

ITEA ダニアレルゲン (Der f 1) ELISA キット (抗体固相化済)

コード : 10205

キット概要

本キットは、0.47~30 ng/ml の Der f 1 が測定できる ELISA キットです。反応時間 2 時間 15 分で測定が可能となっており、ハウスダスト中の Der f 1 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。

Der f 1 はコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae* : DF) の消化酵素に由来する分子量 25 kDa のシステインプロテアーゼであり、DF に対して IgE 陽性を示す成人のうち 87% は Der f 1 に IgE 陽性<sup>1)</sup> と感作率が高いことから主要アレルゲンとされています。

なお、本キットは研究用試薬です。

1) J Immunol. 1986 Nov 1;137(9):2841-7.

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	Der f 1 標準液 (凍結乾燥)	2 本 (4 回測定分)
C	酵素標識抗 Der f 1 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、標準液の溶解)
  - ・メスピペットおよびピペッター
  - ・マイクロピペット (2~20 µl、20~200 µl、200~1000 µl) 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。
- ・Der f 1 標準液 (凍結乾燥) を溶解する液量はロット毎に異なるので、確認したうえで溶解する。
- ・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する。
- ・Der f 1 標準液 (凍結乾燥) (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 Der f 1 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。

・Der f 1 標準液 (B)

表 1 記載の容量の精製水を Der f 1 標準液 (B) に添加し完全に溶解するまでよく攪拌すると、Der f 1 濃度 600 ng/ml となる。

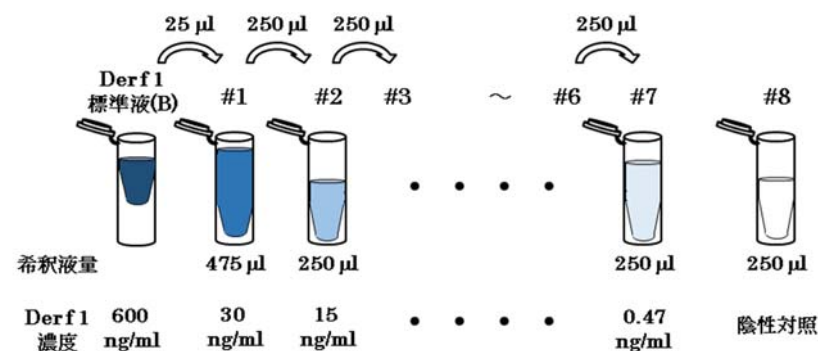
表 1. 標準液のロットと溶解液量

標準液ロット No.	KUJ10DF1ST192
溶解に用いる精製水量	67.2 μl

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 μl を #1 に分注し、溶解した Der f 1 標準液 (B) 25 μl を添加しよく攪拌する (#1 は 30 ng/ml となる)。#2~8 には 250 μl の希釈液 (F) を分注しておく。#1 から 250 μl を分取し、#2 に加えよく攪拌する。同様に #2 から 250 μl 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 Der f 1 の 2 倍階段希釈列 (30~0.47 ng/ml) が調整される。#8 は Der f 1 を含まない陰性対照として使用する。なお、溶解した Der f 1 標準液 (B) は 4℃ で保管し、10 日以内に使用する。

#	添加する液量	希釈液量 (F)	Der f 1 終濃度
1	Der f 1 標準液 (B) から 25 μl	475 μl	30 ng/ml
2	#1 から 250 μl	250 μl	15 ng/ml
3	#2 から 250 μl	250 μl	7.5 ng/ml
4	#3 から 250 μl	250 μl	3.75 ng/ml
5	#4 から 250 μl	250 μl	1.88 ng/ml
6	#5 から 250 μl	250 μl	0.94 ng/ml
7	#6 から 250 μl	250 μl	0.47 ng/ml
8	なし	250 μl	0 ng/ml (陰性対照)



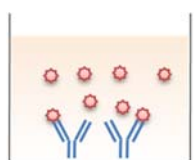
検体の調整

検体中の Der f 1 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

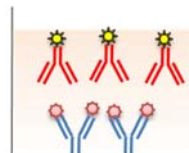


1.標準液&検体  
添加

- ① Der f 1 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    Der f 1

※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。

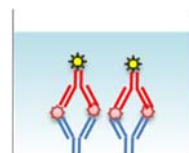


2.酵素標識抗体  
添加

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。

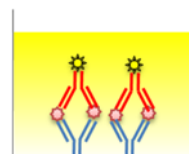
- ① 酵素標識抗 Der f 1 抗体を 100 μl/ウェル添加
- ② プレートシールで密封し室温で 1 時間静置
- ③ 3 回洗浄 (ウェル内の残存液は除く)

酵素標識抗 Der f 1 抗体



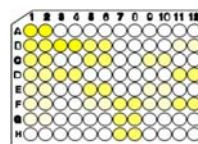
3.発色基質  
添加

- 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

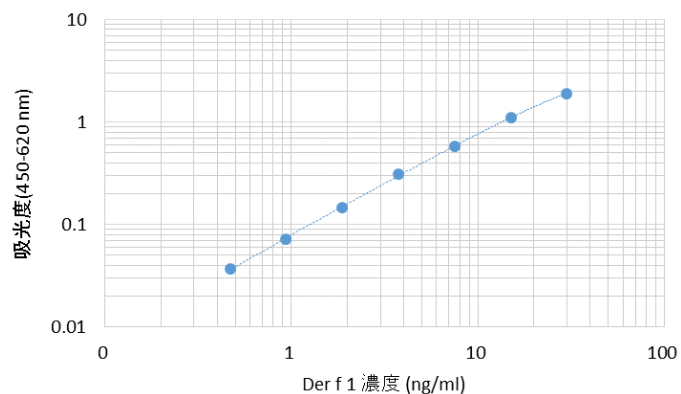


5.吸光度測定

- 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 Der f 1 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 Der f 1 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 Der f 1 濃度を算出する。



検量線 : 30、15、7.5、3.75、1.88、0.94、0.47 ng/ml

定量下限 : 0.94 ng/ml、 検出限界 : 0.47 ng/ml

### 測定性能

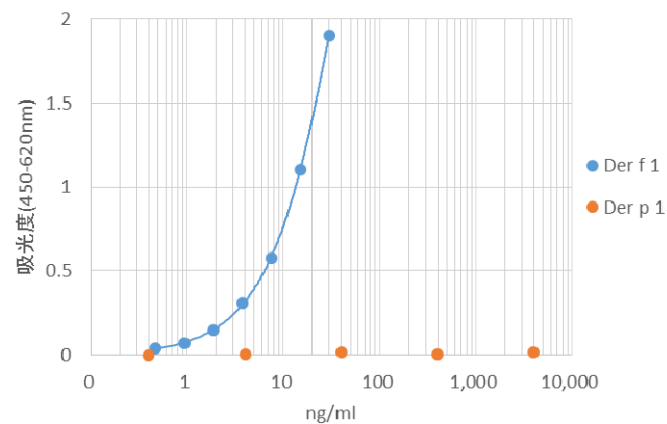
#### 測定再現性

日内再現性	CV < 6%
日差再現性	CV < 3%

濃度の異なる 5 検体の Der f 1 濃度を独立して 3 回測定し、本 ELISA の日差および日内再現性を評価した。

### 特異性

本 ELISA においては、Der p 1 (0.4、4、40、400、4000 ng/ml) に対する反応は認められず、Der f 1 を特異的に測定できることが確認された。



以上

2018 年 12 月 19 日 (ver. 02)