

ITEA スギ花粉アレルギー (Cry j 1) 測定用構築型 ELISA キット

(ビオチン標識)

コード : 10301

スギ花粉アレルギー (Cry j 1)

Cry j 1 はスギ (*Cryptomeria japonica*) の成熟花粉の外壁、および表面に付着しているユービッシュ体に局在する質量約 40 kDa の塩基性糖蛋白質¹⁾です。花粉に内在する Cry j 2 と共に、スギ花粉症の主要アレルギーの 1 つとされています。

1) J Allergy Clin Immunol. 1983 Jan;71 (1 Pt 1) :77-86.

キット概要

本キットは、サンドイッチ ELISA によりスギ花粉アレルギー (Cry j 1) を測定するために必要な下記の抗体および標準液で構成されています。後述の測定の手順に準じて実施した時、測定濃度範囲は 10~0.16 ng/mL です。なお、本キットは研究用試薬です。

試薬構成

96 穴マイクロプレート 3 枚分の下記試薬が含まれています。

試薬	内容	本数、仕様など
A	固相化用抗 Cry j 1 モノクローナル抗体 (S10)	1 本 (0.36 mg/mL、 グリセロール 50 %含有 PBS)
B	Cry j 1 標準液	2 本 (凍結乾燥品)
C	ビオチン標識抗 Cry j 1 モノクローナル抗体 (S131)	1 本 (0.18 mg/mL、 0.05 % Tween 20 を含む 1 % BSA-PBS グリセロール 50 %含有)

別途必要となる試薬・器具

- ・マイクロプレート (推奨 : 製品番号 44-2404-21, Thermo Fisher Scientific)
- ・固相化用希釈液 (0.05 M 炭酸-重炭酸緩衝液、pH9.6) *1
- ・洗浄液 (0.05% Tween 20 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS))、pH7.4
- ・ポストコーティング液 (1% 牛血清アルブミン (BSA) 含有 PBS)
- ・希釈液 (1% BSA、0.05% Tween 20 含有 PBS)
- ・ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ (推奨 : 製品番号 S5512、SIGMA-ALDRICH)
- ・発色基質液 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB))
(推奨 : 製品番号 002023、Thermo Fisher Scientific)
- ・反応停止液 (1 M 硫酸)
- ・96 穴マイクロプレート用シール
- ・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

*1 0.05 M 炭酸-重炭酸緩衝液が望ましいですが、PBS でも代用可能です。

※使用する試薬の作製プロトコルは、当社 HP にてご確認いただけます。

キットの保管

2~8°Cで保管ください。

使用上の注意

- ・Cry j 1 検量線は Cry j 1 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 **2 重測定以上** にしてください。
- ・標準液はアレルギー性がありますので、取り扱う際は、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。

Cry j 1 標準液の調整

試薬 B の Cry j 1 標準液に下表に記載した容量の精製水を添加後、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 Cry j 1 濃度は 200 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。

標準液ロット No.	SUQ020801
溶解に用いる精製水量	82 μL

プレート配置例 (2 重測定)

	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	BL	BL	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40

標準液 (#1~7)、ブランク (BL)、サンプル (S1~S40)

測定の手順

本キット試薬以外の各種溶液は室温に戻して使用してください。

① 試薬 A (固相化用抗 Cry j 1 モノクローナル抗体) を、固相化用希釈液を用いて以下の倍率*1 で希釈します。この希釈液を ELISA 用マイクロプレートにウェル当たり 100 μL ずつ分注し、マイクロプレート用シールをしたのち、4°C で一晩静置し抗体を吸着させます。

*1 希釈倍率は、固相化用抗体のロットごとによります。

固相化用抗体 ロット No.	MIP102701
希釈倍率	360 倍

② 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*2 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。

*2 マルチチャンネルピペットを用いた洗浄

- ウェル内の液を吸引除去し、(2) ウェル当たり 350 μL ずつ洗浄液を加えます。
- 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。

③ ポストコーティング液をウェル当たり 200 μL ずつ分注し、マイクロプレート用シールをしたのち、室温で 1 時間静置します。

④ 希釈液を用いて試薬 B (Cry j 1 標準液) を 20 倍に希釈し、10~0.16 ng/mL の範囲で 2 倍階段希釈列を作製します。※ 1.5 mL エッペンドルフチューブなどを用いる。

ng/mL	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16
Cry j 1 標準液	25 μL	250	250	250	250	250	250
希釈液	475 μL	250	250	250	250	250	250

⑤ 各サンプルを希釈液で適当に希釈してください。

(測定上限 10 ng/mL 以下となるように希釈倍数を決定する)

- ⑥ 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を用い、上記②と同様に洗浄液にてウェルを3回洗浄し、ウェル内の残存液を除きます。
- ⑦ 希釈した Cry j 1 標準液、希釈サンプルをそれぞれウェル当たり 100 μ L ずつ分注し、ブランクには希釈液を 100 μ L ずつ分注します。室温で1時間静置します。
- ⑧ 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を用いて洗浄液にてウェルを3回洗浄し、ウェル内の残存液を除きます。
- ⑨ 試薬 C (ビオチン標識抗 Cry j 1 モノクローナル抗体) を、希釈液を用いて以下の倍率*1で希釈し、ウェル当たり 100 μ L ずつ分注し、室温で1時間静置します。

*1 希釈倍率は、ビオチン標識抗体のロットごとに変ります。

ビオチン標識抗体 ロット No.	MIP060801
希釈倍率	4000 倍

- ⑩ 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を用いて上記②と同様に洗浄液にてウェルを3回洗浄し、ウェル内の残存液を除きます。
- ⑪ ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを希釈液で適切な濃度*2に希釈し、ウェル当たり 100 μ L ずつ分注し、室温で1時間静置します。*2 (推奨メーカーでは、4000 倍希釈)
- ⑫ 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を用いて上記②と同様に洗浄液にてウェルを3回洗浄し、ウェル内の残存液を除きます。
- ⑬ 発色基質液をウェル当たり 100 μ L ずつ分注し、遮光し室温で正確に15分間静置します。
- ⑭ 1 M 硫酸をウェル当たり 50 μ L ずつ分注し、プレートミキサーで攪拌します。
- ⑮ 各穴に気泡や汚れがないか確認し、少なくとも5分以内に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 Cry j 1 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)

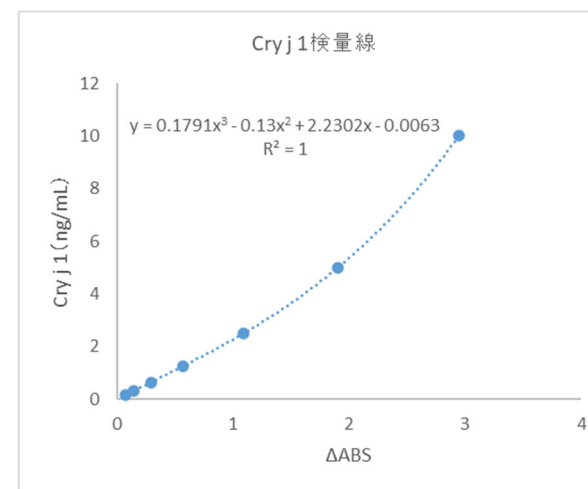
- ① 450 nm で測定された2つのウェルの吸光度の平均をとります。
- ② Cry j 1 標準液および各サンプルの平均吸光度からブランクの平均吸光度を差し引きます。(これを Δ ABS とする)
- ③ Cry j 1 標準液の濃度を Y 軸に、 Δ ABS を X 軸として散布図を描きます。
- ④ 多項式近似曲線 (通常実数3次式) を描き、回帰式を求めます。 R^2 (決定係数) が 0.99 以上であることを確認します。
- ⑤ 各サンプルの Δ ABS を多項式に代入し、Cry j 1 濃度を求め、希釈倍数を乗じてサンプル原液の Cry j 1 濃度を算出します。

◎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 Cry j 1 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 Cry j 1 濃度を算出します。

検量線の例



以上

2023年4月28日 (ver. 04)