


IDK[®] total α -Klotho ELISA

Zur in-vitro-Bestimmung von Klotho in Serum
For the in vitro determination of klotho in serum

Gültig ab / Valid from 2019-09-17

REF **KR1700**

Σ
96

+2°C  +8°C

RUO



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Probenlagerung</i>	4
<i>Probenvorbereitung</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzwerte</i>	7
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Spike-Wiederfindung</i>	8
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Spezifität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Klotho in Serum geeignet. Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

2. EINLEITUNG

Das Anti-Aging Protein α -Klotho (KL) reguliert die Calciumhomöostase sowie die Phosphathomöostase und zeigt einen Zusammenhang mit verschiedenen Krebserkrankungen. Defekte in Mäusen resultieren in ähnlichen klinischen Merkmalen, wie sie bei Störungen im menschlichen Alterungsprozess gefunden werden.

Das Klotho-Gen kodiert für das KL-Protein und ist auf Chromosom 13 lokalisiert. Es ist aus 5 Exons und 4 Introns zusammengesetzt und hat eine Größe von 50 kb. Die humane Gensequenz sowie die Gensequenz der Maus stimmen zu 98% überein, während die Gensequenz der Ratte nur zu 86% mit der humanen Gensequenz übereinstimmt.

KL existiert in drei Varianten: das membranständige KL, das lösliche KL sowie das sekretierte KL. Alle drei KL-Varianten besitzen eine N-terminale Region, die als Signalpeptid-Domäne fungiert. Diese Signalsequenz besteht aus 33 Aminosäuren, ist reich an hydrophoben Aminosäuren und induziert die KL Translokation aus dem Cytosol zur Membran. Es sind keine posttranslationalen Modifikationen von KL bekannt. Das membranständige KL besteht aus 1012 Aminosäuren (ca. 130 kDa) und setzt sich aus einem Signalpeptid, den beiden Domänen KL1 und KL2 (je ca. 65 kDa) sowie einer 29 Aminosäure langen Transmembrandomäne zusammen. Das lösliche KL entsteht durch die Abspaltung von der Zellmembran und wird unterschieden in zwei verschiedene Spaltprodukte: α -cut und β -cut. Der α -cut beschreibt die Schnittstelle zwischen der KL2-Domäne und der Transmembrandomäne, wodurch das sogenannte lösliche α -cut Produkt entsteht, welches aus den Domänen KL1 und KL2 sowie dem Signalpeptid besteht. Eine weitere Schnittstelle befindet sich zwischen den Domänen KL1 und KL2, wodurch das sogenannte β -cut Produkt entstehen kann, welches nur noch aus der KL1-Domäne gefolgt vom Signalpeptid besteht. Beide Produkte zusammen bilden die als lösliches KL bekannte Form des Proteins, welche sowohl im Blut zirkuliert, als auch im Urin vorkommen kann. Das sekretierte KL wird durch alternatives Spleißen gebildet und besteht mit einer Größe von ca. 65 kDa aus dem Signalpeptid sowie KL1. Das sekretierte KL unterscheidet sich vom löslichen β -cut-KL durch eine 15 Aminosäure lange Sequenz am C-terminalen Ende.

Dieser Test erkennt das lösliche sowie das sekretierte α -Klotho in Serum.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KR1700	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
KR0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10 x	1 x 100 ml
KR1700	STD	Standards, gebrauchsfertig	2 x 6 x 500 µl
KR1700	CTRL	Kontrollen, gebrauchsfertig	2 x 2 x 500 µl
KR1700	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer- konzentrat, 5 x	1 x 15 ml
KR1700	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert	1 x 300 µl
KR1700	CONJBUF	Konjugatverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
KR0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
KR0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an-zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASH-BUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Probenverdünnungspuffers:** Das **Probenverdünnungs-pufferkonzentrat (SAMPLEBUF)** muss vor Gebrauch **1:5** in Reinstwasser ver-dünnt werden (5 ml SAMPLEBUF + 20 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **SAMPLEBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Probenverdünnungspuffer** (1:5 verdünntes SAM-PLIEBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:61** in **Konjugatverdünnungspuffer (CONJBUF)** verdünnt (50 µl CONJ + 3 ml CONJBUF). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Halt-barkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:61 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenlagerung

Serum ist bei -20 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Probenvorbereitung

Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:4** mit Probenverdünnungspuffer verdünnt,

z. B. **100 µl** Probe + **300 µl** Probenverdünnungspuffer, gut mischen.

Je 100 µl jeder vorbereiteten Probe werden im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Klotho. Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA-Technik. Es werden zwei ausgewählte monoklonale Antikörper, die humanes Klotho erkennen, verwendet.

Teststandards und verdünnte Proben, die auf Klotho zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen monoklonalen anti-Klotho-Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Klotho vom gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Anschließend wird mit dem Konjugat (peroxidasemarkierter monoklonaler anti-Klotho-Antikörper) inkubiert und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes Klotho – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Klotho-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gege-

benheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	Je 100 µl Standards und Proben in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 h bei 2–8 °C inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln* inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	20–30 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
11.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die lineare Regression:

1. Lineare Regression

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Serumproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 4** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)

Die Reproduzierbarkeit von zwei Ergebnissen innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Zwei Proben wurden 20-mal im IDK® total α-Klotho-ELISA von einer Person angesetzt.

Probe	α-Klotho [ng/ml]	VK [%]
1	4,1	5,8
2	2,6	9,0

Inter-Assay (n = 23)

Die Reproduzierbarkeit von zwei Ergebnissen an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft. Zwei Proben wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im IDK® total α-Klotho-ELISA gemessen.

Probe	α-Klotho [ng/ml]	VK [%]
1	4,4	13,9
2	11,3	15,3

Spike-Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen α-Klotho-Mengen versetzt und gemessen (n = 2).

Probe	Ungespikete Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	α-Klotho erwartet [ng/ml]	α-Klotho gemessen [ng/ml]
A	12,7	6,0	18,7	18,7
	12,7	3,0	15,7	14,9
	12,7	1,5	14,2	13,5
B	1,5	6,0	7,5	7,7
	1,5	3,0	4,5	4,4
	1,5	1,5	3,0	3,3

Wiederfindung in der Verdünnung

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Zwei Patientenproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2)

Probe	Verdünnung	α -Klotho erwartet [ng/ml]	α -Klotho gemessen [ng/ml]
A	1:3		5,06
	1:4	3,80	3,99
	1:5	3,04	3,52
	1:6	2,53	2,65
	1:7	2,17	2,21
	1:8	1,90	1,72
	1:9	1,69	1,64
B	1:3		5,34
	1:4	4,01	4,32
	1:5	3,21	3,50
	1:6	2,67	2,60
	1:7	2,29	2,32
	1:8	2,00	1,79
	1:9	1,78	1,79

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 0,093 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 0,173 ng/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 0,173 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 25 % VK.

Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die α -Klotho-Reaktivität:

- | | |
|---------------------------|-------|
| • Maus- α -Klotho | 77,0% |
| • humanes β -Klotho | 0% |

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.

- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST












- Für die Qualitätskontrolle sind die für Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Rotondi, S. et al., 2015. Soluble α -Klotho Serum Levels in Chronic Kidney Disease. *International journal of endocrinology*, **2015**, p.872193.
2. Koizumi, M., Komaba, H. & Fukagawa, M., 2013. Parathyroid function in chronic kidney disease: role of FGF23-Klotho axis. *Contributions to nephrology*, **180**, pp.110–23.
3. Shimamura, Y. et al., 2012. Serum levels of soluble secreted α -Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis. *Clinical and experimental nephrology*, **16**(5), pp.722–9.
4. John, G.B., Cheng, C.-Y. & Kuro-o, M., 2011. Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, **58**(1), pp.127–34.

5. Kuro-o, M., 2008. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biological chemistry*, **389**(3), pp.233–41.
6. Kuro-o, M. et al., 1997. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, **390**(6655), pp.45–51.
7. Hu, M.C., Kuro-o, M. & Moe, O.W., 2014. αKlotho and vascular calcification: an evolving paradigm. *Current opinion in nephrology and hypertension*, **23**(4), pp.331–9.
8. Hu, M.C. et al., 2011. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, **22**(1), pp.124–36.
9. Xu, Y. & Sun, Z., 2015. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. *Endocrine reviews*, **36**(2), pp.174–93.
10. Martín-Núñez, E. et al., 2014. Implications of Klotho in vascular health and disease. *World journal of cardiology*, **6**(12), pp.1262–9.
11. Kitagawa, M. et al., 2013. A decreased level of serum soluble Klotho is an independent biomarker associated with arterial stiffness in patients with chronic kidney disease. K. Jandeleit-Dahm, ed. *PLoS one*, **8**(2), p.e56695.
12. Silver, J., Rodriguez, M. & Slatopolsky, E., 2012. FGF23 and PTH--double agents at the heart of CKD. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, **27**(5), pp.1715–20.
13. Hu, M.C., Kuro-o, M. & Moe, O.W., 2013. Klotho and chronic kidney disease. *Contributions to nephrology*, **180**, pp.47–63.
14. Vervloet, M.G. et al., 2014. The role of klotho on vascular calcification and endothelial function in chronic kidney disease. *Seminars in nephrology*, **34**(6), pp.578–85.

Verwendete Symbole:

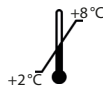
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	Nur für Forschungszwecke		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

IDK[®] total α -klotho ELISA

For the in vitro determination of klotho in serum

Valid from 2019-09-17

REF **KR1700**



RUO



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
<i>Sample storage</i>	19
<i>Sample preparation</i>	19
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Test procedure</i>	20
8. RESULTS	21
9. LIMITATIONS	22
10. QUALITY CONTROL	22
<i>Reference range</i>	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Specificity</i>	22
<i>Spiking Recovery</i>	23
<i>Precision and reproducibility</i>	23
<i>Dilution recovery</i>	23
<i>Analytical Sensitivity</i>	24
12. PRECAUTIONS	24
13. TECHNICAL HINTS	25
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	25
15. REFERENCES	26

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of klotho in serum. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

2. INTRODUCTION

The anti-aging protein α -Klotho (KL) regulates the calcium homeostasis, the phosphate homeostasis and is associated with various forms of cancer. Defects in mice resulted in similar clinical features as observed in disorders in the human aging process.

The klotho gene codes for the KL protein and is located at chromosome 13. It consists of 5 exons and 4 introns with a total size of 50 kb. 98% of the human and the mouse gene sequence conform with each other, whilst the rat sequence conforms with only 86% of the human sequence.

KL exists in three different variants: membrane-bound KL, soluble KL and secreted KL. All three variants have an N-terminal region which serves as signal peptide domain. This signal sequence consists of 33 amino acids (aa), is rich in hydrophobic amino acids and induces the translocation of KL from the cytosol to the membrane. No posttranslational modifications of KL are known. Membrane-bound KL with a length of 1012 aa (about 130 kDa) consists of a signal peptide, the domains KL1 and KL2 (each about 65 kDa) and a transmembrane domain of 29 aa. Soluble KL originates from the cleavage of KL from the cell membrane resulting in two different cleavage products, α -cut and β -cut. The α -cut is the cutting site between the KL2 domain and the transmembrane domain giving rise to the so called α -cut product consisting of the domains KL1 and KL2 and the signal peptide. Another cutting site is located between the domains KL1 and KL2 giving rise to the so called β -cut product consisting only from the KL1 domain followed by the signal peptide. Together, both products form the protein variant known as soluble klotho which is circulating in blood and can also be found in urine. Secreted KL (about 65 kDa) originates from alternative splicing and consists of the signal peptide and KL1. Secreted KL differs from the soluble β -cut by a sequence of 15 aa at its C-terminal end.

This test detects soluble and secreted α -klotho in serum.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KR1700	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
KR0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
KR1700	STD	Standards, ready-to-use	2 x 6 x 500 µl
KR1700	CTRL	Control, ready-to-use	2 x 2 x 500 µl
KR1700	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer concentrate	1 x 15 ml
KR1700	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 300 µl
KR1700	CONJBUF	Conjugate dilution buffer, ready-to-use	1 x 15 ml
KR0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
KR0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.

- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37°C. The **WASHBUF** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8°C for 1 month**.
- **Preparation of the sample dilution buffer:** The **sample dilution buffer concentrate (SAMPLEBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:5** before use (5 ml SAMPLEBUF + 20 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37°C. The **SAMPLEBUF** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Sample dilution buffer** (1:5 diluted SAMPLEBUF) can be stored in a closed flask at **2–8°C for 1 month**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:61** in **conjugate dilution buffer** (e.g. 50 µl CONJ + 3 ml CONJBUF). The CONJ is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:61 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8°C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Serum can be stored at -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Sample preparation

Serum samples must be diluted **1:4** with sample dilution buffer (SAMPLEBUF) before performing the assay,

e.g. **100 µl** sample + **300 µl** SAMPLEBUF, mix well.

Pipet **100 µl** of each prepared sample per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of klotho. The assay utilises the sandwich technique with two selected monoclonal antibodies that bind to human klotho.

Assay standards and pre-diluted samples which are assayed for human klotho are added into the wells of a microplate coated with a high affine monoclonal anti-human klotho antibody. During the first incubation step, klotho is bound by the immobilised antibody. Then the peroxidase-labelled conjugate is added into each microtiter well and a sandwich of capture antibody – human klotho – peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of klotho. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standard. Klotho present in the patient samples is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash each well 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl standards and samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate 1 h at 2–8 °C .

4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) in each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 h at room temperature on a horizontal shaker* .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8.	Add 100 µl TMB substrate (SUB) in each well.
9.	Incubate for 20–30 minutes** at room temperature in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) and mix well.
11.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using linear regression.

1. Linear regression

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Serum samples

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 4** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard should be further diluted and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Reference range

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to α -Klotho. The specificity is calculated in percent, based on the cross-reactivity of these compounds with the anti- α -Klotho antibody compared to the α -Klotho antigen:

- mouse α -Klotho 77.0%
- human β -Klotho 0%

Spiking Recovery

Two samples were spiked with different α-Klotho concentrations and measured using this assay (n = 2).

Sample	Unspiked Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	α-Klotho expected [ng/ml]	α-Klotho measured [ng/ml]
A	12.7	6.0	18.7	18.7
	12.7	3.0	15.7	14.9
	12.7	1.5	14.2	13.5
B	1.5	6.0	7.5	7.7
	1.5	3.0	4.5	4.4
	1.5	1.5	3.0	3.3

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

The reproducibility of two results in one measurement series was evaluated. Two samples were analysed 20 times by one person using the IDK® total α-Klotho ELISA.

Sample	α-Klotho [ng/ml]	CV [%]
1	4.1	5.8
2	2.6	9.0

Inter-Assay (n = 23)

The reproducibility of two results at different days was evaluated. Two samples were analysed at different days by different persons using the IDK® total α-Klotho ELISA.

Sample	α-Klotho [ng/ml]	CV [%]
1	4.4	13.9
2	11.3	15.3

Dilution recovery

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

Two patient samples were diluted and analysed. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	α-Klotho expected [ng/ml]	α-Klotho measured [ng/ml]
A	1:3		5.06
	1:4	3.80	3.99
	1:5	3.04	3.52
	1:6	2.53	2.65
	1:7	2.17	2.21
	1:8	1.90	1.72
	1:9	1.69	1.64
B	1:3		5.34
	1:4	4.01	4.32
	1:5	3.21	3.50
	1:6	2.67	2.60
	1:7	2.29	2.32
	1:8	2.00	1.79
	1:9	1.78	1.79

Analytical Sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB 0.093 ng/ml

Limit of detection, LoD 0.173 ng/ml

Limit of quantitation, LoQ 0.173 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 25% CV.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for research use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.

- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE












- The guidelines for laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Rotondi, S. et al., 2015. Soluble α-Klotho Serum Levels in Chronic Kidney Disease. *International journal of endocrinology*, **2015**, p.872193.
2. Koizumi, M., Komaba, H. & Fukagawa, M., 2013. Parathyroid function in chronic kidney disease: role of FGF23-Klotho axis. *Contributions to nephrology*, **180**, pp.110–23.
3. Shimamura, Y. et al., 2012. Serum levels of soluble secreted α-Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis. *Clinical and experimental nephrology*, **16**(5), pp.722–9.
4. John, G.B., Cheng, C.-Y. & Kuro-o, M., 2011. Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, **58**(1), pp.127–34.
5. Kuro-o, M., 2008. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biological chemistry*, **389**(3), pp.233–41.
6. Kuro-o, M. et al., 1997. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, **390**(6655), pp.45–51.
7. Hu, M.C., Kuro-o, M. & Moe, O.W., 2014. αKlotho and vascular calcification: an evolving paradigm. *Current opinion in nephrology and hypertension*, **23**(4), pp.331–9.
8. Hu, M.C. et al., 2011. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, **22**(1), pp.124–36.
9. Xu, Y. & Sun, Z., 2015. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. *Endocrine reviews*, **36**(2), pp.174–93.
10. Martín-Núñez, E. et al., 2014. Implications of Klotho in vascular health and disease. *World journal of cardiology*, **6**(12), pp.1262–9.
11. Kitagawa, M. et al., 2013. A decreased level of serum soluble Klotho is an independent biomarker associated with arterial stiffness in patients with chronic kidney disease. K. Jandeleit-Dahm, ed. *PloS one*, **8**(2), p.e56695.
12. Silver, J., Rodriguez, M. & Slatopolsky, E., 2012. FGF23 and PTH--double agents at the heart of CKD. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, **27**(5), pp.1715–20.
13. Hu, M.C., Kuro-o, M. & Moe, O.W., 2013. Klotho and chronic kidney disease. *Contributions to nephrology*, **180**, pp.47–63.

14. Vervloet, M.G. et al., 2014. The role of klotho on vascular calcification and endothelial function in chronic kidney disease. *Seminars in nephrology*, **34**(6), pp.578–85.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	For research use only		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		