

ITEA ダニアレルゲン (Der f2) ELISA キット (抗体固相化済)

コード : 10208

ダニアレルゲン (Der f2)

コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) 第2 アレルゲン (Der f2) はダニ虫体および排泄物に含まれる分子量 14000 のタンパク質である。この Der f 2 に対してダニアレルギー患者の 90%以上が IgE 抗体を保有することから、アレルゲンとしての重要性は Der f 1 と同様と考えられている。Der f 2 は Der f 1 とは異なり、熱や pH 変化に対して抵抗性を示すが、ジスルフィド結合を切断すると IgE 抗体との反応性が大きく低下する。このことより、Der f 2 のエピトープも高次構造に依存していると推定されている。<sup>1)</sup>

1) 安枝 浩. 1. ダニアレルゲンの免疫生物学とアレルギー疾患. アレルギー. 2008, 57, 7, 807-815.

キット概要

測定範囲 5 – 0.08 ng/mL、定量下限濃度は 0.16 ng/mL、反応時間 2 時間 15 分で Der f 2 の測定が可能です。本キットは、ハウスダスト中の Der f 2 測定、食品原材料におけるダニ混入の検査、アレルゲン低減化効果の検証などに適しています。なお、本キットは研究用試薬です。

試薬構成

|   | 内容                      | 容量                    |
|---|-------------------------|-----------------------|
| A | 抗体固相化済マイクロプレート (96 ウェル) | 8 ウェル×12 ストリップ (2 分包) |
| B | Der f 2 標準液 (凍結乾燥)      | 1 本 (4 回測定分)          |
| C | 酵素標識抗 Der f 2 抗体        | 12 mL×1 本             |
| D | 発色基質液 (TMB)             | 12 mL×1 本             |
| E | 反応停止液 (0.5M 硫酸)         | 12 mL×1 本             |
| F | 希釈液 (検体・試薬用)            | 30 mL×2 本             |
| G | 洗浄液 (20 倍濃縮液)           | 30 mL×1 本 (600 mL 分)  |
|   | マイクロプレート用シール            | 3 枚                   |
|   | 取り扱い説明書および SDS          | 各 1 部                 |

別途必要となる試薬・器具

- ・各種マイクロピペット
  - ・マイクロプレートミキサー
  - ・マイクロプレートウォッシャー\*
  - ・マルチチャンネルピペット
  - ・吸光マイクロプレートリーダー (波長 450 nm) および付属解析ソフト
  - ・精製水 (20 倍濃縮洗浄液の調整)
  - ・リザーバーもしくはシャーレ
  - ・1.5 mL 以上のマイクロチューブ
- \*マルチチャンネルピペットでも洗浄可能

キットの保管

2~8℃で保管ください。

使用上の注意

- ・本キットは Der f 2 および Der p 2 に交差反応を示すので、Der f 2 と Der p 2 を含む検体中の Der f 2 濃度を厳密に定量することはできません。
- ・測定前にはすべての試薬を室温に戻し、攪拌してから使用してください。  
洗浄液 (20 倍濃縮液) は、高濃度の塩が含まれているため低温では析出することがあります。その場合は加温して完全に溶解後使用してください。
- ・検量線は Der f 2 標準液を希釈して作製します。毎測定時にプレート毎においてください。  
測定は二重測定してください。
- ・マイクロプレート用シールは 1 回の測定で 1 枚使用してください。  
なお、1 プレートを分けて使用する場合は、ストリップのサイズに合わせてシールを切って使用してください。
- ・Der f 2 標準液 (アレルゲン性あり) および反応停止液 (0.5M 硫酸) (強酸) を取り扱う際は、白衣、防護ゴーグル、マスク、グローブを使用した上で、皮膚および粘膜に付着しないように注意してください。

各試薬の調整

- 抗体固相化済マイクロプレート (A)  
室温に戻してから開封してください。開封後はできるだけ早く使用してください。
- 酵素標識抗 Der f 2 抗体 (C)  
室温に戻して、希釈せずに使用してください。
- 発色基質液 (TMB) (D)  
室温に戻して、そのまま使用してください。
- 反応停止液 (0.5M 硫酸) (E)  
室温に戻して、そのまま使用してください。強酸につき、使用の際には、粘膜、皮膚、衣服などに付着しないように十分に注意してください。
- 希釈液 (検体・試薬用) (F)  
室温に戻して、そのまま使用してください。
- 洗浄液 (20 倍濃縮液) (G)  
精製水で 20 倍に希釈し、1 倍洗浄液として使用してください。  
1 プレート分の測定には、300 mL の 1 倍洗浄液があれば十分です。  
もし、足りない場合は、0.05% Tween20 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で代用可能です。
- Der f 2 標準液 (B)  
Der f 2 標準液 (B) に下表に記載した容量の精製水を分注後、5 分間静置し、完全に溶解したことを確認ください。この溶解液の Der f 2 濃度は 100 ng/mL となります。  
※溶解後は 4°C で保管し、10 日以内に使用してください。

表 1. 標準液のロットと溶解液量

|            |           |
|------------|-----------|
| 標準液ロット No. | SUO060201 |
| 溶解に用いる精製水量 | 132 μL    |

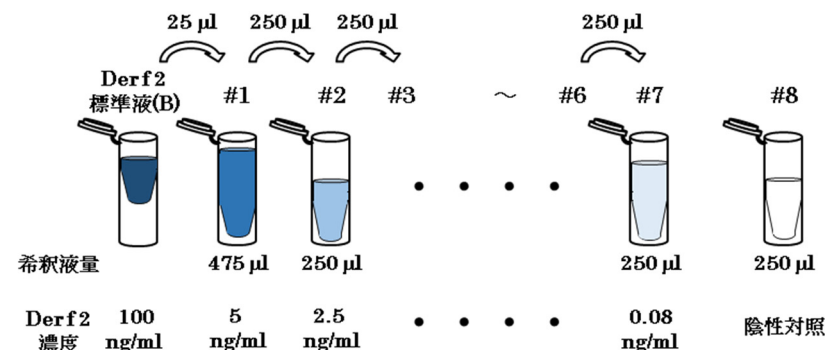
なお、本品はアレルギー性がありますので、皮膚および粘膜に付着しないように注意してください。

標準液の調整

8 本のマイクロチューブを用意し、#1~8 まで番号を付与してください。希釈液 (F) 475 μL を #1 に分注し、Der f 2 標準液 (B) 25 μL を分注しよく攪拌してください (#1 は 5 ng/mL となります)。#2~8 には 250 μL の希釈液 (F) を分注しておきます。

#1 から 250 μL を分取し、#2 に加えよく攪拌してください。同様に #2 から 250 μL を分取し、#3 に加えよく攪拌してください。#7 まで同様に操作すると検量線を作成するための Der f 2 の 2 倍階段希釈列 (5 - 0.08 ng/mL) が調整されます。#8 は Der f 2 を含まない陰性対照として使用してください。

| # | 分注する液量                   | 希釈液量 (F) | Der f 2 終濃度    |
|---|--------------------------|----------|----------------|
| 1 | Der f 2 標準液 (B) から 25 μL | 475 μL   | 5 ng/mL        |
| 2 | #1 から 250 μL             | 250 μL   | 2.5 ng/mL      |
| 3 | #2 から 250 μL             | 250 μL   | 1.25 ng/mL     |
| 4 | #3 から 250 μL             | 250 μL   | 0.63 ng/mL     |
| 5 | #4 から 250 μL             | 250 μL   | 0.31 ng/mL     |
| 6 | #5 から 250 μL             | 250 μL   | 0.16 ng/mL     |
| 7 | #6 から 250 μL             | 250 μL   | 0.08 ng/mL     |
| 8 | なし                       | 250 μL   | 0 ng/mL (陰性対照) |



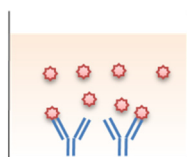
### 検体の調整

検体中の Der f 2 濃度が検量線の範囲に入るように、検体を希釈液 (F) で希釈します。この際、希釈 1 点では検量線外になる可能性が高いので、2 点以上の希釈を置く事が望ましいです。

下図のように、標準液 (#1~7)、陰性対照 (#8)、検体 (S1~S40) は 2 ウェルずつ分注します。

|   | 1  | 2  | 3  | 4  | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|---|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | #1 | #1 | S1 | S1 | S9  | S9  | S17 | S17 | S25 | S25 | S33 | S33 |
| B | #2 | #2 | S2 | S2 | S10 | S10 | S18 | S18 | S26 | S26 | S34 | S34 |
| C | #3 | #3 | S3 | S3 | S11 | S11 | S19 | S19 | S27 | S27 | S35 | S35 |
| D | #4 | #4 | S4 | S4 | S12 | S12 | S20 | S20 | S28 | S28 | S36 | S36 |
| E | #5 | #5 | S5 | S5 | S13 | S13 | S21 | S21 | S29 | S29 | S37 | S37 |
| F | #6 | #6 | S6 | S6 | S14 | S14 | S22 | S22 | S30 | S30 | S38 | S38 |
| G | #7 | #7 | S7 | S7 | S15 | S15 | S23 | S23 | S31 | S31 | S39 | S39 |
| H | #8 | #8 | S8 | S8 | S16 | S16 | S24 | S24 | S32 | S32 | S40 | S40 |

### 測定の手順

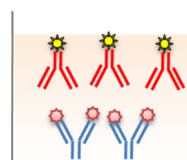


1.標準液&検体  
添加  
捕捉抗体  
Der f 2

- ① Der f 2 標準液、陰性対照および検体を 100  $\mu$ L/ウェル分注します。  
**注意！極力、時間差が発生しないよう迅速に行ってください。**
- ② プレートシールで密封し室温で 1 時間静置します。
- ③ プレートウォッシャーまたはマルチチャンネルピペット\*1 を用いて洗浄液にてウェルを 3 回洗浄します。洗浄後、マイクロプレートを裏返し、ペーパータオル上に 5 回ほど叩きつけてウェル内の残存液を除きます。

### \*マルチチャンネルピペットを用いた洗浄

- (1) ウェル内の液を吸引除去し、(2) 350  $\mu$ L/ウェルの洗浄液を加えます。
  - (3) プレートミキサーを用いて軽く振盪したのち、(4) 洗浄液を吸引除去します。
- この (1) ~ (4) の操作を 3 回繰り返します。マイクロプレートを裏返し、ペーパータオル上に 5 回ほど叩きつけてウェル内の残存液を除きます。



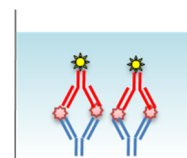
2.酵素標識抗体  
添加



酵素標識抗 Der 2 抗体

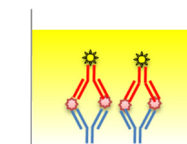
以降の試薬分注にはマルチチャンネルピペットの使用を推奨します。

- ① 酵素標識抗 Der f 2 抗体を 100  $\mu$ L/ウェル分注します。
- ② プレートシールで密封し室温で 1 時間静置します。
- ③ 3 回洗浄し、ウェル内の残存液は除きます。



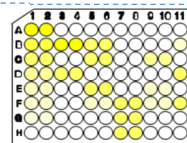
3.発色基質  
添加

- ① 発色基質液 (TMB) を 100  $\mu$ L/ウェル分注します。
- ② プレートシールで密封し遮光しながら室温で 15 分間静置します。  
徐々に青色に発色します。



4.反応停止液  
添加

- ① プレートは洗浄せずに、反応停止液を 100  $\mu$ L/ウェル分注します。  
黄色に変色します。



5.吸光度測定

- ① マイクロプレートリーダーを用い、測定波長 450 nm、参照波長 630 nm で吸光度測定し、エクセルファイルとして出力します。  
(単波長測定では 450 nm を使用します。)

### 検量線と Der f 2 濃度算出

エクセルファイルのデータを次のように処理します。(例：2重測定、1波長の場合)

- ① 450 nm で測定された 2 つのウェルの吸光度の平均をとります。
- ② Der f 2 標準液および各サンプルの平均吸光度からブランクの平均吸光度を差し引きます。  
(これを  $\Delta$ ABS とする)
- ③ Der f 2 標準液の濃度を Y 軸に、 $\Delta$ ABS を X 軸として散布図を描きます。
- ④ 多項式近似曲線 (通常実数 3 次式) を描き、回帰式を求めます。 $R^2$  (決定係数) が 0.99 以上であることを確認します。
- ⑤ 各サンプルの  $\Delta$ ABS を多項式に代入し、Der f 2 濃度を求め、希釈倍数を乗じてサンプル原液の Der f 2 濃度を算出します。

◎マイクロプレートリーダー付属の解析ソフトがある場合は、それを利用して濃度を算出してください。X 軸に Der f 2 濃度、Y 軸に吸光度を設定し、検量線を作成します。検量線のカーブフィットは 4-parameter Logistic か多項式近似を使用します。

検量線に検体の吸光度を当てはめて Der f 2 濃度を算出します。

### 測定性能

#### 測定精度

|       |          |
|-------|----------|
| 日内再現性 | CV < 6 % |
| 日間再現性 | CV < 6 % |
| 室内再現性 | CV < 8 % |

Der f 2 試料液を 3 重×6 回測定し、再現性を評価した。

以上

2022 年 11 月 7 日 (ver. 05)

検量線の例

