiration date shown on the label on the container. Reagents, once opened, should be used as soon as possible to avoid losing its optimal assay performance by storage environment.

### 3. 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 IgM-type anti-KLH antibody in rat blood samples, and most suitable for TDAR test when used in combination with LBIS KLH (TDAR) Rat-IgG ELISA kit.

### 4. Assay principle

In Shibayagi's LBIS KLH (TDAR) Rat-IgM ELISA Kit, 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 IgM antibody is added and incubated for 1 hour together with captured anti-KLH-IgM. 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-IgM concentration. The standard curve is prepared by plotting absorbance against the standard concentrations. Anti-KLH-IgM concentrations in unknown samples are determined using this standard curve.

### 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 chromogen (TMB) 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. ① (including wind from air conditioner), and humidity less than 30 %. ①For airstream, refer to our web site.

## 6. Reagents supplied

Components	State	Amount
(A) KLH-coated plate	Use after washing	96 wells/1 plate
(B) Standard anti-KLH rat IgM solution (1000 ng/mL) (derived from rat)	Concentrated. Use after dilution	200 µL/1 vial
(C) Buffer solution	Ready for use.	100 mL/1 bottle
(D) HRP-conjugated anti-rat IgM antibody	Concentrated. Use after dilution.	100 µL/1 vial
(F) Chromogen (TMB)	Ready for use.	12 mL/1 bottle
(H) Stop solution <b>Be careful!</b>	Ready for use.	12 mL/1 bottle
( I ) Wash stock solution (10×)	Concentrated. Use after dilution.	100 mL/1 bottle
Plate seal	—	3 sheets
Instruction Manual		1 copy

## 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 µL - 20 µL precisely, and another for 50 µL - 500 µL.  Syringe-type repeating dispenser like Eppendorf multipette plus which can dispense 50 µL.
- 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 ± 10 nm, 620 nm: 600 nm -650 nm)
- Software for data analysis.

## 8. 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) Standard anti-KLH rat IgM solution (1000 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 solution	Concentration (ng/mL)
Original solution : 100 µL	400 µL	200
200 ng/mL solution : 200 µL	200 µL	100
100 ng/mL solution : 200 µL	200 µL	50
50 ng/mL solution : 200 µL	200 µL	25
25 ng/mL solution : 200 µL	200 µL	12.5
12.5 ng/mL solution : 200 µL	200 µL	6.25
6.25 ng/mL solution : 200 µL	200 µL	3.13
0 (Blank)	200 µL	0

[(D) HRP-conjugated anti-rat IgM antibody]

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

[( I ) Wash stock solution (10×)]

## LBIS KLH (TDAR) Rat-IgM ELISA Kit (#AKRKM-010)

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

### **【Storage and stability】**

[(A) KLH-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 2-8 °C. The strip will be stable until expiration date.

[(B) Standard anti-KLH rat IgM solution (1000 ng/mL)]

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

[(C) Buffer solution] and [(F) Chromogen (TMB)]

If not opened, store at 2 °C - 8 °C. It maintains stability until expiration date. Once opened, we recommend using them as soon as possible to avoid influence by environmental condition.

[(D) HRP-conjugated anti-rat IgM antibody]

Unused working solution (already diluted) should be disposed. The rest of the undiluted solution will be stable until expiration date if stored tightly closed at 2 °C - 8 °C.

[(H) Stop solution]

Close the stopper tightly and store at 2 °C - 8 °C. It maintains stability until expiration date.

[( I ) Wash stock solution (10×)]

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

### **9. 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 - 8 °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 chromogen (TMB) 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 KLH-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.

### **10. Preparation of samples**

This kit is intended to measure IgM-type anti-KLH (Keyhole limpet hemocyanin) antibody in rat serum or plasma. The necessary sample volume for the standard procedure is 10 µL. 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 200× to avoid any nonspecific reaction. Recommended dilution rate is 200-20000× 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	(20×)	200×	2000×	20000×
Sample (μL)		10	20*	20*	20*
Buffer (μL)		190	180	180	180

\*One rank lower diluted sample

#### Storage and stability

Sample is stable at 2 °C - 8 °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.

#### **11. Assay procedure**

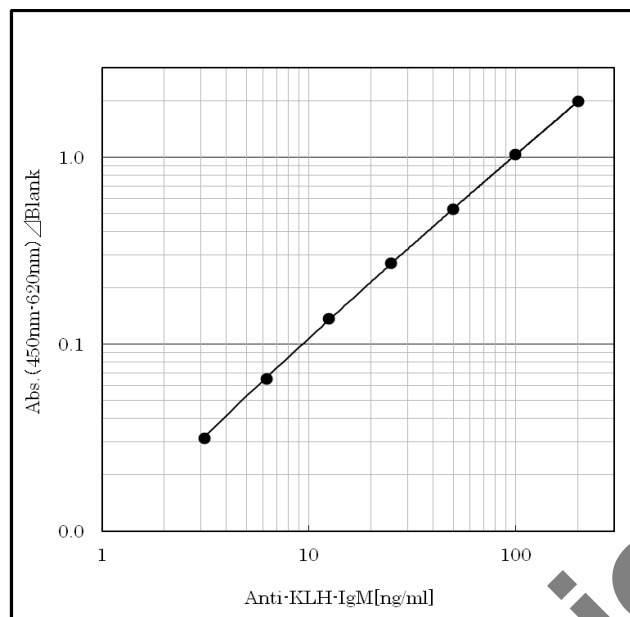
Remove the cover sheet of the 96 well-plate after bringing up to room temperature.

- (1) Wash the KLH-coated plate (A) by filling the well with washing buffer and discard 3 times(\*②), 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 (\*③).
- (4) Stick a plate seal (\*④) on the plate and incubate for 1 hour at 20 °C - 25 °C.
- (5) Discard the reaction mixture and rinse wells as step (1).
- (6) Pipette 50 μL of HRP-conjugated anti-rat IgM antibody (D) to all wells, and shake as step (3).
- (7) Stick a plate seal (\*④) on the plate and incubate the plate for 1 hour at 20 °C - 25 °C.
- (8) Discard the reaction mixture. Rinse wells as step (1).
- (9) Pipette 50 μL of chromogen (TMB) (F) to wells, and shake as step (3).
- (10) Stick a plate seal (\*④) on the plate and incubate the plate for 20 minutes at 20 °C - 25 °C.
- (11) Add 50 μL of the stop solution (H) to all wells and shake as step (3).
- (12) Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength, 620 nm\*) immediately using a plate reader.

\*Refer to the page 7 for notes of \*②, \*③ and \*④.

#### **12. Calculations**

- (1) Prepare a standard curve using a two-way logarithmic section paper by plotting absorbance\* (Y-axis) against KLH IgM concentration (ng/mL) on X-axis. Physiological or pathological situation of animals should be judged comprehensively taking other examination results into consideration.
- (2) Using the standard curve, read the KLH IgM 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.



KLH rat IgM assay standard curve (an example)  
Absorbance may change due to assay situation.

### 13. Performance characteristics

- Assay range

The assay range of the kit is 3.13 ng/mL - 200 ng/mL.

- Specificity

The HRP-conjugated anti-rat IgM antibody of this kit is specific to anti-rat IgM.

The cross-reactivity with anti-rat IgG is less than the detection limit.

- Precision of assay

Within assay variation (2 samples, 5 replicates assay), the mean CV was within 10 %.

- Reproducibility

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

- Recovery test

Standard anti-KLH rat IgM was added in 3 concentrations to 2 serum samples and were assayed. The recoveries were 94.8 % - 102 %

- Dilution test

2 serum samples were serially diluted by 3 steps.

The dilution curves showed linearity with  $R^2 = 0.998 \sim 0.999$ .

### 14. 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 HRP-conjugated anti-rat IgM antibody or TMB might not be added.
- 3) Wrong reagents related to coloration might have been added. Wrong dilution of HRP-conjugated anti-rat IgM antibody.
- 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 chromogen (TMB) 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 (3.13 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 HRP-conjugated anti-rat IgM antibody.)

- 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?

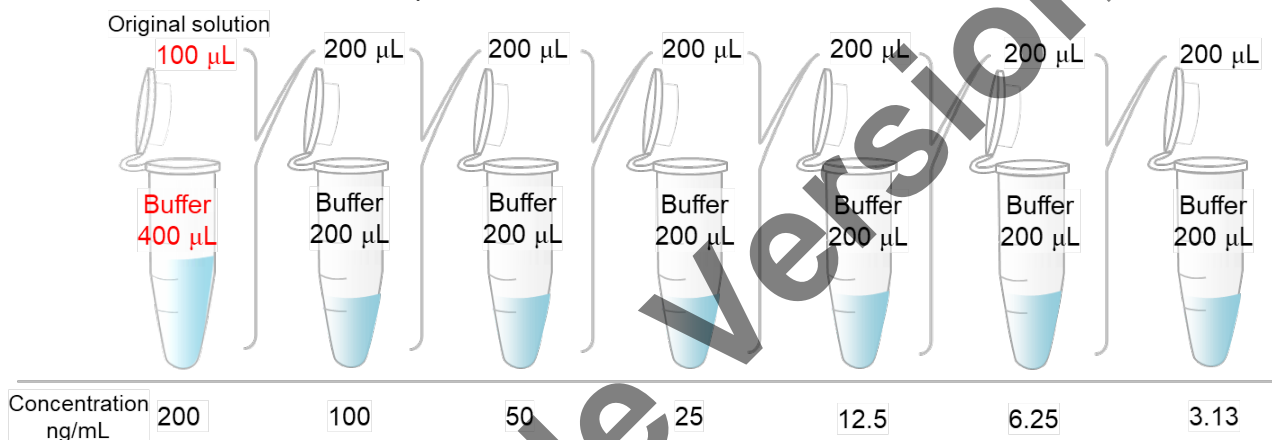
A-2: When we manufacture 96 well-plate, we insert preservation stabilizer in wells.

**Summary of assay procedure**  : Use as a check box

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

For more details, watch our web movie [ELISA by MOVIE] on our website.

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



<input type="checkbox"/> KLH-coated plate		
<input type="checkbox"/> ↓Washing 3 times(*②)		*⑥
<input type="checkbox"/> Diluted Samples / Standards	50 µL	
<input type="checkbox"/> ↓Shaking(*③), Incubation for 1 hour at 20 °C - 25 °C (Standing***)		
<input type="checkbox"/> Meanwhile, Dilute HRP-conjugated anti-rat IgM antibody (D) to <b>100×</b> with Buffer (C) returned to 20 °C - 25 °C.		
<input type="checkbox"/> ↓Washing 3 times(*②)		*⑥
<input type="checkbox"/> HRP-conjugated anti-rat IgM antibody	50 µL	
<input type="checkbox"/> ↓Shaking(*③), Incubation for 1 hour at 20 °C - 25 °C (Standing(*④))		
<input type="checkbox"/> ↓Washing 3 times(*②)		*⑥
<input type="checkbox"/> Chromogen (TMB) (After dispense, the color turns to blue depending on the concentration.)	50 µL	
<input type="checkbox"/> ↓Shaking(*③), Incubation for 20 min at 20 °C - 25 °C (Standing(*④))		
<input type="checkbox"/> Stop solution (After dispense, the color turns to yellow depending on the concentration.)	50 µL	
<input type="checkbox"/> ↓Shaking(*③) (Immediately shake)		
<input type="checkbox"/> Measurement of absorbance (450 nm, Ref 620 nm(*⑤)) immediately using a plate reader. (Ref. wave cancels the dirt in the back of plate.)		

\*②After dispensing wash buffer to wells, lightly shake the plate on your palm for 10 sec 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 3 times to 4-6 times at the constant stroke after the reaction with HRP conjugated streptavidin.

LBIS KLH (TDAR) Rat-IgM ELISA Kit (#AKRKM-010)

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

\*③ Guideline of shaking: 600 rpm - 1200 rpm for 10 seconds × 3 times.

\*④ 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.

\*⑤ 600-650 nm can be used as reference wavelength.

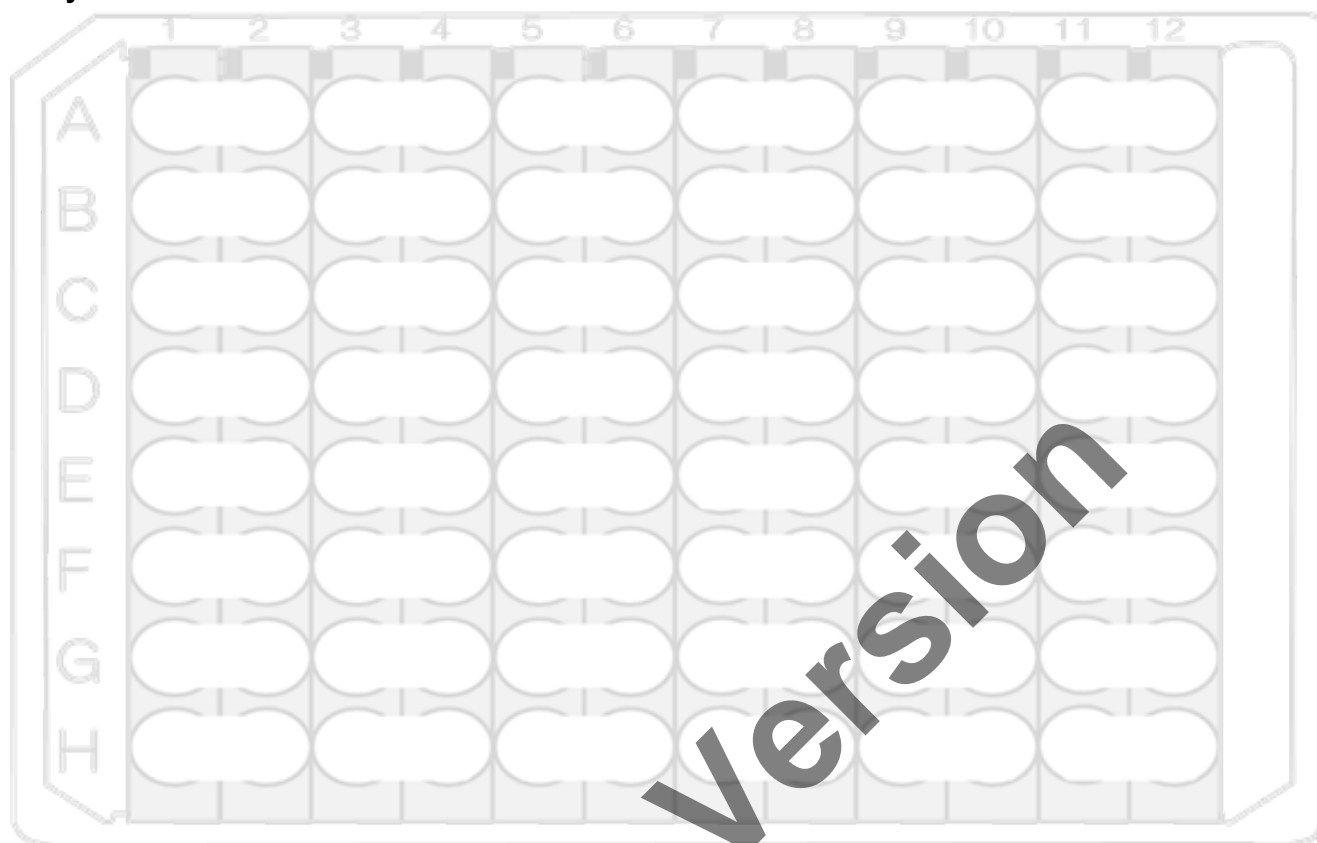
\*⑥ After removal of wash buffer, immediately dispense the next reagent.

**Worksheet example**

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	200 ng/mL	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
B	100 ng/mL	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
C	50 ng/mL	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
D	25 ng/mL	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
E	12.5 ng/mL	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
F	6.25 ng/mL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
G	3.13 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

Example Version

**Assay worksheet**



LBIS KLH (TDAR) Rat-IgM ELISA Kit

[Storage condition] Store the kit at 2 °C - 8 °C (Do not freeze).

[Term of validity] Expiration date is indicated on the container.

[Manufacture #] AKRKM-010

[Cat #] 639-13761

This kit is  
manufactured by

**FUJIFILM Wako Shibayagi Corporation**

1062-1 Ishihara, Shibukawa, Gunma, 377-0007, Japan

TEL.+81-279(25)0279, FAX.+81-279(23)0313

<E-mail> wksb-info@fujifilm.com

<URL> <https://www.fujifilm.com/wksb/en>

distributed by

**FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation**



## 研究用試薬

2022年5月10日改訂

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書に従って測定を実施してください。なお、操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント (動画)]、並びに[Q&A]をご参照ください。また、本キットを初めてご使用になられる場合は後述の「◆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」をご確認の上ご使用ください。

## 『レビス® KLH(TDAR)ラット-IgM ELISA Kit』取扱説明書

## 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IgM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。抗 KLH-IgG測定キットと併せてご使用ください。

本キットはラット抗 KLH (Keyhole limpet hemocyanin)-IgM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ください。

## ◆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-IgM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、HRP (ペルオキシダーゼ) 結合抗ラット IgM抗体を加え、捕捉されたラット抗KLH-IgM抗体とともに1時間インキュベートします。再度の洗浄後、ウェルに残ったHRPを発色液(TMB)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 450 nm (副波長620 nm) で比色測定されます。吸光度はラット抗 KLH-IgM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.キットの保存と使用期限

キットは2℃～8℃で保存してください(凍結厳禁)。この保存条件下でキットは外箱のラベルに記載された有効期限内安定です。有効期限の過ぎた試薬は使用しないでください。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。

## 4.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 10μL～20 μLを正確にピペティングできるもの、及び 50 μL～500 μL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 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 rpm～1200 rpm)
- 96ウェルプレート用洗浄機 (あれば好ましい) または噴射ピン
- 96ウェルプレートリーダー(450 ± 10 nm、620 nm : 600 nm～650 nm)
- データ計算用ソフトウェア

## 5. 構成品

構成品	状態	容量
(A) KLH-coated plate KLH固相化96ウェルプレート	洗浄後使用	96 wells(8×12)/1枚
(B) Standard anti-KLH rat IgM solution (1000 ng/mL) 抗KLHラットIgM標準溶液(1000 ng/mL)	希釈後使用	200 µL/1本
(C) Buffer solution 緩衝液	そのまま使用	100 mL/1本
(D) HRP-conjugated anti-rat IgM antibody HRP結合抗ラットIgM抗体	希釈後使用	100 µL/1本
(F) Chromogen (TMB) 発色液 (TMB)	そのまま使用	12 mL/1本
(H) Stop solution 反応停止液	<b>Be careful!</b> 取扱注意	そのまま使用 12 mL/1本
(I) Wash stock solution (10×) 濃縮洗浄液 (10×)	希釈後使用	100 mL/1本
Plate seal プレートシール		3枚
Instruction Manual 取扱説明書		1部

## 6. 試薬の調製

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

## 【濃縮された試薬類】

## [(B) Standard anti-KLH rat IgM solution (1000 ng/mL)]; 標準曲線作成用

(B) Standard anti-KLH rat IgM solution (1000 ng/mL) (原液) と(C) Buffer solutionを使って標準溶液を調製してください。下記は一例です。

標準溶液の容量	(C) Buffer solution	濃度(ng/mL)
標準溶液原液 100 µL	400 µL	200
200 ng/mL溶液 200 µL	200 µL	100
100 ng/mL溶液 200 µL	200 µL	50
50 ng/mL溶液 200 µL	200 µL	25
25 ng/mL溶液 200 µL	200 µL	12.5
12.5 ng/mL溶液 200 µL	200 µL	6.25
6.25 ng/mL溶液 200 µL	200 µL	3.13
0 (Blank)	200 µL	0

## [(D) HRP-conjugated anti-rat IgM antibody ]

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) Buffer solutionで **100 倍**に希釈してください。

## [(I) Wash stock solution (10×)]

濃縮洗浄液(10×)を室温化された精製水(蒸留水)で **10 倍**に希釈してください。

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

## 【試薬の安定性と保存方法】

## (A) KLH-coated plate

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℃~8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

## (B) Standard anti-KLH rat IgM solution (1000 ng/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℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないでください。

**(C) Buffer solution及び(F) Chromogen (TMB)**

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℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

**(D) HRP-conjugated anti-rat IgM antibody**

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℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄してください。

**(H) Stop solution**

使用残りを保存する場合は蓋をしっかりと閉め、2℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

**(I) Wash stock solution (10×)**

濃縮洗浄液(10×)を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2℃～8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄してください。

**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-IgM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ください。凍結した検体は測定する直前に解凍し十分に攪拌してください。繰り返しの凍結融解は避けてください。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ください。

※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ください。本キットの場合、溶血は160 mg/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ください。血清分離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ください。

●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ください。

●非特異反応を回避するため、**検体は必ず200倍以上に希釈してください**。抗体価により異なりますが検体希釈目安は200～20000倍です。標準曲線内に入るよう希釈調製してください。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ください。

検体希釈の一例	ブレ希釈 (20倍)	200倍	2000倍	20000倍
検体(μL)	10	20*	20*	20*
緩衝液(μL)	190	180	180	180

註) \*ひとつ低倍率の希釈検体

**【検体の安定性と保存方法】**

検体は採取後すぐに測定するか、1週間以内に測定する場合は2℃～8℃で保存してください。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ください。

**8.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ください。

KLH 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ください。

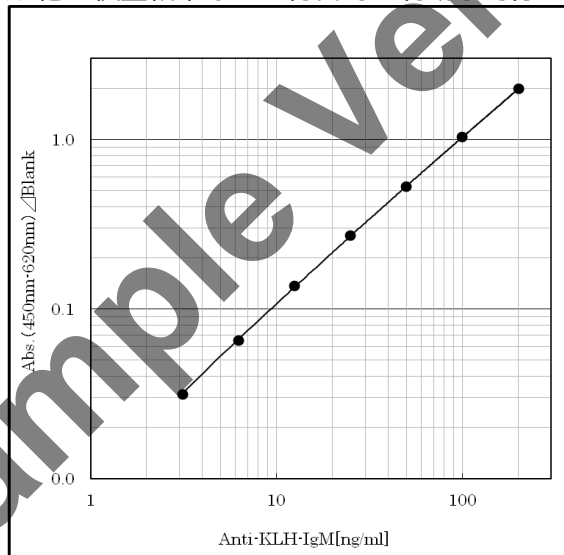
- (1) あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし、3回洗浄(\*①)します。その後、ペーパータオルなどでプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
- (2) 検体測定ウェルに希釈調製済み検体を50μLずつ分注します。
- (3) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を50μLずつ分注します。
- (4) マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(\*②)します。
- (5) プレートシールを貼り、室温(20℃～25℃)で1時間静置(\*③)します。
- (6) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし、3回洗浄(\*①)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
- (7) 各ウェルにHRP 結合抗ラットIgM抗体を50μLずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用

いて攪拌(\*②)します。

- (8) プレートシールを貼り、室温(20℃～25℃)で1時間静置(\*③)します。
  - (9) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし3回洗浄(\*①)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
  - (10) 各ウェルに発色液を50μLずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(\*②)します。
  - (11) プレートシールを貼り、室温(20℃～25℃)で20分間静置(\*③)します。
  - (12) 各ウェルに反応停止液を50μL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)測定手順概要(14ページ)をご参照ください。

### 9.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ください。標準曲線は弊社Webサイト「技術情報」「ELISAの標準曲線」をご参照ください。
  - (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) Buffer solutionにて適当倍率に調製し再度測定を実施してください。
- \* 一番高濃度の標準溶液の吸光度付近の検体は緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定することをお勧め致します。
- \* 演算処理では、3次多項式または4または5パラメーターの使用をお勧め致します。
- \* ラットの臨床所見は臨床症状や他の検査結果などを総合的に判断して行う事が必要です。



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)。

### 10.キットの性能

- 測定範囲  
ラット抗 KLH-IgM 抗体価を 3.13 ng/mL～200 ng/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 HRP 結合抗ラット IgM 抗体はラット IgM に対して特異的です。ラット IgG 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  
2血清検体に異なる3濃度のラット抗 KLH-IgM 抗体を添加し測定した結果、回収率は94.8%から102%
- 希釈直線性  
2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<sup>2</sup> は0.998と0.999

### 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  
可能な解釈  
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(3.13 ng/mL)の OD 値よりblank OD 値が高くなる。

可能な解釈

洗浄が不適當、不完全であった。

(ペルオキシダーゼ・アビジン結合物と反応後の洗浄回数 3 回を同じ流速で 4回~6回に増やしてください。)

- 変動係数(CV)が大きい

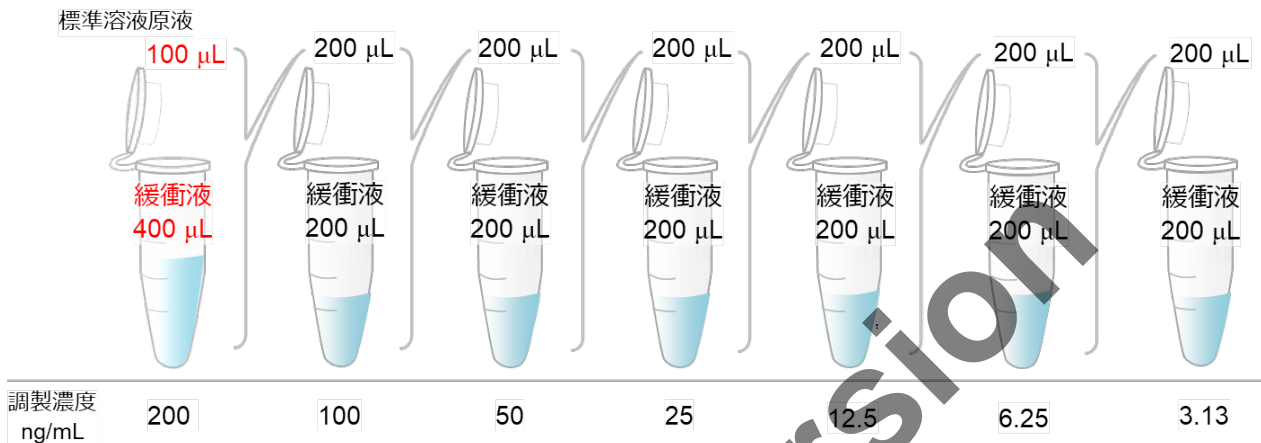
可能な解釈

- 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ください。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ください。
  - 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。
  - 更に詳しいトラブルシューティングやQ&A は弊社ホームページをご覧ください。

【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。  
 操作法は弊社Webサイト[良い結果を出すためのポイント（動画）]並びに「Q&A」をご参照ください。

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



各操作注意事項並びに関連情報

<input type="checkbox"/> KLH固相化96ウェルプレート		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄3回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> 希釈検体または抗KLHラットIgM標準溶液	50 µL	* ④
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、1時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> HRP結合抗ラットIgM抗体の希釈。室温化された緩衝液で、 <b>100倍</b> に希釈してください。希釈溶液の調製は第一反応中に行う。		
<input type="checkbox"/> ↓洗浄3回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> HRP結合抗ラットIgM抗体	50 µL	* ④
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、1時間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> ↓洗浄3回 (洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注)		* ①
<input type="checkbox"/> 発色液(TMB) 分注後、濃度により青色に変色 <b>TMBが室温化されていることを確認</b>	50 µL	* ④
<input type="checkbox"/> ↓攪拌、室温(20℃～25℃)、20分間反応、静置		* ② * ③
<input type="checkbox"/> 反応停止液 分注後、濃度により黄褐色に変色 <b>強酸性につき取扱注意</b>	50 µL	* ④
<input type="checkbox"/> ↓攪拌 (直ちに攪拌)		* ②
<input type="checkbox"/> 直ちに、吸光度測定 (主波長450 nm、副波長620 nm:600 nm～650 nm) 副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします		

(\* ①)洗浄液をウェルに分注後、手のひらの上で10秒ほど軽く振り廃棄します。3回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後の乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は300 µL/ウェルです。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は5 mL/分～25 mL/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ください。「洗浄操作」の動画をご参照ください。

(\* ②)攪拌の目安は600 rpm～1200 rpm-10秒間、3回。「攪拌操作」の動画をご参照ください。

(\* ③)攪拌終了後プレートシールを貼って静置してください。「反応条件」の動画をご参照ください。

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ください。一度使用したプレートシールは再使用しないでください。

(\* ④)ピペッティングに関する注意事項は「ピペッティング」の動画をご参照ください。

## ワークシート (例)

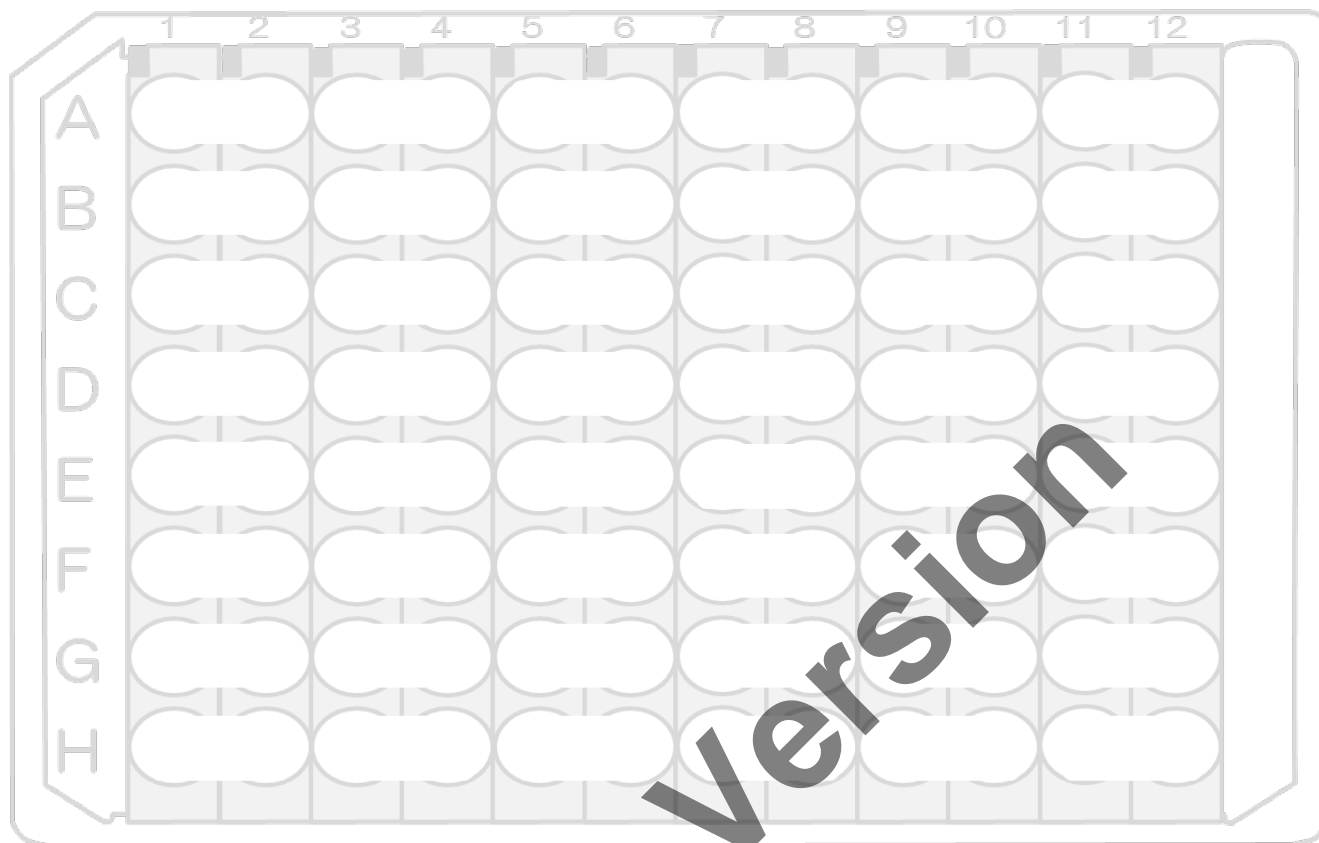
	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	200 ng/mL	検体1	検体9	検体17	検体25	検体33
B	100 ng/mL	検体2	検体10	検体18	検体26	検体34
C	50 ng/mL	検体3	検体11	検体19	検体27	検体35
D	25 ng/mL	検体4	検体12	検体20	検体28	検体36
E	12.5 ng/mL	検体5	検体13	検体21	検体29	検体37
F	6.25 ng/mL	検体6	検体14	検体22	検体30	検体38
G	3.13 ng/mL	検体7	検体15	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

## ◆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）を厳守してください。また、風速（エアコンの風も含む）：0.4 m/sec 以上、湿度 30%未満の環境下での測定は避けてください。やむを得ず、測定操作を風速：0.4 m/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ください。

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、詳細を弊社 Web サイトの動画「反応条件」でご確認ください。

- 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ください。
- 検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけてください。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ください。
- 反応停止液は使用するまでは無色です。
- 本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の方でご使用ください。用手法操作で測定するにはピペティング操作の再現性が安定した方がご使用ください。
- 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ください。
- 試薬類を皮膚に付けないでください。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ください。
- 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ください。
- 試薬類は口でピペティングしないでください。
- ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないでください。
- 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ください。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 時間以上浸けてください。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄してください。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ください。



【測定名】

【所属】

【測定者】

【測定日】

【ロット番号】

【有効期限】

【備考】

【製品名】

レビス® KLH(TDAR)ラット-IgM ELISA Kit

【シバヤギコード】

AKRKM-010

【和光コード】

639-13761

【英語表記】

LBIS Anti-KLH(TDAR)Rat-IgM ELISA Kit  
(AKRKM-010, FUJIFILM Wako Shibayagi, Gunma, Japan)

【お問い合わせ先】

製造

**富士フイルムワコーシバヤギ株式会社**

〒377-0007 群馬県渋川市石原 1062-1 TEL.0279-25-0279 FAX.0279-23-0313

<E-mail> wksb-info@fujifilm.com

<URL> <https://www.fujifilm.com/wksb/ja>

販売

**富士フイルム 和光純薬株式会社**