

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

コード : 10203

### 卵白アルブミン (OVA)

OVA (Ovalbumin) は鶏卵の卵白を構成する質量 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。

### キット概要

本キットは鶏卵由来の OVA を測定する ELISA キットです。

測定濃度範囲は 50–0.78 ng/mL、定量下限濃度は 1.56 ng/mL、反応時間 2 時間 15 分で OVA の測定が可能です。

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。

### 試薬構成

	内容	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 (凍結乾燥)	1 本 (4 回測定分)
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 (0.5M 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

- ・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 (20 倍濃縮洗浄液の調整)
- ・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℃で保管ください。

### 使用上の注意

- ・測定前にはすべての試薬を室温に戻し、攪拌してから使用してください。  
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ります。その場合は加温して完全に溶解後使用してください。
- ・検量線は OVA 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。  
測定は二重測定してください。
- ・マイクロプレート用シールは 1 回の測定で 1 枚使用してください。  
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してください。
- ・OVA 標準液 (アレルゲン性あり) および反応停止液 (0.5M 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してください。

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してください。開封後はできるだけ早く使用してください。
- 酵素標識抗 OVA 抗体 (C)  
室温に戻して、希釈せずに使用してください。
- 発色基質液 (TMB) (D)  
室温に戻して、そのまま使用してください。
- 反応停止液 (0.5M 硫酸) (E)  
室温に戻して、そのまま使用してください。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してください。
- 希釈液 (検体・試薬用) (F)  
室温に戻して、そのまま使用してください。
- 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してください。  
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す。  
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) で代用可能です。
- OVA 標準液 (B)  
OVA 標準液 (B) に下表に記載した容量の精製水を分注後、5 分間静置し、完全に溶解したことをご確認ください。この溶解液の OVA 濃度は 1000 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。

表 1. 標準液のロットと溶解液量

標準液ロット No.	SUP110901
溶解に用いる精製水量	150 $\mu$ L

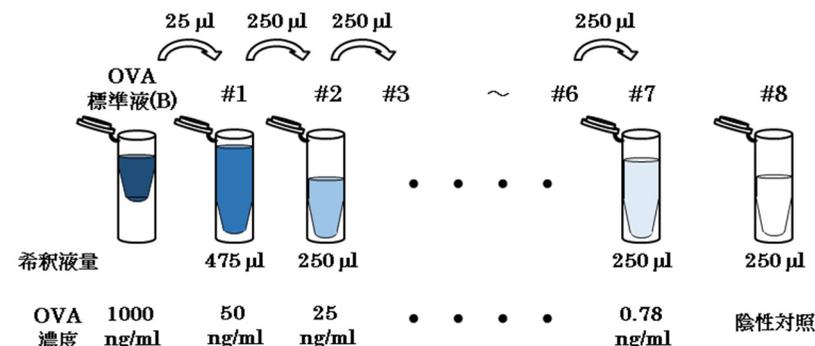
なお、本品はアレルギー性がありますので、皮膚および粘膜に付着しないように注意してください。

標準液の調整

8 本のマイクロチューブを用意し、#1~8 まで番号を付与してください。希釈液 (F) 475  $\mu$ L を #1 に分注し、OVA 標準液 (B) 25  $\mu$ L を分注しよく攪拌してください (#1 は 50 ng/mL となります)。#2~8 には 250  $\mu$ L の希釈液 (F) を分注しておきます。

#1 から 250  $\mu$ L を分取し、#2 に加えよく攪拌してください。同様に #2 から 250  $\mu$ L を分取し、#3 に加えよく攪拌してください。#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) が調整されます。#8 は OVA を含まない陰性対照として使用してください。

#	分注する液量	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)

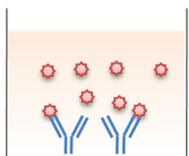


### 検体の調整

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) で希釈します。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です。下図のように、標準液 (#1~7)、陰性対照 (#8)、検体 (S1~S40) は 2 ウェルずつ分注します。

	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

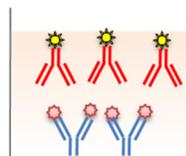


1.標準液&検体  
添加  
捕捉抗体  
OVA

- ① OVA 標準液、陰性対照および検体を 100  $\mu$ L/ウェル分注します。  
**注意！極力、時間差が発生しないよう迅速に行ってください。**
- ② プレートシールで密封し室温で 1 時間静置します。
- 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\*1 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。

### \*マルチチャンネルピペットを用いた洗浄

- (1) ウェル内の液を吸引除去し、(2) 350  $\mu$ L/ウェルの洗浄液を加えます。
  - (3) 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。



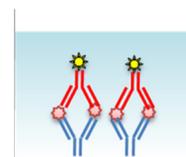
2.酵素標識抗体  
添加



酵素標識抗 OVA 抗体

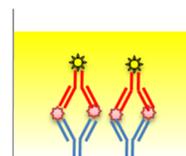
以降の試薬分注にはマルチチャンネルピペットの使用を推奨します。

- ① 酵素標識抗 OVA 抗体を 100  $\mu$ L/ウェル分注します。
- ② プレートシールで密封し室温で 1 時間静置します。
- ③ 3 回洗浄し、ウェル内の残存液は除きます。



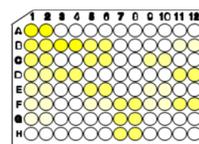
3.発色基質  
添加

- ① 発色基質液 (TMB) を 100  $\mu$ L/ウェル分注します。
- ② プレートシールで密封し遮光しながら室温で 15 分間静置します。  
徐々に青色に発色します。



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  $\mu$ L/ウェル分注します。  
黄色に変色します。



5.吸光度測定

- ① 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 OVA 濃度算出

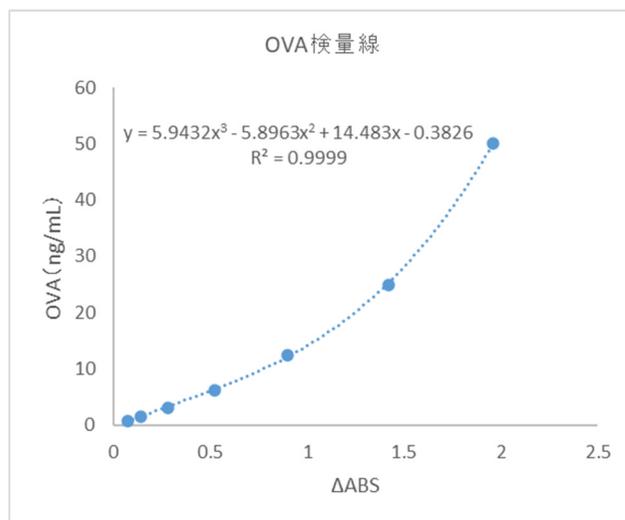
エクセルファイルのデータを次のように処理します。(例：2 重測定、1 波長の場合)

- 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 OVA 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  $\Delta$ ABS とする)
- ③ OVA 標準液の濃度を Y 軸に、 $\Delta$ 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  $\Delta$ ABS を多項式に代入し、OVA 濃度を求め、希釈倍数を乗じてサンプル原液の OVA 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 OVA 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 OVA 濃度を算出します。

検量線の例



### 測定性能

#### 測定精度

日内再現性	CV < 3 %
日間再現性	CV < 14 %
室内再現性	CV < 14 %

OVA 試料液を 3 重×6 回測定し、再現性を評価した。

#### 分注回収試験

各種血清および細胞培養液 (10 %ウシ胎仔血清分注 RPMI および DMEM) を検体に用いて OVA の分注回収試験を行った。血清および 10 %ウシ胎仔血清分注細胞培養液は 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 %ウシ胎仔血清分注)	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

2022 年 11 月 7 日 (ver. 05)