

スギ花粉抗原 ELISA Kit 「Cry j2」

本試薬は、添付文書をよく読んでから使用してください。
本試薬は研究用試薬であり、臨床診断には使用できません。

本キットはスギ(*Cryptomeria japonica*)花粉抗原の1つである Cry j2 に特異的なモノクローナル抗体(T27)及びポリクローナル抗体を利用したサンドイッチ ELISA 法を原理としています。
本キットを用いることにより、試料中の Cry j2 を特異的に測定することができます。

【キットの構成】

	構成試薬	容量	数量
A	抗体固相化マイクロプレート	8 ウェル	12 ストリップ
B	Cry j2 標準品(乾燥品)(320 ng/mL)	-	1 本
C	濃縮 HRP 標識抗体溶液	0.2 mL	1 本
D	酵素基質溶液(TMB 溶液)	12 mL	1 本
E	反応停止溶液(1 mol/L 塩酸)	12 mL	1 本
F	標準品溶解液	0.5 mL	1 本
G	5 倍濃縮反応緩衝液	40 mL	1 本
H	5 倍濃縮洗浄液	50 mL	2 本
I	プレートシール	-	3 枚

*【各試薬の調製方法】

1. 反応緩衝液の調製

5 倍濃縮反応緩衝液(G)を必要量分取し、精製水で 5 倍に希釈して調製してください。
調製後の溶液を、検体、標準原液の希釈、標準曲線用ブランクに使用します。
調製後は速やかに使用してください。

2. HRP 標識抗体溶液の調製

反応緩衝液 100 容積に対し、濃縮 HRP 標識抗体溶液(C)を 1 容積添加し、十分に攪拌し、HRP 標識抗体溶液として使用します。
(調製例: 反応緩衝液; 6 mL+濃縮 HRP 標識抗体溶液; 60 μ L)
使用時に必要量を調製し、速やかに使用してください。

3. 洗浄液の調製

5 倍濃縮洗浄液(H)を必要量分取し、精製水で 5 倍に希釈して調製してください。
調製後の溶液をマイクロプレートウェルの洗浄に使用します。
調製後は速やかに使用してください。

4. Cry j2 標準溶液の調製

1) Cry j2 標準品(B)のバイアルに標準品溶解液(F)を 500 μ L 添加し、試験管ミキサー等を用いて、1 分間攪拌します。目視により溶解されていることを確認してください。
溶解が不十分な場合は、更に 1 分間攪拌してください。

○ 調製した Cry j2 標準原液(320 ng/mL)は以下の条件で保存できます。

2~8°C で保存する場合:

調製後 1 週間以内に使用してください。

凍結保存(-20°C 以下)の場合:

長期保存する場合は、1 回分の使用量に小分けし、凍結融解の繰り返しを避けて使用してください。なお、調製後-20°C で凍結保

存した Cry j2 標準原液について、1 ヶ月間安定であることを確認しています。

2) 調製した Cry j2 標準原液と、上記 1. で調製した反応緩衝液を用いて、160 ng/mL から 10 ng/mL までの 2 倍希釈系列を調製します。
ブランク(0 ng/mL)は、反応緩衝液を用います。

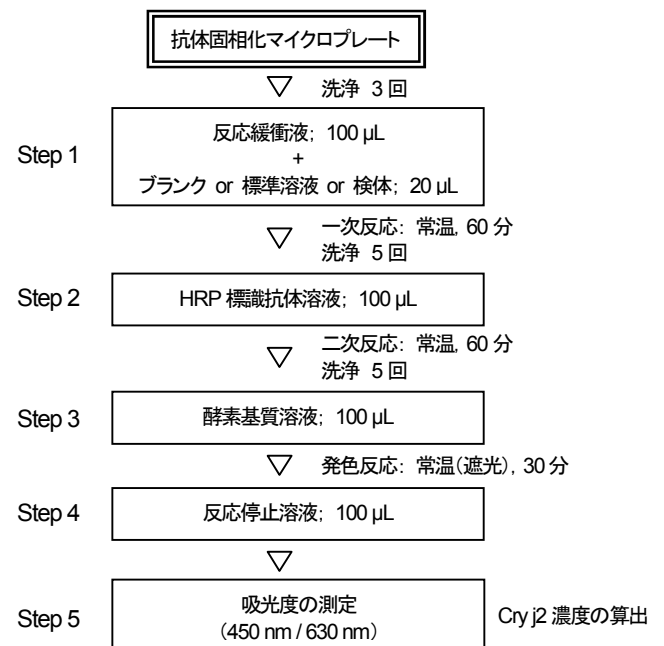
調製例

最終濃度	160	80	40	20	10 (ng/mL)
Cry j2 標準原液 (320 ng/mL)	200	200	200	200	200 (μ L)
反応緩衝液	200	200	200	200	200 (μ L)

5. その他の試薬

そのまま使用します。貯法に従って保存した場合は、使用期限まで安定です。

*【操作概略】



各ステップは操作途中で中断せず、一連の作業として実施してください。

【操作方法】

各試薬及び検体は常温(15~25°C)に戻してからご使用ください。
また、測定の際は二重測定をお奨めします。

- 測定に必要な全ての試薬、標準溶液、検体を準備します。^{*1}
- 抗体固相化マイクロプレート(A)必要数をフレームにセットします。
- 各ウェルあたり 300 μ L ずつの洗浄液で 3 回洗浄します。
- 反応緩衝液を各ウェルあたり、100 μ L ずつ添加します。
- 続いて、各濃度の Cry j2 標準溶液(160, 80, 40, 20, 10 ng/mL)、ブランク(0 ng/mL)及び検体をそれぞれのウェルに 20 μ L ずつ添加します。プレートミキサー等を用い、液はねしないように約 30 秒間混和後、常温(15~25°C)で 60 分間静置します。(一次反応)^{*2}
- 全てのウェル内の反応溶液を完全に除去した後、各ウェルあたり 300 μ L ずつの洗浄液で 5 回洗浄します。
- 全てのウェルに調製した HRP 標識抗体溶液を 100 μ L ずつ添加し、常温(15~25°C)で 60 分間静置します。(二次反応)^{*2}
- 全てのウェル内の反応溶液を完全に除去した後、各ウェルあたり 300 μ L ずつの洗浄液で 5 回洗浄します。

9. 全てのウェルに酵素基質溶液(D)を 100 μ L ずつ添加し、常温(15~25 $^{\circ}$ C、遮光下)で 30 分間静置します。(発色反応)^{*2}
10. 全てのウェルに反応停止溶液(E)を 100 μ L ずつ添加します。
11. プレートミキサー等を用い、液はねしないように数秒間混和後、30 分以内にプレートリーダー(測定波長:450 nm、対照波長:630 nm)で各ウェルの吸光度を測定します。

*1 検体中に不溶物が認められる場合は、遠心分離などにより取り除き、その上清を反応緩衝液にて適宜希釈して測定してください。

*2 反応中はウェル内の乾燥を防ぐため、付属のプレートシール(I)で封をしてください。

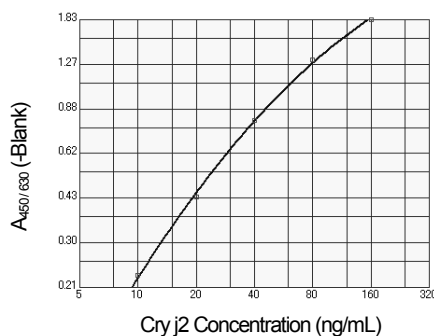
【スギ抗原 (Cry j2) 濃度の算出方法】

1. 二重測定した各ウェルの平均吸光度を算出します。
2. 両対数のグラフ用紙を用いて、Cry j2 標準溶液の濃度を横軸、吸光度値^{a)}を縦軸にプロットし、標準曲線(推奨:二次曲線)を作成します。
3. 標準曲線を用いて、検体の吸光度値^{a)}から読みとった数値に希釈倍数を乗じた値を、Cry j2 の濃度とします^{b)}。

a) 吸光度値;ブランクの吸光度値を差し引いた値

b) 測定値が 160 ng/mL を超える場合は、希釈率を変更して再測定を行ってください。

【標準曲線例】



【使用上又は取扱い上の注意事項】

本添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。記載された使用目的及び操作方法以外での使用につきましては測定結果の信頼性を保証しかねます。

1. 一般的注意

- (1) キットの試薬にはアレルギー性を有するスギ花粉抗原を使用しています。スギ花粉抗原にアレルギーのある方は本キットを使用する際には試薬の取扱いに十分に注意し、慎重に測定操作を行ってください。
- (2) 使用する機器の添付文書及び取扱い説明書をよく読んでから使用してください。
- (3) 誤って試薬を凍結させた場合には、正しい結果が得られないことがありますので使用しないでください。
- (4) キットの全試薬は使用前に必ず常温(15~25 $^{\circ}$ C)に戻してください。
- (5) 製造番号の異なるキットの試薬を組み合わせ使用しないでください。
- (6) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- (7) 容器の破損、異物混入等異常が認められたものは使用しないでください。
- (8) 構成試薬は必要量に応じ、予め分取してからご使用ください。試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。

- (9) 検査に用いる器具は、よく洗浄し、精製水でよく濯いだものを使用してください。
- (10) 検体ごと及び試薬ごとにマイクロピペットのチップを替えてください。
- * (11) キットは 2~8 $^{\circ}$ C で光の当たらない場所に保管してください。試薬を保存する際は、蓋をして、転倒、落下防止を確実にしてください。

2. 操作上の注意

- (1) 測定ごとに必ず Cry j2 標準溶液を同時に測定し、標準曲線を作成してください。
- (2) 操作開始後は定められた時間で速やかに全操作を行ってください。
- (3) 酵素反応停止後、30 分以内に吸光度を測定してください。
- (4) D: 酵素基質溶液(TMB 溶液)、E: 反応停止溶液を取り扱う際、溶液との接触部に金属が使用されていない器具等を使用してください。
- (5) 操作中、プレートを強くこすったり、底面に触れたりしないでください。また、プレート内面が乾燥しないように注意してください。

3. 取扱い上の注意

- (1) 反応停止溶液として、酸を使用していますので、取扱いの際は、手や目、粘膜、衣服等に触れないようにご注意ください。もし皮膚に付着した場合は多量の水で洗い流してください。必要があれば医師の手当てを受けてください。
- (2) 取扱い後には、手洗いを十分に行ってください。
- (3) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、諸法規の規制に従って適切に処理してください。

4. その他

- (1) キット中の容器、付属品は他の目的に使用しないでください。
- (2) 本試薬は研究用試薬であり、臨床診断の目的には使用しないでください。

**【貯法及び有効期間】

冷暗所 (2~8 $^{\circ}$ C) **凍結厳禁**

製造後 18 箇月間有効 (包装に表示の使用期限内に使用してください。)

【包装単位】

96 テスト (CODE: 1Z32)

【問い合わせ先】

株式会社 特殊免疫研究所 営業部
〒112-0004
東京都文京区後楽一丁目 1 番 10 号
日本生命水道橋ビル
TEL 03-3814-4081
FAX 03-3814-5957

Instruction Manual

Cedar Pollen Allergen ELISA Kit "Cry j2"

- Thoroughly read this instruction manual before use of this kit.
- This kit is for research use only.

This sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit uses a monoclonal antibody (T27) specific to Cry j2, a cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergen, and a polyclonal antibody.

This kit is used to specifically measure Cry j2 in samples.

[Kit components]

	Components	Amount	Number
A	Antibody-coated Microplate	8 well strip	12 strips
B	Cry j2 Standard (dry form) (320 ng/mL)	-	1 vial
C	Concentrated HRP-conjugated Antibody Solution	0.2 mL	1 vial
D	Substrate Solution (TMB)	12 mL	1 vial
E	Stop Solution (1 mol/L HCl)	12 mL	1 vial
F	Standard Diluent	0.5 mL	1 vial
G	Concentrated Reaction Buffer (5×)	40 mL	1 vial
H	Concentrated Wash Solution (5×)	50 mL	2 vials
I	Cover Film (for Microplate)	-	3 films

[Reagent preparation]

1. Reaction Buffer

Concentrated Reaction Buffer (G): Make a 5-fold dilution in distilled water to prepare the required volume of Reaction Buffer. This Reaction Buffer is used to dilute samples and Standard Stock Solution and is also used as a Blank Solution for the preparation of standard curves.

It should be prepared in each assay and be used soon.

2. HRP-conjugated Antibody Solution

Add 1 volume of **Concentrated HRP-conjugated Antibody Solution (C)** to 100 volumes of **Reaction Buffer** and mix well. This solution is used as HRP-conjugated Antibody Solution.

(Ex.: Reaction Buffer 6 mL + Concentrated HRP-conjugated Antibody Solution 60 μ L)

It should be prepared in each assay and be used soon.

3. Wash Solution

Concentrated Wash Solution (H): Make a 5-fold dilution in distilled water to prepare the required volume of Wash Solution. This Wash Solution is used to wash the microplate wells.

It should be prepared in each assay and be used soon.

4. Cry j2 Standard Solutions

1) Add 500 μ L of **Standard Diluent (F)** to a vial of **Cry j2 Standard (B)** and mix for 1 minute with a test tube mixer or the equivalent. Visually confirm dissolution.

Mix for another minute if dissolution is incomplete.

○ The prepared **Cry j2 Standard Stock Solution (320 ng/mL)** should be stored as follows;

Storage at 2 ~ 8°C

Use up within one week after preparation.

Storage in frozen condition (-20°C or below)

In the case of long storage, aliquot required volume for one assay and keep in frozen condition. Do not repeat freezing-thawing. It was confirmed to be stable at -20°C for one month by the internal test.

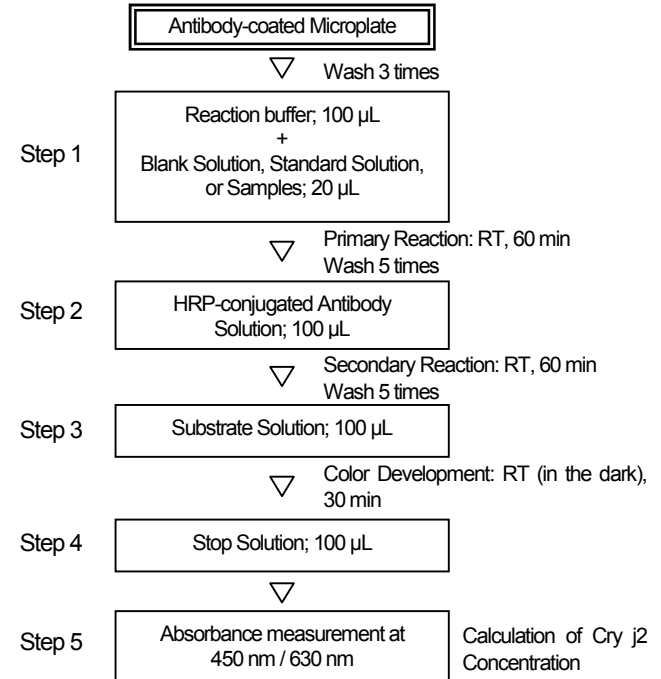
2) Make serial 2-fold dilutions to 10 ng/mL using the **Cry j2 Standard Stock Solution** prepared in step 4-1) above and the previously prepared **Reaction Buffer** in step 1. Use the **Reaction Buffer** as a blank Cry j2 solution (0 ng/mL).

An example of the dilutions

Final Concentrations	160	80	40	20	10 (ng/mL)
Cry j2 Standard (320 ng/mL)	200	200	200	200	200 (μ L)
Reaction Buffer	200	200	200	200	200 (μ L)

- The other kit components are ready to use. With proper storage, the kit components are stable up to the expiry date shown on the package.

[Summary of assay procedure]



Perform entire assay without interruption.

[Assay procedure]

Verify all reagents and samples are at room temperature (15 ~ 25°C) before commencing the assay. It is recommended that all standards and samples be assayed in duplicate.

- Prepare all required reagents, standard solutions, and samples*1.
- Affix the required number of **Antibody-coated Microplates (A)** to the frame.
- Wash each well of the microplate **3 times** with **300 μ L** of **Wash Solution**.
- Add **100 μ L** of **Reaction Buffer** to each well.
- Then add **20 μ L** of **Cry j2 Standard Solution** (160, 80, 40, 20, 10 ng/mL), **Blank Solution** (0 ng/mL), or **Samples** to each well. Gently shake the microplate on a plate shaker or the equivalent for approximately 30 seconds (DO NOT splash). Then incubate for **60 minutes** at **room temperature (15 ~ 25°C)**. (**Primary Reaction**) *2
- Discard the well contents and wash each well of the microplate **5 times** with **300 μ L** of **Wash Solution**.
- Add **100 μ L** of **HRP-conjugated Antibody Solution** to each well and incubate for **60 minutes** at **room temperature (15 ~ 25°C)**. (**Secondary Reaction**) *2
- Discard the well contents and wash each well of the microplate **5 times** with **300 μ L** of **Wash Solution**.
- Add **100 μ L** of **Substrate Solution (D)** to each well and incubate for **30 minutes** at **room temperature (15 ~ 25°C, protect from light)**. (**Color Development**) *2
- Add **100 μ L** of **Stop Solution (E)** to each well.
- Gently shake the microplate on a plate shaker or the equivalent for

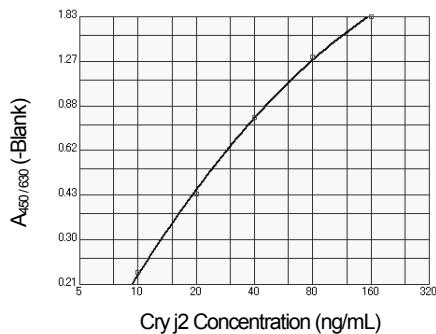
several seconds (DO NOT splash). Then measure the absorbance at 450 nm in a microplate reader (reference wavelength: 630 nm) within 30 minutes of adding Stop Solution.

- *1. Remove any particles in samples by centrifugation, diluting the resulting supernatant with **Reaction Buffer** as needed.
- *2. Seal the microplate with **Cover Film (I)** during the reactions to prevent the well contents from drying out.

[Calculation of Cry j2 concentrations]

1. Average the absorbance values measured in duplicate.
2. To make a standard curve (quadratic curve recommended), plot the concentrations of Cry j2 Standard Solutions on the x-axis and absorbance^{a)} on the y-axis of log-log graph paper.
3. To determine the Cry j2 concentration in each sample, multiply the dilution factor by the value read from the absorbance^{a)} of the sample using the standard curve^{b)}.
 - a) Absorbance: Absorbance of sample minus absorbance of Blank Solution.
 - b) When a measurement exceeds 160 ng/mL, the corresponding sample should be reanalyzed at an appropriate dilution factor.

[Typical standard curve]



[Warnings and precautions]

This kit must be used according to the instructions and for the purpose described in this manual. No result is guaranteed in any use or for any purpose other than those described in this manual.

1. General precautions

- 1) This kit contains a cedar pollen allergen that can trigger allergies in humans. Individuals who are allergic to cedar pollen allergens should exercise caution when handling the reagents and conduct the procedures with extreme care.
- 2) Check accuracy of tools and properly use them according to their instructions.
- 3) Do not use kits stored in frozen condition, because any result is not guaranteed.
- 4) Make sure to return the kit to 15 ~ 25°C before use.
- 5) Do not mix reagents of different production lots.
- 6) Do not use expired reagents.
- 7) Do not use reagents in broken vials, nor with contaminated.
- 8) Aliquot the required volume of each reagent before use and take care to avoid contamination of kit reagents with microorganisms.
- 9) Materials to be used for the assay must be clean and thoroughly washed with purified water in advance.
- 10) Replace micropipette tips for each sample and reagent.
- 11) Store the kit at 2 ~ 8°C away from light. Make caps tightly and take care to avoid falling down or falling, when it is stored.

2. Operational precautions

- 1) Concurrently measure Cry j2 Standard Solutions and prepare a new standard curve for every analysis for each assay.
- 2) Once assay is started, all operation must be finished promptly within specified time.
- 3) Absorbance must be measured within 30 min after stopping the enzyme reaction.
- 4) When handling Substrate Solution (TMB) (D) and Stop Solution (E), use equipment with no metal in the sites that make contact with these solutions.
- 5) Do not scrape or touch the bottom of wells or do not dry the surface of the wells during assay.

3. Handling precautions

- 1) Stop Solution contains an acid. When handling, avoid contact with hands, eyes, mucous membranes, and clothing. If they contact skin, wash with plenty of water. Get medical care if need.
- 2) Wash hands after assay.
- 3) Before discarding, treat samples, reagents and materials in appropriate ways.

[Storage and shelf life]

Store kit at 2 ~ 8°C in the dark and avoid freezing. This kit is stable for 18 months after the date of manufacture. Validity of kit is shown on the package.

[Package]

1 kit for 96 tests Code No. 1Z32

Manufactured and sold by;

Institute of Immunology Co., Ltd.

1-1-10, Koraku, Bunkyo-Ku,

Tokyo 112-0004, JAPAN

Tel : +81-3-3814-4081

Fax : +81-3-3814-5957