

## ITEA 卵白アルブミン (OVA) ELISA キット (抗体固相化済)

コード : 10203

### キット概要

本キットは鶏卵由来の OVA (Ovalbumin) を測定する ELISA キットです。測定範囲 0.78~50 ng/ml、反応時間 2 時間 15 分で OVA の測定が可能となっております。

OVA は鶏卵の卵白を構成する分子量 44 kDa の蛋白質です。卵アレルギーにおける主要アレルゲンの 1 つとされ、WHO/IUIS のアレルゲンデータベースでは Gal d 2 として登録されております。また、OVA は免疫・アレルギーの基礎研究において、モデル抗原として広く用いられております。本キットは免疫・アレルギー研究における OVA 測定に適しております。

なお、本キットは研究用試薬です。

### キット内容物一覧

	試薬構成	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	OVA 標準液	150 $\mu$ l
C	酵素標識抗 OVA 抗体	12 ml×1 本
D	発色基質液 (TMB)	12 ml×1 本
E	反応停止液 (1N 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

- ・精製水 (20 倍濃縮洗浄液の調整)
  - ・メスピペットおよびピペッター
  - ・マイクロピペット (2~20  $\mu$ l、20~200  $\mu$ l、200~1000  $\mu$ l) およびピペットチップ
  - ・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
- \*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°C で保管

### 使用上の注意

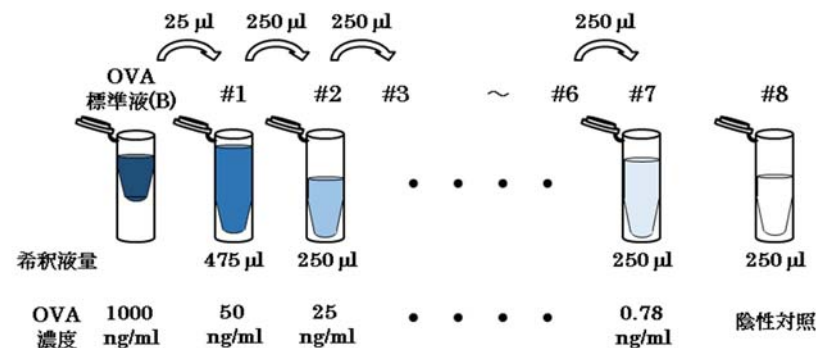
- ・測定前にはすべての試薬を室温に戻し、攪拌してから使用する。洗浄液 (20 倍濃縮液) は、高濃度の塩が含まれているため低温では析出することがある。その場合は加温して完全に溶解後使用する。
- ・検量線は測定毎に作製し、測定は二重測定で行う。
- ・マイクロプレート用シールは 1 回の測定で 1 枚使用する。なお、1 プレートに分けて使用する場合は、ストリップのサイズに合わせてシールを切って使用する。
- ・OVA 標準液 (アレルゲン性あり) および反応停止液 (1N 硫酸) (強酸) を取り扱う際は、白衣、防護ゴーグル、マスク、グローブを使用した上で、皮膚および粘膜に付着しないように注意する。

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する。開封後はできるだけ早く使用する。
- 酵素標識抗 OVA 抗体 (C)  
室温に戻して、希釈せずに使用する。
- 発色基質液 (TMB) (D)  
室温に戻して、そのまま使用する。
- 反応停止液 (1N 硫酸) (E)  
室温に戻して、そのまま使用する。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する。
- 希釈液 (検体・試薬用) (F)  
室温に戻して、そのまま使用する。
- 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。  
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ある。  
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。  
なお、本品はアレルギー性があるので、皮膚および粘膜に付着しないように注意する。

8 本のマイクロチューブを用意し、#1~8 まで番号を付与する。希釈液 (F) 475  $\mu$ l を #1 に分注し、OVA 標準液 (B) 25  $\mu$ l を添加しよく攪拌する (#1 は 50 ng/ml となる)。#2~8 には 250  $\mu$ l の希釈液 (F) を分注しておく。#1 から 250  $\mu$ l を分取し、#2 に加えよく攪拌する。同様に #2 から 250  $\mu$ l を分取し、#3 に加えよく攪拌する。#7 まで同様に操作すると検量線を作成するための OVA の 2 倍階段希釈列 (50~0.78 ng/ml) が調整される。#8 は OVA を含まない陰性対照として使用する。

#	添加する液量	希釈液量 (F)	OVA 終濃度
1	OVA 標準液 (B) から 25 $\mu$ l	475 $\mu$ l	50 ng/ml
2	#1 から 250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	25 ng/ml
3	#2 から 250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	12.5 ng/ml
4	#3 から 250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	6.25 ng/ml
5	#4 から 250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	3.13 ng/ml
6	#5 から 250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	1.56 ng/ml
7	#6 から 250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	0.78 ng/ml
8	なし	250 $\mu$ l	0 ng/ml (陰性対照)



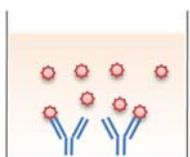
検体の調整

検体中の OVA 濃度が検量線の範囲に入るように、検体を希釈液 (F) で希釈する。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。

下図のように、標準液 (#1~7)、陰性対照 (#8)、検体 (S1~S40) は 2 ウェルずつ添加する。



	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



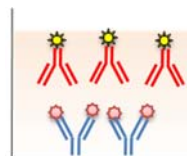
1.標準液&検体  
添加

- ① OVA 標準液、陰性対照および検体を 1 ウェル当たり 100 μl 添加  
**注意！極力、時間差が発生しないよう迅速に行う。**
- ② プレートシールで密封し室温で 1 時間静置
- 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\*を用いて  
ウェルを 3 回洗浄 (ウェル内の残存液は除く)

 捕捉抗体  OVA

\*マルチチャンネルピペットを用いた洗浄


ウェル内の液を棄て、1 ウェル当たり 350 μl の洗浄液を加え、ウェル内の液を棄てる。これを 3 回繰り返す。洗浄後、マイクロプレートを裏返しにして、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く。

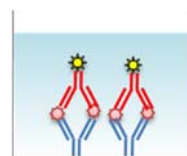


2.酵素標識抗体  
添加

以降の試薬添加にはマルチチャンネルピペットの使用を推奨。

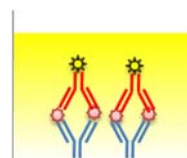
- ① 酵素標識抗 OVA 抗体を 100 μl/ウェル添加
- ② プレートシールで密封し室温で 1 時間静置
- ③ 3 回洗浄 (ウェル内の残存液は除く)

 酵素標識抗 OVA 抗体



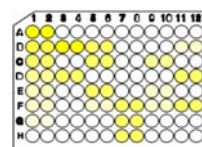
3.発色基質  
添加

- ① 発色基質液 (TMB) を 100 μl/ウェル添加
- 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
- ③ 徐々に青色に発色



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 μl/ウェル添加
- ② 黄色に変色

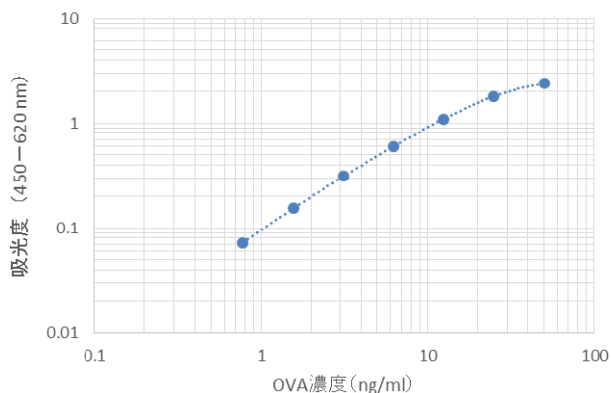


5.吸光度測定

- ① マイクロプレートリーダーで吸光度 (波長 450 nm) を測定  
リファレンス用は 620~630 nm を使用 (リファレンスが無くても測定可能)
- ② マイクロプレートリーダー付属の解析ソフトウェアで濃度算出

検量線と OVA 濃度算出

マイクロプレートリーダー付属の解析ソフト上で、X 軸に OVA 濃度、Y 軸に吸光度を設定し、検量線を作成する。検量線のカーブフィットは 4-parameter logistic か 3 次式を使用する。検量線に検体の吸光度を当てはめて OVA 濃度を算出する。



検量線 : 50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78 ng/ml

定量下限 : 1.56 ng/ml、 検出限界 : 0.78 ng/ml

測定性能

測定再現性

日内再現性	CV < 5 %
日差再現性	CV < 4 %

同時及び日差再現性は、検出下限、中間、上限付近の 3 濃度 (1.2, 4.8, 33.5 ng/ml) の OVA 溶液について完全枝分かれ型分析法に基づいて実施し、一元配置分散分析により分析した。

添加回収試験

各種血清および細胞培養液 (10%ウシ胎仔血清添加 RPMI および DMEM) を検体に用いて OVA の添加回収試験を行った。血清および 10%ウシ胎仔血清添加細胞培養液は 10 倍希釈で、回収率 94.5~105.2 % であった。この結果から、血清または培養液中の OVA を測定する際は、検体を 10 倍以上希釈すれば正確に測定することが示された。

検体	希釈率	回収率(%)	
正常血清	マウス	10 倍	96.5
	ラット	10 倍	97.6
	ヒト	10 倍	94.5
	ウサギ	10 倍	103.5
	イヌ	10 倍	103.1
	ウシ胎仔	10 倍	105.2
細胞培養液 (10%ウシ胎仔血清添加)	RPMI	10 倍	99.5
	DMEM	10 倍	103.7

参考文献

◆細胞株に発現させた OVA 測定に関する文献◆

Shimizu, Kanako et al. "Systemic DC Activation Modulates the Tumor Microenvironment and Shapes the Long-Lived Tumor-Specific Memory Mediated by CD8+ T Cells." *Cancer Research* 76.13 (2016): 3756-3766.  
Shimizu, Kanako et al. "Vaccination with Antigen-Transfected, NKT Cell Ligand-Loaded, Human Cells Elicits Robust In Situ Immune Responses by Dendritic Cells." *Cancer research* 73.1 (2013): 62-73.

◆血中 OVA 濃度測定に関する文献◆

Sae-Wong, Chutha et al. "Topical skin treatment with Fab fragments of an allergen-specific IgG1 monoclonal antibody suppresses allergen-induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice." *European journal of pharmacology* 779 (2016): 131-137.  
Tanabe, Kana et al. "Antigen exposure in the late light period induces severe symptoms of food allergy in an OVA-allergic mouse model." *Scientific reports* 5 (2015).  
Yamamoto, Takeshi, et al. "Oral tolerance induced by transfer of food antigens via breast milk of allergic mothers prevents offspring from developing allergic symptoms in a mouse food allergy model." *Clinical and Developmental Immunology* 2012 (2012). Article ID 721085, 9.

◆本キットの概要に関する文献◆

蔵田圭吾, 白井秀治. 生物材料や細胞培養液中の鶏卵由来卵白アルブミン濃度を測定するための ELISA キットの開発、アレルギーの臨床 2012; 32: 177-180.

以上

2018 年 12 月 19 日 (ver. 02)