

# Anti-Integrin $\alpha v \beta 6$ ELISA Kit

CODE 5288

## 目次

[全般的な注意]	p1
[貯蔵方法]	p1
[はじめに]	p2
[測定原理]	p2
[キット構成]	p2
[操作方法]	p3
[使用上又は取扱い上の注意]	p7
[性能]	p9
[参考文献]	p11
[問い合わせ先]	p11

### [全般的な注意]

- 1.本品は、血清中の抗インテグリン  $\alpha v \beta 6$  抗体を測定する試薬です。
2. Standard material および Reaction buffer には保存剤として 0.09%のアジ化ナトリウムが添加されています。目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。
3. Stop solution は 0.25 mol/L 硫酸を含んでいます。皮膚、目、粘膜などに付けないよう注意して取り扱ってください。皮膚などにかかったときは大量の水で洗い流し、必要があれば医師の手当てを受けてください。

研究用試薬 この使用説明書をよく読んでから使用してください。

### [貯蔵方法]

2~8°Cで保存  
使用期限は外箱に表示されています。

## [はじめに]

抗インテグリン $\alpha v\beta 6$ 抗体は、インテグリン $\alpha v\beta 6$ に対する自己抗体です。インテグリンは $\alpha$ と $\beta$ の2つのサブユニットから成るヘテロ二量体の細胞表面受容体で、細胞外マトリクスと細胞間、および細胞間の接着に関与しています。また、インテグリンは周囲のシグナルを受け、細胞の新生、移動、生存、組織浸潤、並びに自然免疫などの多様な機能に関与します。哺乳類細胞では、18種類の $\alpha$ サブユニットと8種類の $\beta$ サブユニットが見つかっており、それらの組み合わせにより少なくとも24種類のインテグリンが同定されています。インテグリン $\alpha v\beta 6$ は上皮細胞で限定的に発現しており、フィブロネクチンなどの細胞外マトリクスタンパク質の受容体として機能します。腸管上皮に発現するインテグリン $\alpha v\beta 6$ は、炎症抑制および病原体と寄生虫の感染予防に関与しています[1]。抗インテグリン $\alpha v\beta 6$ 抗体は潰瘍性大腸炎患者の大多数で検出され、また、抗体の力価は疾患活動性と相関することが報告されています[2]。

## [測定原理]

本品は、ELISA法により血清中の抗インテグリン $\alpha v\beta 6$ 抗体を測定する試薬です。 $\alpha v\beta 6$ 固相マイクロカップに検体を添加し、抗原・抗体反応（一次反応）をさせます。洗浄後、酵素標識抗体を添加して反応（二次反応）させ、抗原・抗体・酵素標識抗体の複合物を形成させます。再び洗浄後、酵素基質液を添加し、酵素（ペルオキシダーゼ）により発色させます（酵素反応）。反応停止後、吸光度（A450）を測定して、血清中の抗インテグリン $\alpha v\beta 6$ 抗体を測定します。

## [キット構成]

構成試薬	包装	数量
$\alpha v\beta 6$ coated microplate	8連12本	1袋
Standard material	50 $\mu$ L	1本
Reaction buffer	50 mL	1本
Wash concentrate (10x)	100 mL	1本
Conjugate diluent	20 mL	1本
HRP conjugated antibody	50 $\mu$ L	1本
Substrate reagent	20 mL	1本
Stop solution	20 mL	1本
Plate seal	-	3枚

\*別ロットの試薬を組み合わせることはできません。

\*キットは2~8°Cで保存してください。

## [操作方法]

### □ 準備するもの

- ・ マイクロプレートリーダー
- ・ プレートウォッシャー又は洗浄ビン
- ・ マイクロピペット
- ・ マルチチャンネルマイクロピペット
- ・ リザーバー
- ・ 精製水
- ・ サンプルチューブ (15 mL)

使用するすべての機器は、適切に整備されたものを使用してください。

自動 EIA 機器を用いて測定する場合は、対応機種に操作法が異なる場合があります。

使用する機種の操作方法に従って実験してください。

### □ 試薬の調製方法

すべての構成試薬は、室温 (20~25°C) に戻してから使用してください。

#### (1) 洗浄液の調製 (操作前に実施)

必要量の **Wash concentrate (10x)** を精製水で 10 倍希釈し、洗浄液とします。

例) Wash concentrate (10x) 100 mL に精製水 900 mL を加えて 10 倍希釈します。

洗浄液は必ず 20~25°C のものを使用してください。

洗浄液は 2~8°C で 2 週間安定です。

#### (2) 酵素標識抗体の調整

**HRP conjugated antibody** を **Conjugate diluent** で 401 倍に希釈し、標識抗体液とします。

例) 標識抗体液は 100  $\mu$ L/well で使用するため、余裕をもって 96 well につき 12 mL ほど調整します。12 mL の **Conjugate diluent** をサンプルチューブ (15 mL) に分注し、30  $\mu$ L の **HRP conjugated antibody** 加え、よく混合します。

調製した酵素標識抗体液は室温で使用します。

□ 操作法

(1) スタンダードおよび検体の調整

- 1) **Reaction buffer** を用いて **Standard material** を下記の表の通りに希釈をしてください。各チューブから溶液を移動する前に完全に混和してください。200.0 U/mL の標準液 (Cal. 7) が最高濃度の標準液です。**Reaction buffer** を Blank として用います。

	標準液	反応用緩衝液	濃度 (U/mL)
Cal. 7	標準液 (101 倍濃縮品) 5 $\mu$ L	500 $\mu$ L	200.0
Cal. 6	Cal. 7 から 250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	100.0
Cal. 5	Cal. 6 から 250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	50.0
Cal. 4	Cal. 5 から 250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	25.0
Cal. 3	Cal. 4 から 250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	12.5
Cal. 2	Cal. 3 から 250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	6.3
Cal. 1	Cal. 2 から 250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	3.1
Blank	—	250 $\mu$ L	0.0

- 2) **Reaction buffer** を用いて検体を 101 倍希釈します。

例) **Reaction buffer** 500  $\mu$ L に検体 5  $\mu$ L を加え、101 倍希釈する。

(2) 一次反応 (抗原-抗体反応)

- 1)  **$\alpha v\beta 6$  coated microplate** を用意します。

- 2) 標準液 (Cal. 1~7, Blank) および希釈した検体をマルチチャンネルマイクロピペットで  **$\alpha v\beta 6$  coated microplate** に 100  $\mu$ L ずつ移します。

注意)  **$\alpha v\beta 6$  coated microplate** に検体を添加した時点で反応が始まりますので、操作は短時間のうちに行ってください。

- 3) 室温 (20~25°C) で 1 時間静置反応させます。

(3) 洗浄

自動洗浄機または洗浄ピンを用いて洗浄液で  **$\alpha v\beta 6$  coated microplate** を洗浄します。

**$\alpha v\beta 6$  coated microplate** 中の液を除去した後、350  $\mu$ L 程度の洗浄液を添加する操作を繰り返し、4 回洗浄します。洗浄液は必ず室温 (20~25°C) のものを使用してください。

注意) 自動洗浄機を用いる場合は、機種によって設定方法及び最適洗浄回数が異なる場合があります。あらかじめ各施設で用いる自動洗浄機の設定方法及び最適洗浄回数を確認することをお勧めします。

(4) 二次反応 (抗体-標識抗体反応)

- 1)  **$\alpha v \beta 6$  coated microplate**に残った洗浄液を完全に除去した後、リザーバーに移した**標識抗体液**をマルチチャンネルマイクロピペットで 100  $\mu$ L ずつ添加します。

注意) 試薬間のコンタミネーションを防ぐため、残った酵素標識抗体は絶対に試薬ボトルに戻さないでください。

- 2) 室温 (20~25°C) で 1 時間静置反応させます。

(5) 洗浄

- (3)と同様に  **$\alpha v \beta 6$  coated microplate** を洗浄します。

(6) 酵素反応

- (1)  **$\alpha v \beta 6$  coated microplate**に残った洗浄液を完全に除去した後、**Substrate reagent** をリザーバーに移し、マルチチャンネルマイクロピペットを用いて  **$\alpha v \beta 6$  coated microplate** に 100  $\mu$ L ずつ添加します。

注意) 試薬間のコンタミネーションを防ぐため、余った基質液を再利用しないでください。

- (2) 室温 (20~25°C) で 20 分間静置反応させます。

(7) 反応停止

反応終了後、リザーバーに移した **Stop solution** をマルチチャンネルマイクロピペットで 100  $\mu$ L ずつ  **$\alpha v \beta 6$  coated microplate** に添加します。

(8) 吸光度測定

自動分光光度計 (マイクロプレート専用機: 垂直透過型) に  **$\alpha v \beta 6$  coated microplate** をセットして、波長450nm (副波長 620nm) の吸光度 (A450) を測定します。

注意) 吸光度測定は反応停止後、速やかに行ってください。

(9) 濃度の算出

濃度の算出には 4-parameter logistic 回帰が可能なプログラムを使用します。各標準

## 研究用試薬

研究目的でのみ使用し、診断用途では使用しないでください。



液（Blank および Cal. 1—7）の濃度と測定した吸光度を 4-parameter logistic 曲線に当てはめ、標準曲線を算出します。算出した標準曲線と検体の吸光度測定値から、検体の測定値（濃度）を求めます。

測定結果は以下の条件を満たしていることが必要です。満たさない場合には測定をやり直してください。

- Blank の吸光度は 0.1 以下であること
- Cal. 7 の吸光度は 1.0 以上であること

## [使用上又は取扱い上の注意]

### 1. 取扱い上の注意

- (1) 検体はH I V、H B V、H C V等感染の恐れがあるものとして扱ってください。  
検査にあたって感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用し、また、口によるピペティングを行わないでください。
- (2) 試薬が目や口に入った場合は、水で十分に洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。
- (3) Reaction bufferには保存剤として0.09%のアジ化ナトリウムが添加されています。  
目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。
- (4) Stop solutionは0.25 mol/L硫酸を含んでいます。皮膚、目、粘膜などに付けないよう注意して取り扱ってください。皮膚などにかかったときは大量の水で洗い流し、必要があれば医師の手当てを受けてください。

### 2. 使用上の注意

- (1) 本品は研究用試薬です。研究目的でのみ使用し、診断用途では使用しないでください。
- (2) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- (3) 異なるロットの試薬を組み合わせ使用しないでください。
- (4) キットの構成試薬は、20~25°Cに戻してから使用してください。
- (5) 保存及び使用中に、試薬に直射日光を当てないでください。
- (6) 検体、試薬への微生物の混入や試薬間のコンタミネーションを避けてください。
- (7) 反応温度、反応時間、溶液の希釈率を厳守してください。
- (8) 洗浄が適切でない場合、ばらつきや偽陰性、偽陽性を生じることがありますので、適切な洗浄条件を設定してください。
- (9) 測定中にマイクロカップが乾燥しないように注意してください。
- (10) マイクロカップ間のコンタミネーションを防ぐため、液の泡立ちや、周囲への付着が起これないようにしてください。
- (11) Substrate reagentは金属イオンにより酸化されやすいので使い捨ての新しい器具を使用し、試薬ボトルからリザーバーへ酵素基質液を移す際にも使い捨てのピペットを使用してください。また、一度リザーバーへ移した酵素基質液は試薬ボトルへ戻さないでください。
- (12)  $\alpha$  v  $\beta$  6 coated microplateは湿気を嫌いますので、開封後はアルミ袋のチャックを確実に閉めて保存してください。
- (13) Reaction bufferは沈殿を生じることがあります。使用前に20~25°Cに戻し、沈殿が溶解するように良く攪拌してください。試薬性能に影響はありません。
- (14) Wash concentrate (10x) は、2~8°Cで保存したとき、白濁を認める場合がありますが、試薬性能に影響はありません。洗浄液調製時、十分に溶解してから使用

してください。

### 3. 廃棄上の注意

(1) 検体は感染の可能性があるものとして注意して取り扱ってください。検査に使用した器具は、次のいずれかの方法で処理してください。

- ・ 最終濃度2% グルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸漬する。
- ・ 0.1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素 約 1000 ppm）に1時間以上浸漬する。
- ・ 121°Cで20分間以上高圧蒸気滅菌する。

また、試薬及び器具等を廃棄する場合は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理してください。

(2) 検体等が飛散した場合は、手袋着用の上、ペーパータオル等でふき取り、0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で清拭してください。また、使用した手袋、ふき取りに使用したペーパータオル等は廃棄上の注意（1）に従って、処理、廃棄してください。

(3) Standard material および Reaction buffer には 0.09%アジ化ナトリウムが添加されています。目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流すなどの処置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。また、アジ化ナトリウムは、配管中で爆発性のアジ化銅やアジ化鉛を形成することが報告されています。これらの物質の形成を防ぐため、アジ化ナトリウムを含んだ廃液は十分量の水で洗い流してください。

[性能]

■ 正確性

既知濃度の検体9例をそれぞれ3回測定したところ、測定値はいずれも期待値の±20%以内でした。

	期待値 (U/mL)	1回目		2回目		3回目	
		期待値 (U/mL)	測定値/ 期待値	期待値 (U/mL)	測定値/ 期待値	期待値 (U/mL)	測定値/ 期待値
検体 1	115.4	125.5	108.7%	118.7	102.8%	114.5	99.2%
検体 2	89.8	99.2	110.5%	91.6	102.0%	90.8	101.1%
検体 3	75.4	79.0	104.8%	74.8	99.2%	74.6	98.9%
検体 4	42.6	47.5	111.3%	44.0	103.1%	42.9	100.7%
検体 5	35.4	38.2	107.8%	36.4	102.5%	36.8	103.7%
検体 6	22.6	25.2	111.4%	23.7	105.1%	20.5	91.0%
検体 7	4.9	5.1	102.8%	5.0	100.6%	5.3	107.2%
検体 8	4.6	4.9	107.8%	4.4	96.0%	4.6	100.9%
検体 9	4.4	4.7	107.3%	4.2	95.5%	4.8	108.6%

■ 同時再現性

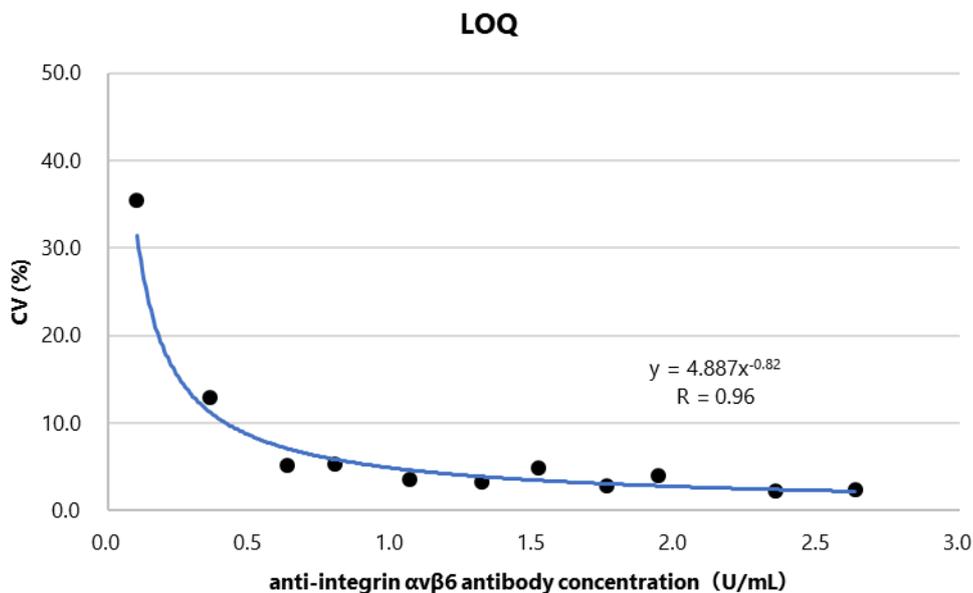
既知濃度の検体9例をそれぞれ8回同時に測定したところ、測定値の変動係数（CV）はいずれも10%以下でした。

	検体 1	検体 2	検体 3	検体 4	検体 5	検体 6	検体 7	検体 8	検体 9
1	134.4	104.1	86.6	48.3	40.0	26.5	5.3	5.3	5.4
2	123.1	101.6	83.9	47.9	40.3	25.3	5.2	5.1	4.9
3	126.9	98.1	78.5	48.0	38.1	25.5	5.0	4.5	4.5
4	123.4	96.8	79.4	45.7	38.3	25.0	5.0	4.8	4.6
5	123.5	95.1	77.9	48.0	38.1	24.5	5.0	4.8	4.5
6	122.4	100.2	78.1	47.6	35.9	24.3	5.1	4.9	4.6
7	121.2	96.5	78.6	46.9	36.5	24.6	5.0	4.9	4.6
8 (U/mL)	129.5	101.9	70.1	47.3	38.8	25.5	5.1	5.1	4.7
mean (U/mL)	125.5	99.3	79.1	47.5	38.2	25.2	5.1	4.9	4.7
SD	4.5	3.1	4.8	0.8	1.5	0.7	0.1	0.2	0.3
CV (%)	3.6	3.2	6.1	1.7	4.0	2.9	2.3	4.8	6.1

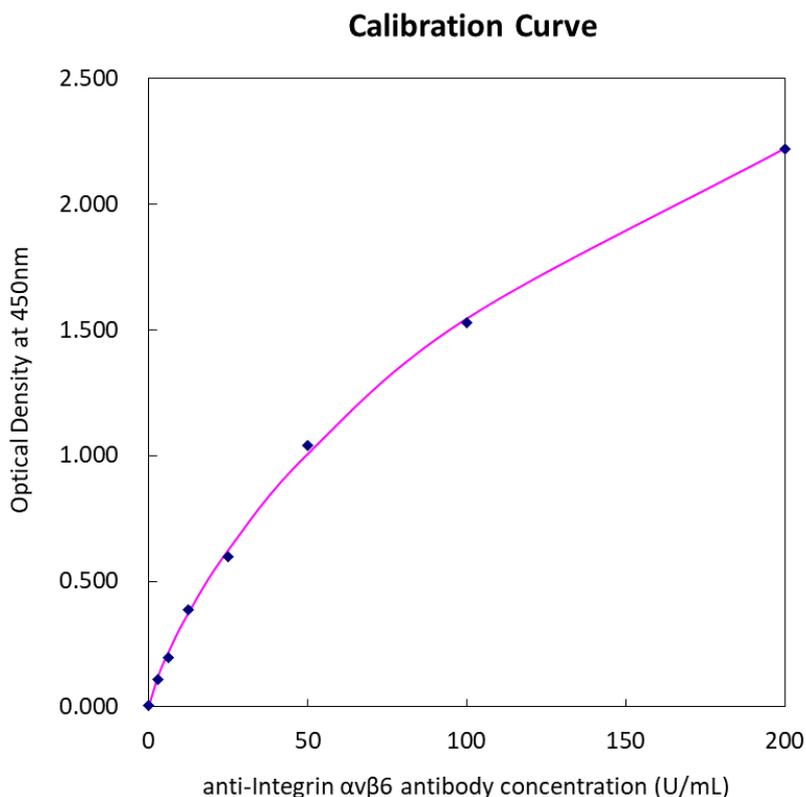
■ 感度

定量限界 (LOQ) = 0.4 U/mL

低値血清の希釈系列の8重測定からCVが10%となるLOQを求めたところ、0.4 U/mLでした。



スタンダードカーブの例示



### [参考文献]

1. Koivisto L, Bi J, Häkkinen L, Larjava H. Integrin  $\alpha v \beta 6$ : Structure, function and role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;99:186-96.
2. Kuwada T, Shiokawa M, Kodama Y, Ota S, Kakiuchi N, Nannya Y, et al. Identification of an Anti-Integrin  $\alpha v \beta 6$  Autoantibody in Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology.* 2021;160(7):2383-94.e21.

### [問い合わせ先]

株式会社医学生物学研究所 学術部  
〒105-0012 東京都港区芝大門2丁目11番8号  
住友不動産芝大門二丁目ビル  
TEL: 03-6854-3613 E-mail: [kensa@mbl.co.jp](mailto:kensa@mbl.co.jp)

### [販売元]

株式会社医学生物学研究所  
〒105-0012 東京都港区芝大門2丁目11番8号  
住友不動産芝大門二丁目ビル  
TEL: 03-6684-6860

**For Research Use Only, Not for use in diagnostic procedures**

Enzyme immunoassay for the detection of anti-Integrin  $\alpha v \beta 6$  antibody in serum

# Anti-Integrin $\alpha v \beta 6$ ELISA Kit

Intended Use.....	1
Storage.....	1
Introduction.....	2
Principle of the Assay.....	2
Materials Provided.....	2
Detailed Protocol.....	3
Warnings and Precautions.....	5
Assay Characteristics.....	7
References.....	9

## Intended Use

The MBL Research Product **Anti-Integrin  $\alpha v \beta 6$  ELISA Kit** is intended to be used for quantitative measurement of anti-integrin  $\alpha v \beta 6$  antibody in serum samples.

The Standard material and Reaction buffer contains 0.09% sodium azide as a preservative. If these reagents get into the eyes or mouth, or on the skin, first-aid measures should be taken, such as flushing with water, in addition to seeking medical attention if deemed necessary.

Carefully handle the Stop solution and avoid any contact with the eyes, mouth, or skin because this reagent contains sulfuric acid. If contact occurs, immediately flush the affected area with copious amounts of water and seek medical attention if deemed necessary.

**This assay kit is for research use only and is not intended for diagnostic or therapeutic procedures.**

## Storage

- Upon receipt, store all components at 2–8°C.
- The expiration date of the reagents is indicated on the outer packaging.

---

## Introduction

---

Integrins are heterodimeric cell surface receptors involved in cell-extracellular matrix and cell-cell adhesion. In addition, integrins convey two-way signaling between cells and their surroundings and participate in the regulation of a variety of cellular processes, including cell proliferation, migration, survival, tissue invasion, and innate immunity. Mammalian cells have 18 distinct integrin  $\alpha$  subunits and 8  $\beta$  subunits, which can combine in various ways to form 24 different receptor heterodimers. Integrin  $\alpha\beta6$  is expressed exclusively by epithelial cells and functions as a receptor for extracellular matrix proteins such as fibronectin. Furthermore, integrin  $\alpha\beta6$  expressed in the intestinal epithelium is involved in suppression of inflammation and prevention of pathogen and parasite infection [1]. Anti-integrin  $\alpha\beta6$  antibodies have been detected in the vast majority of the patients with ulcerative colitis, and its titers have been reported to correlate with disease activity [2].

---

## Principle of the Assay

---

The Anti-Integrin  $\alpha\beta6$  ELISA Kit readily allows measurement of anti-integrin  $\alpha\beta6$  antibody levels in human serum. Calibration controls and diluted serum samples are added to ELISA plates coated with integrin  $\alpha\beta6$ . After washing away unbound serum proteins, anti-human IgG conjugated with horseradish peroxidase is added and the plate is incubated (Conjugate incubation). After a wash step, the chromogenic substrate for peroxidase is added and the plate is incubated (Substrate incubation). Finally, an acidic solution is added to stop the enzyme reaction and consequent color development. Anti-integrin  $\alpha\beta6$  IgG concentrations can then be determined by comparing the absorbance at 450 nm of samples relative to those of calibration controls.

---

## Materials Provided

---

Components	Package	Quantity
$\alpha\beta6$ coated microplate	8-well x 12 strips	1 pack
Standard material	50 $\mu$ L	1 vial
Reaction buffer	50 mL	1 bottle
Wash concentrate (10x)	100 mL	1 bottle
Conjugate diluent	20 mL	1 bottle
HRP conjugated antibody	50 $\mu$ L	1 vial
Substrate reagent	20 mL	1 bottle
Stop solution	20 mL	1 bottle
Plate seal	-	3 sheets

- Reagents from different lot numbers should not be combined.
- All components should be stored at 2–8°C.
- A plate seal is provided to prevent dust and evaporation of the reaction solution during the first and second reactions.

## Detailed Protocol

### Preparation of required items

- Microplate reader
- Plate washer or wash bottle
- Micropipette
- Multichannel micropipette
- Reagent reservoir
- ddH<sub>2</sub>O
- 15 mL centrifuge tube

### Preparation of Working Solutions

Allow all the reagents to reach **room temperature (approx. 20–25°C)** before use.

1. Prepare the wash solution by adding **100 mL** of the **Wash concentrate (10x)** to **900 mL** of deionized (distilled) water (**ddH<sub>2</sub>O**). The wash solution should be at approximately **25°C** when used. The 1X-diluted wash solution is stable for 2 weeks at 2–8°C.
2. Dilute the **HRP conjugated antibody** with the **Conjugate diluent**. Dispense **12 mL** of the **Conjugate diluent** into a 15 mL centrifuge tube. Add **30 µL** of **HRP conjugated antibody** and mix well. Use the prepared enzyme-labeled antibody solution at **room temperature (approx. 20–25°C)**.

### Assay Procedure

#### (1) Standard solution and sample preparation

Use the **Standard material** to produce a dilution series (below). Mix each tube thoroughly before the next transfer. The 200.0 U/mL standard (Cal. 7) serves as the highest standard. The **Reaction buffer** serves as the zero standard (Blank).

	Volume of Standard	Assay Diluent (red)	Concentration (U/mL)
Cal. 7	5 µL of 101X Standard solution	500 µL	200.0
Cal. 6	250 µL of Cal. 7	250 µL	100.0
Cal. 5	250 µL of Cal. 6	250 µL	50.0
Cal. 4	250 µL of Cal. 5	250 µL	25.0
Cal. 3	250 µL of Cal. 4	250 µL	12.5
Cal. 2	250 µL of Cal. 3	250 µL	6.3
Cal. 1	250 µL of Cal. 2	250 µL	3.1
Blank	—	250 µL	0.0

Dilute each serum sample 1:101 by adding 5 µL of serum to 500 µL of **Reaction buffer**.

#### (2) 1<sup>st</sup> Reaction

- 1) Remove the appropriate number of microtiter wells from the  **$\alpha\text{v}\beta\text{6}$  coated microplate** and place them into the well holder. Return any unused wells to the foil pouch, refold, seal with tape, and store at 4°C.
- 3) Pipette **100 µL** of **Calibrators (Blank and Cal. 1–7)** and **diluted samples** into the appropriate wells.

Note: The reaction starts as soon as the sample is added to the  **$\alpha\text{v}\beta\text{6}$  coated microplate**, so the pipetting into the plate needs to be performed quickly and without interruptions at every step of the test procedure.

- 4) Cover the wells with a plate seal and incubate the plate for 60 minutes at **room temperature**

**(approx. 20–25°C).**

(3) Washing

- 1) Remove the solution in the wells.
- 2) Wash four times by filling each well with 1X wash solution (> 350  $\mu\text{L}$ ) using a squirt bottle, multichannel micropipette, manifold dispenser, or microplate washer.

Note-1: The wash solution should be used at room temperature (approx. 20–25°C).

Note-2: When using an automatic washer, the appropriate washing conditions should be established by the individual user.

(4) 2<sup>nd</sup> Reaction

- 1) Remove all of the wash buffer from the wells.
- 2) Add 100  $\mu\text{L}$  of the **1X HRP conjugated antibody** to each well using a multichannel micropipette.

Note: The **HRP conjugated antibody** should not be returned to the reagent bottle in order to avoid contamination between reagents.

- 3) Cover the wells with the plate seal and incubate the plate for 60 minutes at **room temperature (approx. 20–25°C).**

(5) Washing

- 1) Remove the solution in the wells.
- 2) Wash four times, as in step (3)-2).

(6) Enzyme reaction

- 1) Fully remove the wash buffer in the wells.
- 2) Add **100  $\mu\text{L}$  of Substrate reagent** to each well using a multichannel micropipette.

Note-1: Avoid exposing the microtiter plate to direct sunlight.

Note-2: Use a fresh reservoir for the Substrate reagent to avoid contamination of the reagents.

Note-3: The Substrate reagent should not be returned to the bottle after using it.

- 3) Incubate for 20 minutes at **room temperature (approx. 20–25°C).**

(7) Stop Reaction

Add **100  $\mu\text{L}$  of Stop solution** to each well using a multichannel micropipette in the same order as in step (6).

(8) Reading

Measure the absorbance in each well using a spectrophotometric microplate reader at dual wavelengths of 450 and 620 nm. Read the microplate at 450 nm if only a single wavelength can be used. Wells must be read within 30 minutes of adding the Stop solution.

Note: Complete removal of the liquid at each step is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining wash solution by aspiration or decanting. Invert and tap the plate on clean paper towels to remove any residual traces of fluid.

(9) Calculation

Generate a calibration curve using the OD value of Cal. 1–7 and Blank at 450 nm (y-axis) and the antibody concentration (x-axis). The calibration curve fits best to a sigmoidal four-parameter logistic equation. If an OD value of a sample is higher than that of the highest concentration calibrator (Cal. 7), re-testing with further diluted samples is recommended.



Each assay result should meet the following criteria.

OD value (450nm) of Blank:  $\leq 0.100$

OD value (450nm) of Cal. 7:  $\geq 1.0000$

---

## **Warnings and Precautions**

---

1. All patient samples should be treated as if they pose a risk of infection, such as HIV, HBV, HCV, etc.
2. If these reagents get into the eyes or mouth, or on the skin, first-aid measures should be taken, such as flushing with water, in addition to seeking medical attention if deemed necessary.
3. Carefully handle the Stop solution and avoid any contact with the eyes, mouth, or skin because this reagent contains sulfuric acid. If contact occurs, immediately flush the affected area with copious amounts of water and seek medical attention if deemed necessary.
4. This assay kit is for research use only and is not intended for use in diagnostic or therapeutic procedures.
5. Do not use any of the kit components beyond the stated expiration dates.
6. Do not mix reagents from different lot numbers.
7. All reagents must be brought to room temperature (approx. 20–25°C) before starting the assay.
8. Do not expose the kit components to direct sunlight during storage or when in use during the assay.
9. Avoid microbial contamination of all reagents and samples.
10. Strict adherence to the specified assay instructions (incubation temperature, incubation time, and sample dilution) is essential.
11. The wells must be properly rinsed with 1X wash solution to avoid false-positive or false-negative results.
12. Do not allow the microplate to dry out during the assay.
13. Avoid cross-contamination of microtiter wells. Mix reagents gently so as not to form bubbles in the liquid or allow droplets to splash out.
14. Use disposable pipettes when transferring the Substrate reagent from the reagent bottle to the reservoir because the Substrate is readily oxidized by metal ions.  
Do not return the Substrate transferred to the reservoir back to the reagent bottle.
15. All breakaway microtiter wells that are not immediately required should be returned to the pouch with desiccant and must be carefully resealed to avoid moisture from being absorbed.
16. The Reaction buffer may form a precipitate. Before use in the test, bring the buffer to room temperature (approx. 20–25°C) and thoroughly mix it to dissolve any precipitate. This will not affect the test results.
17. The Wash concentrate (10x) may look turbid owing to crystal formation at 2-8°C, but this does not cause inconsistent results. Prior to preparation of the 1X wash buffer working solution, bring it to

**For Research Use Only, Not for use in diagnostic procedures**

25°C and mix it thoroughly to dissolve any material that has formed a precipitate.

18. In accordance with the principles of good laboratory practice, it is strongly recommended that all clinical specimens and assay materials, including the antigen microtiter wells, should be considered potentially infectious and handled and disposed of with all necessary precautions. Disposable implements (pipettes, tips, tubes, etc.) used in the test should be soaked in a final concentration of 2% glutaraldehyde solution or 0.1% sodium hypochlorite solution for at least one hour or autoclaved at 121°C for 20 minutes prior to being discarded.

19. If the serum samples etc. splatter, wear gloves and wipe the contaminated surfaces with a paper towel and sodium hypochlorite.

20. Some of the reagents contain sodium azide as a preservative. Azide reacts with copper or lead in the plumbing system to form explosive metal azides. Therefore, always flush with ample amounts of water when draining materials containing azide. Sodium azide is toxic if ingested.

## Assay Characteristics

### Accuracy

The ratio of the measured value to the expected value for 9 samples with known concentrations were within 0.80–1.20.

	Expected value (U/mL)	1st		2nd		3rd	
		Measured value (U/mL)	Measured/Expected	Measured value (U/mL)	Measured/Expected	Measured value (U/mL)	Measured/Expected
<b>Sample 1</b>	115.4	125.5	1.09	118.7	1.03	114.5	0.99
<b>Sample 2</b>	89.8	99.2	1.11	91.6	1.02	90.8	1.01
<b>Sample 3</b>	75.4	79.0	1.05	74.8	0.99	74.6	0.99
<b>Sample 4</b>	42.6	47.5	1.11	44.0	1.03	42.9	1.01
<b>Sample 5</b>	35.4	38.2	1.08	36.4	1.03	36.8	1.04
<b>Sample 6</b>	22.6	25.2	1.11	23.7	1.05	20.5	0.91
<b>Sample 7</b>	4.9	5.1	1.03	5.0	1.01	5.3	1.07
<b>Sample 8</b>	4.6	4.9	1.08	4.4	0.96	4.6	1.01
<b>Sample 9</b>	4.4	4.7	1.07	4.2	0.95	4.8	1.09

### Reproducibility

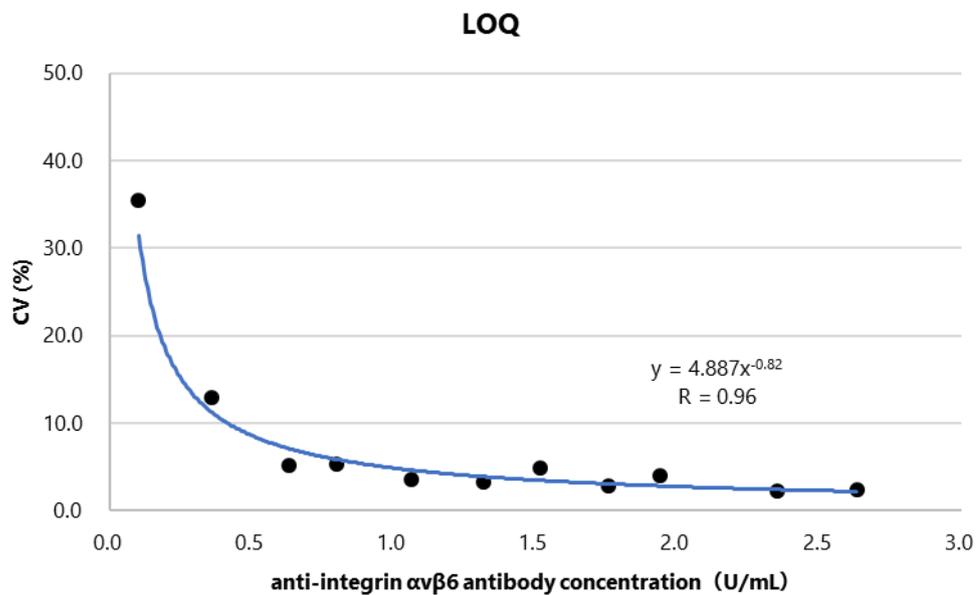
Intra-assay reproducibility was determined by testing 9 samples 8 times. The coefficient of variation (CV) (%) values for the reproducibility and repeatability were below 10% for each sample.

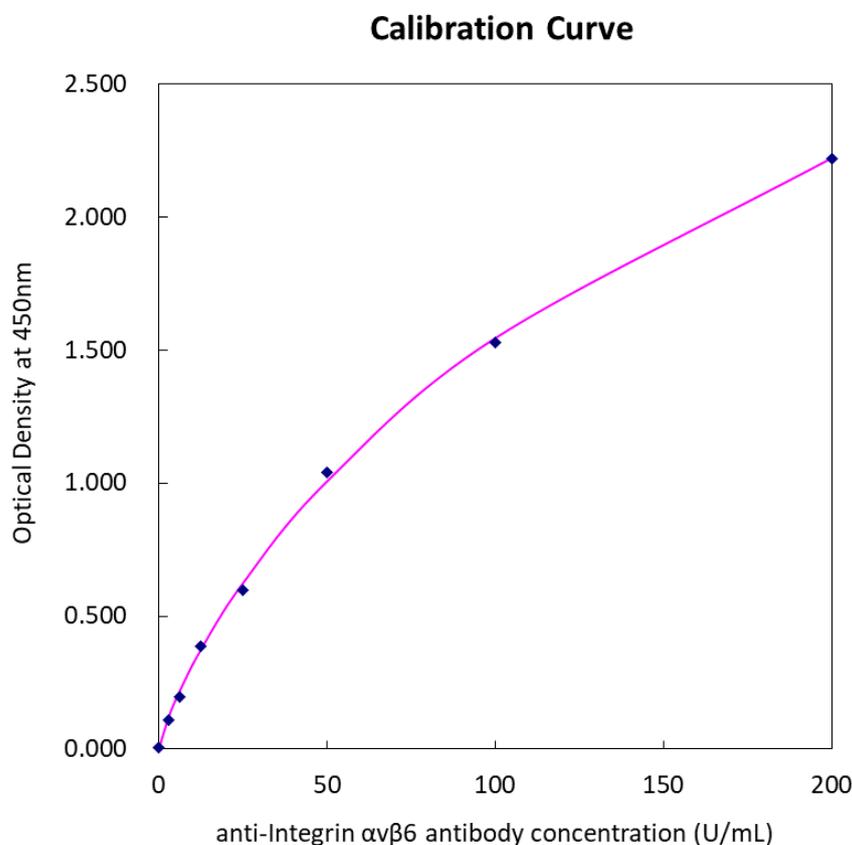
	Sample No.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>1</b>	134.4	104.1	86.6	48.3	40.0	26.5	5.3	5.3	5.4
<b>2</b>	123.1	101.6	83.9	47.9	40.3	25.3	5.2	5.1	4.9
<b>3</b>	126.9	98.1	78.5	48.0	38.1	25.5	5.0	4.5	4.5
<b>4</b>	123.4	96.8	79.4	45.7	38.3	25.0	5.0	4.8	4.6
<b>5</b>	123.5	95.1	77.9	48.0	38.1	24.5	5.0	4.8	4.5
<b>6</b>	122.4	100.2	78.1	47.6	35.9	24.3	5.1	4.9	4.6
<b>7</b>	121.2	96.5	78.6	46.9	36.5	24.6	5.0	4.9	4.6
<b>8 (U/mL)</b>	129.5	101.9	70.1	47.3	38.8	25.5	5.1	5.1	4.7
<b>mean (U/mL)</b>	125.5	99.3	79.1	47.5	38.2	25.2	5.1	4.9	4.7
<b>SD</b>	4.5	3.1	4.8	0.8	1.5	0.7	0.1	0.2	0.3
<b>CV (%)</b>	3.6	3.2	6.1	1.7	4.0	2.9	2.3	4.8	6.1

### Sensitivity

The limit of quantitation (LOQ) of anti-integrin  $\alpha\beta6$  antibodies was 0.4 U/mL.

A regression equation was developed from the mean value of the measurements and the CV of the dilution series of a low level of anti-integrin  $\alpha\beta6$  antibodies in octuplicate. The LOQ was calculated as the value at CV of 10%.



**Typical Calibration Curve**

---

**References**

---

1. Koivisto L, Bi J, Häkkinen L, Larjava H. Integrin  $\alpha\beta6$ : Structure, function and role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;99:186-96.
2. Kuwada T, Shiokawa M, Kodama Y, Ota S, Kakiuchi N, Nannya Y, et al. Identification of an Anti-Integrin  $\alpha\beta6$  Autoantibody in Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology.* 2021;160(7):2383-94.e21.

MANUFACTURED BY

**MBL** A JSR Life Sciences Company  
MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.  
URL: <https://ivd.mbl.co.jp/>  
E-mail: [kensa@mbl.co.jp](mailto:kensa@mbl.co.jp)