

**商品名:** Cry j 1 ELISA Kit <スギ花粉抗原 Cry j 1 ELISA Kit>

**商品コード:** DS800

本品は研究用試薬です

**キットの内容:**

|               | コンポーネント                                  | 容量                   |
|---------------|--|----------------------|
| Box 1 (-20°C) | ① Cry j 1 Detection Antibody             | 200 µl               |
|               | ② Cry j 1 Standard Solution              | 200 µl (100 ng/ml)   |
| Box 2 (4°C)   | ③ Dilution Buffer                        | 100 ml               |
|               | ④ Antibody coated Microplate for Cry j 1 | 96 wells(8 × 12)/1 枚 |
|               | ⑤ Substrate Solution (TMB)               | 12 ml                |
|               | ⑥ Extraction Buffer                      | 100 ml               |
|               | ⑦ Stop Solution                          | 20 ml                |
|               | ⑧ Wash Buffer (10 × )                    | 100 ml               |
|               | ⑨ Plate Seal                             | 3 枚                  |

※①Cry j 1 Detection Antibody、②Cry j 1 Standard Solution は凍結融解を避けるため、初回使用時に全量をあらかじめ小分けに分注し、-20°Cで保管してください。

**保存条件:**

Box 1、Box 2 ともに-20°Cでお届けします。本製品をお受け取りになりましたら、それぞれ下記の温度で保管してください。

Box 1: -20°C

Box 2: 4°C

※Box 2 の試液類(③、⑤、⑥、⑦、⑧)は解凍後よく攪拌し、沈殿等が無いか確認してご使用ください。

**使用期限:**

6ヶ月

**製品説明:**

本製品は日本スギ花粉(*Cryptomeria japonica*)の主要アレルゲンの1つであるCry j 1の濃度をサンドイッチ法により測定するELISAキットです。測定範囲は0.01~2.56 ng/mlです。反応時間(合計)2時間10分で測定可能です。

**性能と特徴:**

・測定範囲:0.01~2.56 ng/ml

一般的なCry j 1 検出 ELISA キットと反応時間(合計)は同等で、より高感度な測定が可能です

<各社 Cry j 1 ELISA キットの比較>

|                 | 本製品        | A 社         | B 社        | C 社        |
|-----------------|------------|-------------|------------|------------|
| 測定感度<br>(定量下限値) | 0.01 ng/ml | 0.156 ng/ml | 0.16 ng/ml | 0.25 ng/ml |
| 反応時間(合計)        | 2 時間 10 分  | 2 時間 20 分   | 2 時間 15 分  | 3 時間 10 分  |

- ・併行精度(日内変動): CV<10%、室内再現精度(日間変動): CV<10%  
精度の高い測定が可能です
- ・特異性: Cry j 2 (10 ng/ml)において反応は見られず、Cry j 1 を特異的に検出できます

#### 本製品以外に必要な試薬、器具、機器等:

- ・超純水: ⑧Wash Buffer (10×) の調製に使用します
  - ・メスピペット、ピペッター
  - ・マイクロピペット、チップ
  - ・8 連または 12 連マルチチャンネルピペット、チップ
  - ・ポリプロピレン製のマイクロチューブ、遠沈管  
(ガラス製を使用すると、抗原や抗体が吸着し、分析に影響を与える場合がありますので、タンパク質が吸着しにくいポリプロピレン製をご使用ください)
  - ・リザーバーまたは角形シャーレ(プラスチック製)
  - ・ペーパータオル
  - ・マイクロプレートリーダー: 測定波長 450 nm および 620 nm
- ※あると便利な機器: プレートウォッシャー、プレートシェーカー

#### 試薬の調製:

- ① Cry j 1 Detection Antibody: HRP 標識抗 Cry j 1 抗体  
凍結融解を避けるため、初回使用時に全量をあらかじめ小分けに分注し、  
-20°Cで保管してください。  
必要量を③Dilution Buffer で 100 倍希釈してご使用ください。  
希釈後はその日のうちにご使用いただき、凍結保存はしないでください。
- ② Cry j 1 Standard Solution: Cry j 1 標準溶液  
※アレルゲン性があるため、取り扱いには十分ご注意ください  
凍結融解を避けるため、初回使用時に全量をあらかじめ小分けに分注し、  
-20°Cで保管してください。  
必要量を③Dilution Buffer で希釈調製してください。  
希釈後はその日のうちにご使用いただき、凍結保存はしないでください。

測定範囲は 0.01~2.56 ng/ml です。下表は 2 倍希釈系列の一例です。

例)

|      | 作製する濃度<br>(ng/ml) | Cry j 1 Standard Solution 量                           | Dilution Buffer 量 |
|------|-------------------|---|-------------------|
| I    | 2.56              | Cry j 1 Standard Solution 原液(100 ng/ml)を 12.8 $\mu$ l | 487.2 $\mu$ l     |
| II   | 1.28              | I を 250 $\mu$ l                                       | 250 $\mu$ l       |
| III  | 0.64              | II を 250 $\mu$ l                                      | 250 $\mu$ l       |
| IV   | 0.32              | III を 250 $\mu$ l                                     | 250 $\mu$ l       |
| V    | 0.16              | IV を 250 $\mu$ l                                      | 250 $\mu$ l       |
| VI   | 0.08              | V を 250 $\mu$ l                                       | 250 $\mu$ l       |
| VII  | 0.04              | VI を 250 $\mu$ l                                      | 250 $\mu$ l       |
| VIII | 0 (Blank)         | なし  | 250 $\mu$ l       |

- ③ Dilution Buffer: 希釈液  
室温に戻して、そのまま使用してください。
- ④ Antibody coated Microplate for Cry j 1: 抗体固相化 96 ウェルプレート  
使用するストリップのみ取り出し、室温に戻してから使用してください。  
使用しないストリップはシールされた状態のまま 4°C で保管してください。
- ⑤ Substrate Solution (TMB): 基質液(TMB)  
室温に戻して、そのまま使用してください。
- ⑥ Extraction Buffer: 抽出緩衝液  
室温に戻して、そのまま使用してください。
- ⑦ Stop Solution: 反応停止液(1N 硫酸)  
**※強酸のため、取り扱いには十分ご注意ください**  
室温に戻して、そのまま使用してください。
- ⑧ Wash Buffer(10×): 洗浄液(10×)  
室温に戻し、必要量を超純水で **10 倍希釈**して使用してください。  
希釈後はその日のうちにご使用いただき、余った場合は保存せずに廃棄してください。
- ⑨ Plate Seal: プレートシール  
剥離紙を剥がし、粘着面をプレート上面に向けて貼ってください。  
一度使用した Plate Seal は再利用しないでください。

#### 捕集試料の抽出処理:

1. 適当な方法で花粉を含む試料を捕集します
2. 捕集した試料に対して、十分量(※)の⑥Extraction Buffer を添加します  
※⑥Extraction Buffer の添加量については、20 倍量(w/v)を目安に添加してください
3. 室温で 30 分攪拌します
4. 遠心分離またはフィルター濾過(0.45 μm)で不溶解物を取り除いた後、検体として測定に用います

#### 【注意】

- ・抽出した検体は速やかに測定に用いてください  
保存する場合は凍結融解を避けるため小分けに分注し、-80°C で保管してください
- ・抽出した検体に濁りや不溶解物がある場合は除去してから測定に用いてください
- ・⑥Extraction Buffer や上記の抽出処理方法は、全ての試料に対して完全な抽出を保証するものではありません

#### 検体の調製:

測定に用いる検体は、Cry j 1 濃度が検量線の範囲内に入るように③Dilution Buffer で希釈してください。また、検量線の範囲内に入る確率を高めるため、希釈は 1 点だけでなく、2 点以上設定することをお勧めします。

## 測定方法:

### (1) ウェルの準備

希釈した Wash Buffer (1×) を 1 ウェルあたり 250  $\mu$ l ずつ添加し、プレートを水平に軽く揺らしたあと、逆さにしてウェル内の液を捨てます。

この操作を 3 回繰り返したあと、プレートを逆さにし、ペーパータオルなどに数回叩きつけて液を完全に除去します。

### (2) Cry j 1 Standard Solution と検体の添加

調製した②Cry j 1 Standard Solution と検体を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l ずつ添加します。

### (3) 室温で 1 時間静置

⑨Plate Seal で上面をシールし、水平に軽く揺らした<sup>\*1</sup> 後、室温(20~30℃)で 1 時間 静置します。

#### 【注意】

<sup>\*1</sup> Plate Seal に液が跳ね上がらないよう注意して、円を描くようにプレートを水平方向に 30 秒ほどゆっくりと揺らし、液を攪拌してください。

プレートシェーカーを用いる場合、500~700rpm (Plate Seal に液が跳ね上がらない程度の速さ)で 30 秒ほど攪拌してください。

### (4) ウェルの洗浄 (3 回)

⑨Plate Seal をゆっくり剥がし<sup>\*2</sup>、添加した②Cry j 1 Standard Solution と検体を除去します。希釈した Wash Buffer (1×) を 1 ウェルあたり 250  $\mu$ l ずつ添加し、プレートを水平に軽く揺らしたあと、逆さにしてウェル内の液を捨てます。

この操作を 3 回繰り返したあと、プレートを逆さにし、ペーパータオルなどに数回叩きつけて液を完全に除去します。

#### 【注意】

<sup>\*2</sup> Plate Seal を剥がす際には、ウェル内の液が飛び散って他のウェルに混入しないように、注意しながら剥がしてください。

### (5) Cry j 1 Detection Antibody の添加

調製した①Cry j 1 Detection Antibody を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l ずつ添加します。

### (6) ⑨Plate Seal で上面をシールし、水平に軽く揺らした<sup>\*3</sup> 後、室温(20~30℃)で 1 時間 静置します。

#### 【注意】

<sup>\*3</sup> Plate Seal に液が跳ね上がらないよう注意して、円を描くようにプレートを水平方向に 30 秒ほどゆっくりと揺らし、液を攪拌してください。

プレートシェーカーを用いる場合、500~700rpm (Plate Seal に液が跳ね上がらない程度の速さ)で 30 秒ほど攪拌してください。

(7) ウェルの洗浄(3回)

⑨Plate Seal をゆっくり剥がし<sup>\*4</sup>、添加した①Cry j 1 Detection Antibody を除去します。希釈した Wash Buffer(1×) を1 ウェルあたり 250 μl ずつ添加し、プレートを水平に軽く揺らしたあと、逆さにしてウェル内の液を捨てます。

この操作を3回繰り返したあと、プレートを逆さにし、ペーパータオルなどに数回叩きつけて液を完全に除去します。

【注意】

<sup>\*4</sup> Plate Seal を剥がす際には、ウェル内の液が飛び散って他のウェルに混入しないように、注意しながら剥がしてください。

(8) Substrate Solution (TMB)の添加

室温に戻した⑤Substrate Solution (TMB)を1 ウェルあたり 100 μl ずつ添加します。

(9) 室温(20~30℃)で 10分 静置

Cry j 1 が検出されたウェルは徐々に青色に発色します。

(10) Stop Solution の添加

(8)で添加した⑤Substrate Solution (TMB)は除去せずに、室温に戻した⑦Stop Solution を1 ウェルあたり 100 μl ずつ添加し、発色反応を停止させます。Stop Solution を添加すると液が青色から黄色に変化します。

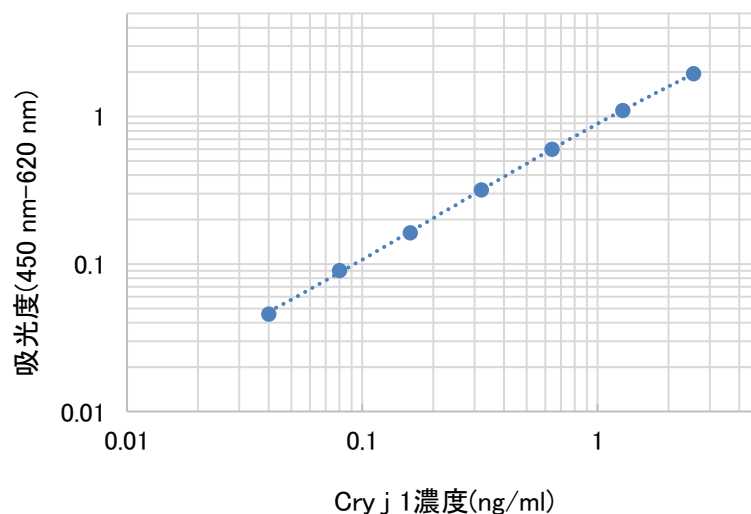
(11) 吸光度測定

マイクロプレートリーダーで吸光度を測定します。波長:450 nm (副波長:620 nm)

**Cry j 1 濃度の算出:**

Cry j 1 Standard Solution の吸光度の値から検量線を作成します。(下図は一例です)作成した検量線に基づいて、検体の吸光度から Cry j 1 濃度を算出します。

例)



トラブルシューティング:

| 問題点                | 考えられる原因                              | 注意点  |
|--------------------|--------------------------------------|--|
| バックグラウンドが高い        | 洗浄が不十分                               | 洗浄液の添加量、洗浄回数が正しく行われていることを確認してください。また、洗浄後はプレート逆さにし、ペーパータオルなどに数回叩きつけて液を完全に除去してください。  |
|                    | 反応温度が高い                              | 室温(20~30℃)であることを確認してください。  |
|                    | Substrate Solution (TMB) 添加後の反応時間が長い | 「測定方法」に記載の通りの反応時間で実施してください。  |
|                    | ウェルの乾燥                               | 洗浄後はウェルが乾燥しないように速やかに次の操作(溶液の添加)を行ってください。また、次に添加する溶液は洗浄前までに事前に調製してください。<br>室温 1 時間静置するときは必ずプレートシールを貼り、ウェル内の溶液の蒸発を防止してください。  |
| ばらつきが大きい (CV 値が高い) | ウェルへの添加量にばらつきがある                     | ピペットは校正されたものを使用してください。また、マルチチャンネルピペットを使用する際は、全チップが溶液を正しく吸えているか確認してウェルに添加してください。  |
|                    | プレートや試薬類の温度を室温に戻さず使用                 | 室温に戻して使用するプレートや試薬類(③Dilution Buffer、⑤Substrate Solution (TMB)、⑥Extraction Buffer、⑦Stop Solution、⑧Wash Buffer(10×))は、実験開始の約 2 時間前を目安に冷蔵庫から出し、使用する前に必ず室温に戻っているか確認してください。 |
|                    | 溶液の濃度が不均一                            | 検体や試薬類は濃度が均一となるよう、よく混和してからウェルに添加してください。特に、試薬類を解凍したあとは、濃度が均一となるようによく混和し、沈殿等が無いことを確認してから使用してください。  |
|                    | 洗浄が不十分                               | 全ウェルを正しく洗浄できているか確認してください。特に洗浄をマルチチャンネルピペットで行う場合、全チップが洗浄液を正しく吸えているか確認してウェルに添加してください。また、洗浄後はプレート逆さにし、ペーパータオルなどに数回叩きつけて液を完全に除去してください。                                     |
|                    | 近接するウェルへの溶液の混入                       | ウェルに溶液を添加する際やプレートシールを剥がす際などに、溶液が跳ねて近接するウェルに混入する可能性がありますので慎重に操作を行ってください。  |
|                    | ウェルの乾燥                               | 洗浄後はウェルが乾燥しないように速やかに次の操作(溶液の添加)を行ってください。また、次に添加する溶液は洗浄前までに事前に調製してください。<br>室温 1 時間静置するときは必ずプレートシールを貼り、ウェル内の溶液の蒸発を防止してください。  |
| 得られる吸光度が全体的に低い     | 標準溶液や検体、試薬の添加忘れ                      | 標準溶液や検体、試薬が「測定方法」通りに正しく添加されているか確認してください。   |

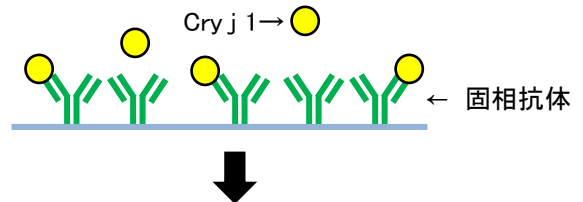
|                      |  |
|----------------------|--|
| 試薬の劣化                | 試薬は保存条件や使用期限を守ってご使用ください。<br>標準溶液や標識抗体は繰り返しの凍結融解を行わないでください。   |
| プレートや試薬類の温度を室温に戻さず使用 | 室温に戻して使用するプレートや試液類(③Dilution Buffer、⑤Substrate Solution (TMB)、⑥Extraction Buffer、⑦Stop Solution、⑧Wash Buffer(10×))は、実験開始の約2時間前を目安に冷蔵庫から出し、使用する前に必ず室温に戻っているか確認してください。 |
| 反応時間が短い              | 「測定方法」に記載の通りの反応時間で実施してください。  |
| 酵素反応が阻害された可能性        | アジ化ナトリウムは HRP を失活させるため、防腐剤として検体などに含まれていないか確認してください。  |

### 測定の原理:

本製品はサンドイッチ法により Cry j 1 濃度を比色定量します。

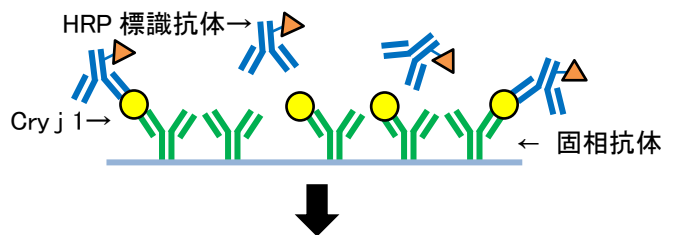
#### <1. 固相抗体と Cry j 1 の反応>

抗 Cry j 1 抗体が固相されたプレートに Cry j 1 を含む標準溶液や検体を添加すると、固相抗体と Cry j 1 が結合します。



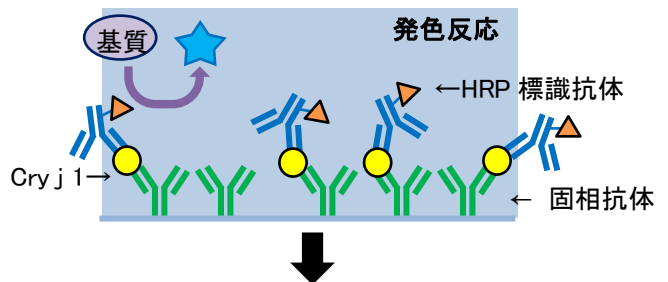
#### <2. Cry j 1 と HRP 標識抗体の反応>

HRP 標識した抗 Cry j 1 抗体 (HRP 標識抗体) を添加すると、固相抗体と結合した Cry j 1 に結合します。

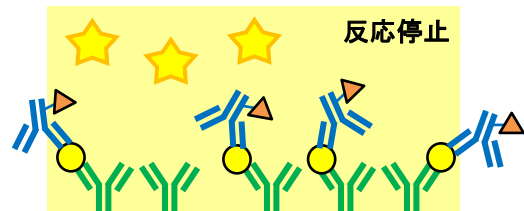


#### <3. 発色反応・反応停止>

基質液 (TMB) を添加すると、基質液 (TMB) が HRP により酸化され、青色に発色します。



反応停止液を添加すると、青色から黄色に変化します。



#### <4. 吸光度測定>

吸収波長 450 nm (副波長 620 nm) における吸光度を測定します。得られた標準溶液の吸光度から検量線を作成し、検体の Cry j 1 濃度を算出します。

## 測定方法の概略:

### ●準備

・プレートや試薬類を室温に戻す: **実験開始の約 2 時間前を目安に冷蔵庫から出してください**

<事前に室温に戻す試薬類>

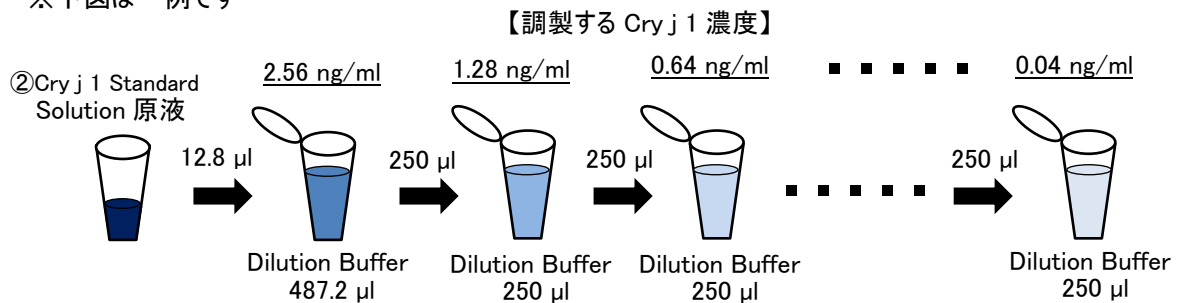
③Dilution Buffer、④Antibody coated Microplate for Cry j 1⑤Substrate Solution (TMB)、

⑥Extraction Buffer、⑦Stop Solution、⑧Wash Buffer(10×)

・⑧Wash Buffer(10×)の希釈:必要量を超純水で **10 倍希釈**してください

・②Cry j 1 Standard Solution の希釈:必要量を③Dilution Buffer で希釈してください

※下図は一例です



・①Cry j 1 Detection Antibody の希釈:必要量を③Dilution Buffer で **100 倍希釈**してください

### ●測定方法

室温に戻した④Antibody coated Microplate for Cry j 1

↓

希釈した Wash Buffer(1×)で 250 µl /ウエル×3 回洗浄

↓

希釈した②Cry j 1 Standard Solution、検体を 100 µl /ウエル添加

↓

室温(20~30°C)で 1 時間静置

↓

希釈した Wash Buffer(1×)で 250 µl /ウエル×3 回洗浄

↓

希釈した①Cry j 1 Detection Antibody を 100 µl /ウエル添加

↓

室温(20~30°C)で 1 時間静置

↓

希釈した Wash Buffer(1×)で 250 µl /ウエル×3 回洗浄

↓

⑤Substrate Solution (TMB)を 100 µl /ウエル添加

↓

室温(20~30°C)で 10 分静置

↓

⑦Stop Solution を 100 µl /ウエル添加

↓

吸光度測定(主波長 450 nm、副波長 620 nm)