

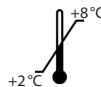
# IDK<sup>®</sup> β-Klotho ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von β-Klotho  
in Serum*

*For the in vitro determination of β-klotho  
in serum*

Gültig ab / Valid from 2022-05-24

**REF** KR1720



**RUO**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzwerte</i>	7
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	8
12. TECHNISCHE MERKMALE	8
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	9
14. LITERATUR	9

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von β-Klotho aus Serumproben geeignet. Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

## 2. EINLEITUNG

Das β-Klotho-codierende Gen KLB befindet sich auf Chromosom 4 und hat 5 Exons und 4 Introns mit einer Länge von 44,6kB. Das Protein besteht aus 1044 Aminosäuren und setzt sich aus einer extrazellulären Domäne (996 AS), einer Transmembrandomäne (20 AS) sowie einer topologischen Domäne (26 AS), die ins Zytoplasma ragt, zusammen [1]. Insgesamt sind 11 potentielle Glykosylierungsstellen über die extrazelluläre Domäne verteilt.

B-Klotho ist ein Typ-1-Transmembranprotein und spielt eine wichtige Rolle für den Signalweg der endokrinen Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF). Endokrine FGFs sind zirkulierende Hormone und übernehmen eine zentrale Aufgabe bei metabolischen Prozessen in vielen Gewebearten. B-Klotho dient als Ko-Rezeptor für die Bindung von FGF 19 und FGF21 an den FGF-Rezeptor (FGFR) 1c und 4. FGF21 stimuliert die Insulinsensitivität und spielt eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus und Gewichtsverlust [2]. FGF 19 reguliert die Gallensäuresynthese sowie die Lipogenese [3]. Die Kristallstruktur von freiem sowie ligandgebundenem β-Klotho wird von *Lee et al.* beschrieben. B-Klotho dient dabei als ein ‚Zip-code‘-ähnlicher Rezeptor und ist die Signalsequenz für FGF21 [4].

B-Klotho wird primär in enterohepatischem Gewebe (Leber, Pankreas, etc.) exprimiert und weist zudem ein hohes Expressionslevel in braunem und weißem Fettgewebe auf [5]. Im Hypothalamus sowie im Hirnstamm wurde ein niedrigerer Expressionsgrad festgestellt.

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KR1720	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
KR0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
KR1720	AB	Detektionsantikörperkonzentrat (2. Antikörper, monoklonal)	1 x 200 µl
KR1720	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert	1 x 300 µl

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KR1720	STDKONZ	Standardkonzentrat (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	2 x 20 µl
KR1720	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
KR1720	STDBUF	Standardpuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
KR1720	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 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 10–1 000 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 2 x 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 WASHBUF + 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.
- **Herstellung der Standardkurve:** Die **Herstellung der Standardkurve sowie die Konzentrationen und Bereiche** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Standards** (verdünntes STDKONZ) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- **Vorbereitung des Detektionsantikörpers:** Das **Detektionsantikörperkonzentrat (AB)** wird vor Gebrauch **1:61** in **Assaypuffer** verdünnt (200 µl AB + 12 ml ASYBUF). Das **AB** ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Detektionsantikörper** (1:61 verdünntes AB) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:41** in **Assaypuffer** verdünnt (300 µl CONJ + 12 ml ASYBUF). Das **CONJ** ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:41 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

Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern.

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

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

**100 µl** der Verdünnung werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von β-Klotho in Serum.

Standards und vorbereitete Proben, die auf β-Klotho zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem anti-β-Klotho-Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt wird β-Klotho aus der Probe vom Primärantikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Dann wird ein mit Biotin markierter anti-β-Klotho-Antikörper zugegeben. Der nächste Schritt ist die Zugabe des Streptavidin-POX-Konjugats, es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte:

1. Antikörper – β-Klotho – biotinylierter Antikörper – Streptavidin-POX-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 β-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/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.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen <b>vor Gebrauch 3x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	<b>100 µl Standards/verdünnte Proben</b> in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und <b>4 h</b> bei (2–8°C) inkubieren.

4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>3 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	<b>100 µl Detektionsantikörper</b> (verdünntes AB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und <b>2 h</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>3 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	<b>100 µl Konjugat</b> (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	Streifen abdecken und <b>20 min</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>3 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	<b>100 µl Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
12.	<b>10–20 min*</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.
13.	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
14.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

\* 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 4-Parameter-Funktion:



### 1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

### 2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

### 3. Gewichtete Spline-Funktion

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.

### Serum

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, welche nicht eindeutig interpretierbar sind (z. B. aufgrund hoher Variationskoeffizienten der Replikate), sollten wiederholt werden.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur wissenschaftlichen Forschung verwendet werden.
- Es 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 gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

**Achtung:** Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- 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.

## 12. 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 der 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 dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

### 13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST













- Für die Qualitätskontrolle sind die für Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK*<sup>®</sup> ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- 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.

### 14. LITERATUR

1. Díaz-Delfín, Julieta, Elayne Hondares, Roser Iglesias, Marta Giral, Carme Caelles, and Francesc Villarroya. 2012. "TNF-α Represses β-Klotho Expression and Impairs FGF21 Action in Adipose Cells: Involvement of JNK1 in the FGF21 Pathway." *Endocrinology* **153** (9): 4238–45.
2. Ito, S, S Kinoshita, N Shiraishi, S Nakagawa, S Sekine, T Fujimori, and Y I Nabeshima. 2000. "Molecular Cloning and Expression Analyses of Mouse Betaklotho, Which Encodes a Novel Klotho Family Protein." *Mechanisms of Development* **98** (1–2): 115–19.
3. Ito, Shinji, Toshihiko Fujimori, Akiko Furuya, Junko Satoh, Yoko Nabeshima, and Yo-ichi Nabeshima. 2005. "Impaired Negative Feedback Suppression of Bile Acid Synthesis in Mice Lacking BetaKlotho." *The Journal of Clinical Investigation* **115** (8): 2202–8.

4. Lee, Sangwon, Jungyuen Choi, Jyotidarsini Mohanty, Leiliane P Sousa, Francisco Tome, Els Pardon, Jan Steyaert, Mark A Lemmon, Irit Lax, and Joseph Schlessinger. 2018. "Structures of β-Klotho Reveal a 'Zip Code'-like Mechanism for Endocrine FGF Signalling." *Nature* **553** (7689): 501–5.
5. Ogawa, Yasushi, Hiroshi Kurosu, Masaya Yamamoto, Animesh Nandi, Kevin P Rosenblatt, Regina Goetz, Anna V Eliseenkova, Moosa Mohammadi, and Makoto Kuro-o. 2007. "BetaKlotho Is Required for Metabolic Activity of Fibroblast Growth Factor 21." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** (18): 7432–37.

### Verwendete Symbole:

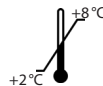
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

# **IDK<sup>®</sup> $\beta$ -Klotho ELISA**

*For the in vitro determination of  $\beta$ -klotho  
in serum*

Valid from 2022-05-24

**REF** **KR1720**



**RUO**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>13</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>13</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>14</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>14</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>15</b>
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>15</b>
<i>Principle of the test</i>	15
<i>Test procedure</i>	16
<b>8. RESULTS</b>	<b>17</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>18</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>18</b>
<i>Reference range</i>	18
<b>11. PRECAUTIONS</b>	<b>18</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>19</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>19</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>20</b>

## 1. INTENDED USE

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

## 2. INTRODUCTION

The β-klotho gene KLB is located on chromosome 4 and counts 5 exons as well as 4 introns with a length of 44.6kB. The protein consists of 1044 amino acids and is composed of an extracellular domain (996 aa), a transmembrane domain (20 aa) as well as a topological domain (26 aa) which reaches into the cytoplasm [1]. There are 11 potential glycosylation sites along the extracellular domain of β-klotho.

B-klotho is a type 1 single-pass transmembrane protein and plays an important role in endocrine fibroblast growth factor (FGFs) signalling. Endocrine FGFs are circulating hormones that are crucial for critical metabolic processes in a lot of tissues. B-klotho acts as a co-receptor for the binding of FGF19 and FGF21 to fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1c and 4. FGF21 stimulates insulin sensitivity and plays an important role in energy expenditure and weight loss [2]. FGF19 regulates the bile acid synthesis as well as the lipogenesis [3]. Lee et al. described the crystal structures of free and ligand-bound β-klotho. B-klotho serves as a 'zip-code'-like receptor acting as a targeting signal for FGF21 [4].

B-klotho is primarily expressed in tissue of enterohepatic origin (liver, pancreas, etc.) and has high expression levels in brown and white adipose tissues [5]. The expression is lower in the hypothalamus and the brainstem.

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KR1720	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
KR0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
KR1720	AB	Detection antibody concentrate (secondary antibody, monoclonal)	1 x 200 µl
KR1720	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 300 µl
KR1720	STDKONZ	Standard concentrate (see specification for concentration)	2 x 20 µl

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KR1720	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	1 x 50 ml
KR1720	STDBUF	Standard buffer, ready-to-use	1 x 15 ml
KR1720	SAMPLEBUF	Samplebuffer, ready-to-use	1 x 50 ml
KR0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
KR0003.15	STOP	Stopp 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 10–1 000 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 2 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 (100ml WASHBUF + 900ml 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 standard curve: Preparation of the standard curve** as well as **concentrations and ranges** are given in the **specification data sheet**. **Standards** (diluted STDKONZ) **are not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the detection antibody:** Before use, the **detection antibody concentrate (AB)** has to be diluted **1:61** in **assay buffer** (200 µl AB + 12 ml ASYBUF). The **AB** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Detection antibody** (1:61 diluted AB) **is not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:41** in **assay buffer** (300 µl CONJ + 12 ml ASYBUF). The **CONJ** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:41 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

For longer storage, serum samples should be stored at -20 °C.

Serum samples must be diluted **1:4** before performing the assay,

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

**100 µl** of the dilution are used in the test.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This ELISA is designed for the quantitative determination of β-klotho in serum.

Assay standards and pre-diluted samples which are assayed for β-klotho are added into the wells of a microplate coated with an anti-β-klotho antibody. During the first incubation step, klotho is bound to the plate by the immobilised primary antibody. Then, a biotin-labelled anti-β-klotho antibody is added. In the next step, the streptavidine-peroxidase-labelled conjugate is added into each microtiter well and the following complex is formed at the wall of the plate: primary antibody – β-klotho – biotinylated antibody - streptavidine-peroxidase-conjugate. 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. β-klotho, present in the 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/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 expiry date stated on the label.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	<b>Before use</b> , wash the wells <b>3 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each <b>100 µl standards/diluted samples</b> into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for <b>4 h</b> at 2–8 °C.
4.	Discard the content of each well and wash <b>3 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add <b>100 µl detection antibody</b> (diluted AB) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for <b>2 h</b> at room temperature (15–30 °C).
7.	Discard the content of each well and wash <b>3 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add <b>100 µl conjugate</b> (diluted CONJ) into each well.
9.	Cover the strips and incubate for <b>20 min</b> at room temperature (15–30 °C).
10.	Discard the content of each well and wash <b>3 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
11.	Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.

12.	Incubate for <b>10–20 min*</b> at room temperature (15–30 °C) in the <b>dark</b> .
13.	Add <b>100 µl stop solution (STOP)</b> into each well and mix well.
14.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> against 620 nm as a reference.

\* 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 the 4 parameter algorithm.

### 1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

### 2. Point-to-point calculation

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

### 3. Spline algorithm

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

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

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

## 9. LIMITATIONS

Samples which cannot be clearly interpreted (e.g. because of high coefficients of variation of replicates) should be measured again.

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG 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 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. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for research use only.
- 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 harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic color reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

**Warning:** Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still should 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.
- *IDK*<sup>®</sup> is a trademark of Immundiagnostik AG.
- 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. Díaz-Delfín, Julieta, Elayne Hondares, Roser Iglesias, Marta Giralt, Carme Caelles, and Francesc Villarroya. 2012. "TNF- $\alpha$  Represses  $\beta$ -Klotho Expression and Impairs FGF21 Action in Adipose Cells: Involvement of JNK1 in the FGF21 Pathway." *Endocrinology* **153** (9): 4238–45.
2. Ito, S, S Kinoshita, N Shiraishi, S Nakagawa, S Sekine, T Fujimori, and Y I Nabeshima. 2000. "Molecular Cloning and Expression Analyses of Mouse Betaklotho, Which Encodes a Novel Klotho Family Protein." *Mechanisms of Development* **98** (1–2): 115–19.
3. Ito, Shinji, Toshihiko Fujimori, Akiko Furuya, Junko Satoh, Yoko Nabeshima, and Yo-Ichi Nabeshima. 2005. "Impaired Negative Feedback Suppression of Bile Acid Synthesis in Mice Lacking BetaKlotho." *The Journal of Clinical Investigation* **115** (8): 2202–8.
4. Lee, Sangwon, Jungyuen Choi, Jyotidarsini Mohanty, Leiliane P Sousa, Francisco Tome, Els Pardon, Jan Steyaert, Mark A Lemmon, Irit Lax, and Joseph Schlessinger. 2018. "Structures of  $\beta$ -Klotho Reveal a 'Zip Code'-like Mechanism for Endocrine FGF Signalling." *Nature* **553** (7689): 501–5.
5. Ogawa, Yasushi, Hiroshi Kurosu, Masaya Yamamoto, Animesh Nandi, Kevin P Rosenblatt, Regina Goetz, Anna V Eliseenkova, Moosa Mohammadi, and Makoto Kuro-o. 2007. "BetaKlotho Is Required for Metabolic Activity of Fibroblast Growth Factor 21." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** (18): 7432–37.

**Used symbols:**

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant

## **Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

[info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

