ITEA株式会社 東京環境アレルギー研究所
reag-info@itea.jp

ITEA ELISAキット 取り扱い説明書

製品コード：　1-CJ1-001
製品名：　ITEA スギ花粉アレルゲン（Cry j 1）ELISAキット（抗体固相化済）
改訂番号：　ver2025_2.2
発行日：　2025年6月19日

アレルゲン概要

Cry j 1はスギ（※）の成熟花粉の外壁、および表面に付着しているユービッシュ体に局在する質量約40 kDaの塩基性糖蛋白質（1）です。花粉に内在するCry j 2と共に、スギ花粉症の主要アレルゲンの１つとされています。

（1）J Allergy Clin Immunol. 1983 Jan;71（1 Pt 1）:77-86.

※学名：　*Cryptomeria japonica*

キット概要

本キットは、スギ花粉由来のCry j 1を測定するELISAキットです。測定範囲 0.16～10 ng/mL、反応時間 2時間15分で測定が可能です。本キットは、試料中のCry j 1測定、アレルゲン低減効果の検証などに適しております。なお、本キットは研究用試薬です。

試薬構成

記号	内　容	容　量
A	抗体固相化済マイクロプレート（96ウェル）	2袋（8ウェル×6本/袋）
B	標準液（凍結乾燥）	4回測定分 ※本数はロットによって異なります。
C	酵素標識抗体	12 mL×1本
D	発色基質液（TMB）	12 mL×1本
E	反応停止液（0.5 M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）
その他	マイクロプレート用シール 標準物ロット情報シート 取り扱い説明書	3枚 1部 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でも洗浄可能）
・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）
・精製水
・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

キットの保管温度

2～8℃

使用上の注意

・測定前にはすべての試薬を室温に戻し、撹拌してから使用してください。

・（G）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。

・（B）標準液（凍結乾燥）を溶解する精製水の液量はロット毎に異なります。
別紙の標準物ロット情報シートを確認したうえで溶解してください。

・測定は**2重測定以上**にしてください。

・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してください。

・（B）標準液（凍結乾燥）（アレルゲン性あり）および（E）反応停止液（0.5 M硫酸）（強酸）を取り扱う際は、白衣、防護眼鏡、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。

各試薬の調製

（A）抗体固相化済マイクロプレート

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。

（B） 標準液（凍結乾燥）

凍結乾燥品を溶解する精製水の液量はロット毎に異なります。
溶解に必要な精製水の液量と溶解後の濃度は、別紙の標準物ロット情報シートをご確認ください。
精製水を添加して攪拌後、5分間静置し、完全に溶解したことを確認ください。
この溶解液の濃度は【 200 ng/mL 】となります。
本品はアレルゲン性がありますので、皮膚および粘膜に付着しないように注意してください。
※ 溶解後は2～8 ℃で保管し、10日以内に使用してください。

（C）酵素標識抗体

室温に戻して、希釈せずに使用してください。

（D）発色基質液（TMB）

室温に戻して、そのまま使用してください。

（E）反応停止液（0.5 M硫酸）

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。

（F）希釈液（検体・試薬用）

室温に戻して、そのまま使用してください。

（G）洗浄液（20倍濃縮液）

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。
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。
※ 使用する試薬の作製プロトコルは、当社HPにてご確認いただけます。
https://itea-ec.com/pages/elisa-reagent-recipe

標準液の調製

（F）希釈液（Dilute solution）を用いて（B）標準液 を【 20倍 】に希釈し、図1の測定範囲で2倍階段希釈列を作製します。

※ 1.5 mL マイクロチューブなどを使用します。

※ 溶解した（B）標準液は毎測定時に希釈し、プレート毎においてください。

ng/mL→	10		5		2.5		1.25		0.625		0.3125		0.15625
Cry j 1 Standard	25	↘	250	↘	250	↘	250	↘	250	↘	250	↘	250
Dilute solution	475		250		250		250		250		250		250

図1. （B）標準液の希釈量と測定範囲

検体の調製

検体中のアレルゲン濃度が検量線の範囲に入るように、検体を（F）希釈液で希釈します。

この際、希釈1点では検量線外になる可能性があるため、2点以上の希釈を置く事が望ましいです。

プレート配置例（2重測定）

	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	BL	BL	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40

図2. 配置列図 ： 標準液（#1~7）、ブランク（BL）、サンプル（S1~S40）

測定の手順

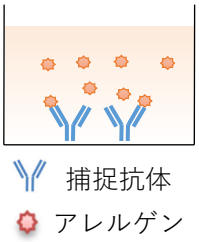
1. 標準液 & 検体添加～洗浄

① 希釈した（B）標準液、ブランクおよび検体をそれぞれウェル当たり100 µLずつ分注します。
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回以上洗浄します。

④ 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。



*1 マルチチャンネルピペットを用いた洗浄
（1）ウェル内の液を除去し、
（2）ウェル当たり350 µLずつ洗浄液を加えます。
（3）プレートミキサーを用いて軽く振盪したのち、
（4）洗浄液を除去します。
この（1）～（4）の操作を3回以上繰り返します。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。

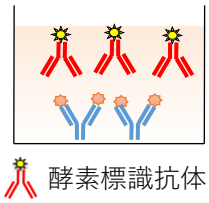
2. 酵素標識抗体添加～洗浄

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 （C）酵素標識抗体をウェル当たり100 µLずつ分注します。

② プレートシールで密封し**室温で1時間静置**します。

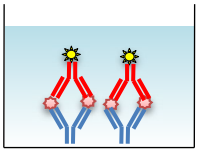
③ 3回以上洗浄し、ウェル内の残存液は除きます。



3. 発色基質添加

① （D）発色基質液をウェル当たり100 µLずつ分注します。

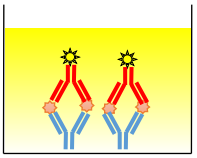
② プレートシールで密封し**遮光しながら室温で15分間静置**します。
徐々に溶液が青色に発色します。



4. 反応停止液添加

① **プレートは洗浄せずに**、（E）反応停止液をウェル当たり100 µLずつ分注します。溶液が黄色に変色します。

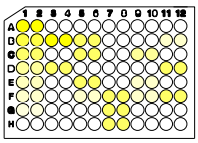
② マイクロプレートミキサーで撹拌し、十分に混ざったことを確認します。



5. 吸光度測定

① 各穴に気泡や汚れがないか確認し、少なくとも5分以内に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で吸光度測定します。

② 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。）



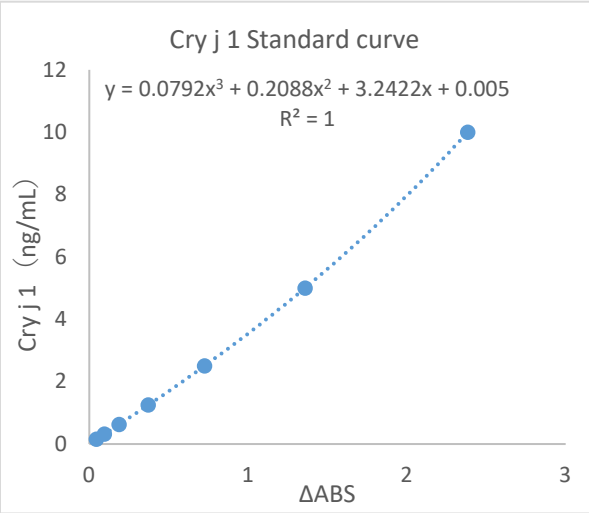
検量線とアレルゲン濃度算出

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 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ΔABSとする）
③ 標準液の濃度をY軸に、ΔABS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。
R2（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ΔABSを多項式に代入し、アレルゲン濃度を求め、希釈倍数を乗じてサンプル原液のアレルゲン濃度を算出します。

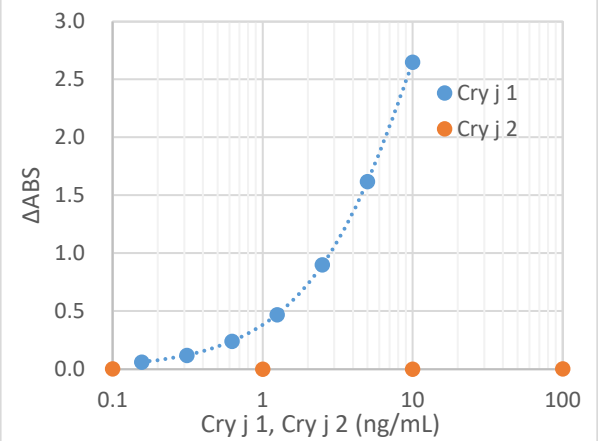
◎ マイクロプレートリーダー付属の解析ソフトがある場合は、それを利用して濃度を算出してください。検量線のカーブフィットは4-parameter Logisticか多項式近似を使用します。
検量線に検体の吸光度を当てはめてアレルゲン濃度を算出します。

検量線の例



特異性

本ELISAにおいては、Cry j 2（0.1、1、10、100 ng/ml）に対する反応は認められず、Cry j 1を特異的に測定できることが確認された。



測定精度

試料液を3重×6回測定し、再現性を評価した。

日内再現性	CV＜3%
日間再現性	CV＜7%
室内再現性	CV＜8%

SDS等については以下のWebページまたは2次元コードよりご確認ください。

◎ 資料ダウンロード（SDSはこちらから）
https://www.itea.jp/document-download/

◎ 製品詳細ページ
https://itea-ec.com/products/cd_1-cj1-001