

研究用試薬

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)サル-IgG 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。本キットはサル血液中の 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。サル抗 KLH-IgM 測定キットと併せてご使用ください。

本キットはサル抗 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ください。

◆製品の特長

- 全反応時間は 2 時間20 分です。
- サル血清または血漿中のサル抗 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。
- 標準品はサル由来のものです。
- 全ての試薬は溶液タイプです。

2.測定原理

本キットはKLHと標準品（サル抗KLH-IgG抗体）または検体（サル抗KLH-IgG抗体）が結合したサル抗KLH-IgG抗体を重量表示しています。

具体的には、本キットは標準品または希釈検体をKLH 固相化マイクロプレートウェル中で1時間インキュベートし、洗浄後、HRP（ペルオキシダーゼ）結合抗サルIgG 抗体を加え、捕捉されたサル抗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 450nm（副波長620nm）で比色測定されます。吸光度はサル抗 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.キットの保存と使用期限

本キットは 2~8℃で保存してください（凍結厳禁）。この保存条件下で本キットは製造月から6 ヶ月（外箱のラベルに記載）までは安定です。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 10~20 μ L を正確にピペティングできるもの、及び 50~500 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 600~1,200 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 、620nm : 600~650nm）
- 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固相化96ウェルプレート	洗浄後使用	96 wells (8×12) /1枚
(B) サル抗 KLH-IgG抗体標準溶液 (500 ng/mL)	希釈後使用	200 μ L /1本
(C) 緩衝液	そのまま使用	100 mL /1本
(D) HRP結合抗サルIgG抗体	希釈後使用	100 μ L /1本
(F) 発色液 (TMB)	そのまま使用	12 mL /1本
(H) 反応停止液 (1M H2SO4) ※取扱注意	そのまま使用	12 mL /1本
(I) 濃縮洗浄液 (10×)	希釈後使用	100 mL /1本
プレートシール		3枚
取扱説明書		1部

6.試薬の調製

- *本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)。

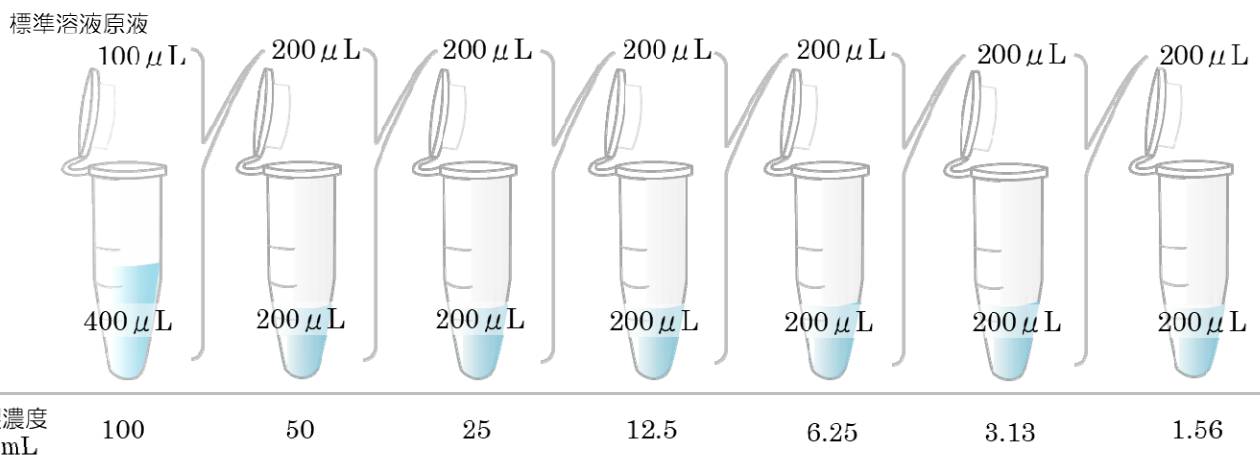
【濃縮された試薬類】

[(B)サル抗 KLH-IgG抗体標準溶液(500 ng/mL)] ; 標準曲線作成用

(B) サル抗 KLH-IgG抗体標準溶液 (500 ng/mL) (原液) と (C) 緩衝液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	緩衝液	濃度 (ng/mL)
標準溶液原液 100 μ L	400 μ L	100
100 ng/mL溶液 200 μ L	200 μ L	50.0
50.0 ng/mL溶液 200 μ L	200 μ L	25.0
25.0 ng/mL溶液 200 μ L	200 μ L	12.5
12.5 ng/mL溶液 200 μ L	200 μ L	6.25
6.25 ng/mL溶液 200 μ L	200 μ L	3.13
3.13 ng/mL溶液 200 μ L	200 μ L	1.56
0 (ブランク)	200 μ L	0

重量表示法： 定量法



[(D)HRP 結合抗サルIgG 抗体]

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 倍に希釈してください。

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

【試薬の安定性と保存方法】

(A)KLH 固相化 96 ウェルプレート

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 2~8℃で保存してください。有効期限内安定性を保ちます。

(B) サル抗 KLH-IgG抗体標準溶液 (500 ng/mL)

本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ずに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)緩衝液及び(F)発色液(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、残りは室温に戻さずに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 結合抗サルIgG 抗体

本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ずに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)反応停止液(1M H2SO4)

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)濃縮洗浄液(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

本キットはサル血清または血漿中のサル抗 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溶血・脂質 (乳ビ) 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440mg/dL以上、乳ビが2240ホルマジン濁度より高い場合影響が現れます。
- 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 100 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 100~10,000 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(10 倍)	100倍	1,000倍	10,000倍
検体 (μL)	50	50*	50*	50*
緩衝液 (μL)	450	450	450	450

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

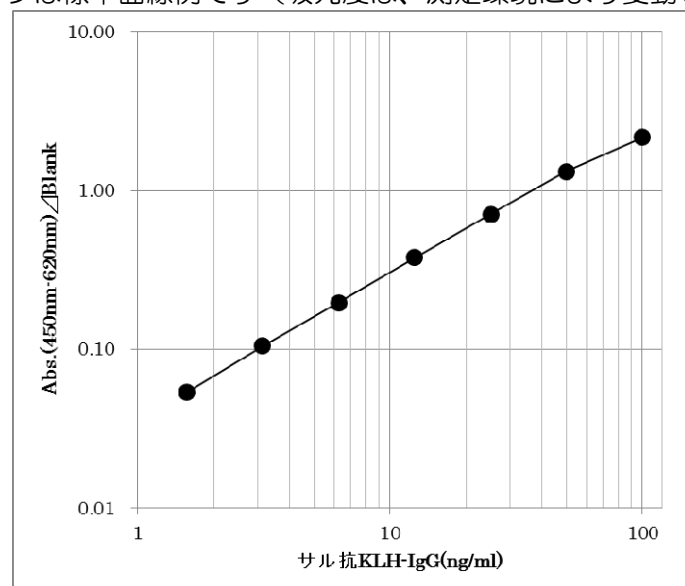
洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意してください。

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 (20~25°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HRP 結合抗サルIgG 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 (20~25°C) で 1 時間静置 (*③) します。
 - (9) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし 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 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 (20~25°C) で 20 分間静置 (*③) します。
 - (12) 各ウェルに反応停止液を 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 600~650nm の範囲で使用できます。
- (*①)、(*②)、(*③)測定手順概要 (7 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) 緩衝液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。
- * サル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

サル抗 KLH-IgG 抗体価を 1.56~100 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 結合抗サルIgG 抗体はサルIgG に対して特異的です。
サル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）（8 重測定、5検体） 平均 C. V. 値は10%未満

●再現性試験（アッセイ間変動）（3重測定、2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濃度のサル抗 KLH-IgG 抗体を添加し測定した結果、回収率は96.3%から104% でした。

●希釈直線性

3血清検体を連続的に希釈用緩衝液で2段階希釈し測定した結果、直線回帰の R^2 は0.9996~1でした。

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（1.56 ng/mL）の OD 値よりブランク 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 4~6 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。

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	100 ng/mL	検体1	検体9	検体17	検体25	検体33
B	50 ng/mL	検体2	検体10	検体18	検体26	検体34
C	25 ng/mL	検体3	検体11	検体19	検体27	検体35
D	12.5 ng/mL	検体4	検体12	検体20	検体28	検体36
E	6.25 ng/mL	検体5	検体13	検体21	検体29	検体37
F	3.13 ng/mL	検体6	検体14	検体22	検体30	検体38
G	1.56 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）：0.4m/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：0.4m/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、または指導者のもとでご使用ください。用手法操作で測定する際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。
- 本キットは動物由来の成分を含んでいます、標準品（抗体）は次より採取しました。
カニクイザル、♂、5頭。Bウイルス、SIV、虫卵、ランブル鞭毛虫、マイクロフィラリア、赤痢アメーバ、サルモネラ菌の検査項目は5頭全てが陰性を示しました。

【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。

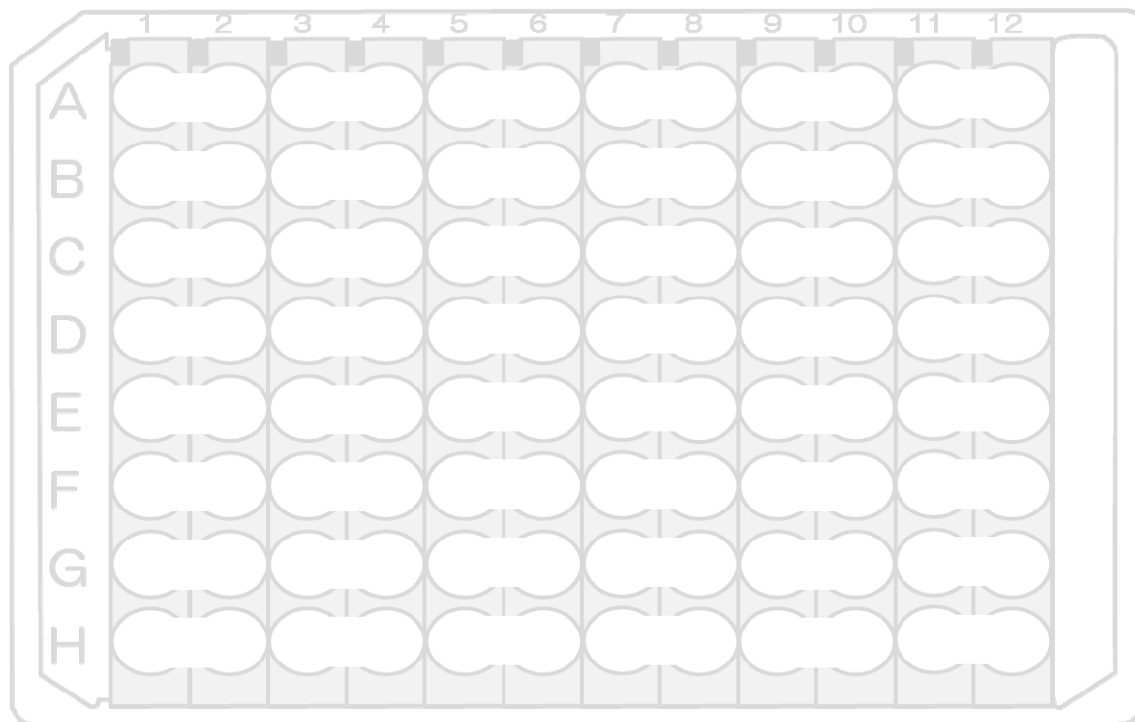
濃度(ng/mL)	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0
標準溶液(μL)	原液:100	200*	200*	200*	200*	200*	200*	0
緩衝液(μL)	400	200	200	200	200	200	200	200

* : ひとつ高濃度の標準溶液

			各操作注意事項並びに関連情報
□	KLH固相化96ウェルプレート		
□	↓洗浄3回 (*①)		洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
□	希釈検体またはサル抗KLH-IgG抗体標準溶液	50 μL	「ピペティング」の動画参照
□	↓攪拌(*②)、室温(20~25℃)、1時間反応、静置(*③)		第一反応「反応条件」の動画参照
□	HRP結合抗サルIgG抗体の希釈 室温化された緩衝液で、100倍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
□	↓洗浄3回(*①)		洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
□	HRP結合抗サルIgG抗体	50 μL	「ピペティング」の動画参照
□	↓攪拌(*②)、室温(20~25℃)、1時間反応、静置(*③)		第二反応「反応条件」の動画参照
□	↓洗浄3回(*①)		洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
□	発色液(TMB) 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(*②)、室温(20~25℃)、20分間反応、静置(*③)		第三反応「反応条件」の動画参照
□	反応停止液(1M H ₂ SO ₄) 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(*②)		直ちに攪拌
□	吸光度測定(主波長450nm、副波長620nm:600~650nm)		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5~25mL/分(ノズルの径により異なります)です。第一反応後の初回の洗浄のみウェル間のコンタミに注意してください。「洗浄操作」の動画をご参照ください。
- (*②) 攪拌の目安は600~1,200rpm-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。

ワークシート



【測定名】 _____

【所属】 _____

【測定者】 _____ 【測定日】 _____

【キットロット番号】 _____ 【有効期限】 _____

【備考】 _____

【製品名】 ; レビス® KLH(TDAR)サル-IgG ELISA Kit

【シバヤギコード】 ; AKMOKG-014 【和光コード】 ; 637-30781

【英語表記】 ; KLH(TDAR)Monkey-IgG ELISA Kit(AKMOKG-014, Shibayagi, Gunma, Japan)

【お問い合わせ先】

製造/発売元; 株式会社 シバヤギ

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

<E-mail>syc-info@shibayagi.co.jp <URL><http://www.shibayagi.co.jp>