

Broad Check

『*Deoxynivalenol (DON)* *ELISA*』 Kit

- I. はじめに
- II. 特徴
- III. キットの構成
- IV. サンプルの前処理法
- V. 操作法
- VI. 操作上の注意
- VII. 基本性能
- VIII. 貯蔵法および有効期限

I. はじめに

アカカビ (*Fusarium graminearum*) により産生されるカビ毒のデオキシニバレノール (DON) は、穀物、飼料などを汚染するトリコテセン系マイコトキシンです。DON に汚染された穀類を摂取することにより、人畜衛生上重篤な中毒症状を引き起こすとされています。近年、輸入穀物、飼料のみならず、国内生産現場においてもカビ毒が発生し厚生労働省では暫定基準値を設定しています。今回、我々は DON 汚染試料の簡便かつ多検体処理を可能にした抗 DON モノクローナル抗体を用いた ELISA キットを開発致しました。

DON ELISA キット

- | | |
|--|---------------|
| ▼ 8.23-6000 ng/mL の範囲で測定できます。 | A) 固相化プレート |
| ▼ 40 検体を二重測定でアッセイできます。 | B) 標準液 |
| ▼ プレートは一行 (8 ウェル) ずつ取り外しができますので、キットの分割使用が可能です。 | C) 標識体溶液 |
| ▼ 検体量は 50 μ L です。 | D) 標識体希釈液 |
| ▼ 反応時間は 1 時間 10 分です。 | E) 抗体溶液 |
| | F) 酵素基質液 |
| | G) 反応停止液 |
| | H) 濃縮洗浄液 |
| | I) プレート密閉用カバー |

保存と安定性

2 ~ 8 $^{\circ}$ C で保存してください。
製造日より 6 ヶ月は安定です。

II. 特徴

本キットは、飼料、穀物中に含まれる DON を定量するためのキットで

す。本キットによる DON の測定は簡便で定量性に優れ、共存する他のタンパク成分の影響を受けにくいなど多くの利点を備えております。

特異性

本 ELISA キットは DON ならびに 15-Acetyl DON に特異的です。
(基本性能を参照)

測定原理

本 ELISA キットは、DON を認識する特異性の高いモノクローナル抗体を用い、直接競合反応を使用した測定法です。
96 ウェルプレートの各ウェルには、抗マウス IgG 捕捉抗体 (anti mouse IgG capture antibody) が固定化されています。この各ウェルに標品の DON または検体、次に HRP 標識 DON を加え、最後に抗 DON 抗体を順次加えて競合反応させます。1 時間の反応中にウェル内で抗菌剤の濃度に依存して HRP-DON-抗体複合体が形成されます。最後にこの複合体中の酵素 (HRP) 活性を測定することにより、検体中の DON 濃度を求めることができます。

III. キットの構成

試薬	規格	内容物
A IgG 固相化プレート	96 ウェルプレート 1 枚	抗マウス IgG 固定化プレート
B 標準液	B0~B7 各濃度/Vial 8 本	PBS
C 標識体溶液	120 μ L 1 本	HRP 標識 DON

D	標識体希釈液	6 mL	1 本	0.02% Tween 20 を含むリン酸緩衝生理食塩水
E	抗体溶液	6 mL	1 本	IgG 含有リン酸緩衝生理食塩水
F	酵素基質液	12 mL	1 本	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)
G	反応停止液	6 mL	1 本	1 N H ₂ SO ₄
H	濃縮洗浄液	50 mL	1 本	0.2% Tween 20 を含む10倍濃縮リン酸緩衝生理食塩水
I	プレート密閉用カバー		1 枚	Aに付属

IV. サンプルの前処理法

1) 小麦等の抽出法 (*サイレージ等は別途お問合せください)

粉碎した麦試料 (5g) に蒸留水 (50mL) を添加し、vortex mixerなどで3分間良く混和。

↓

遠心 (5000r. p. m, 5分) し、上清 1mL を回収

(あるいはろ紙 (ワットマン No.1 など) を用いてろ過する)

↓

そのままELISAで測定する。DON汚染が高濃度を疑う試料に関しては、

更にPBSで希釈を行い、測定。

V. 操作法

使用器具および装置

- 1) マイクロタイタープレートの吸光度計 (プレートリーダー)、波長450nmで測定できる装置。
- 2) マイクロタイタープレート用振とう器。
- 3) マイクロタイタープレート洗浄器、手法の場合は洗浄ビン。
- 4) マイクロピペットおよびチップ (50及び100 μ Lサンプリングできるもの)。
- 5) マイクロディスペンサー (抗体、標識体を分注する際に便利です)
- 6) メスシリンダー (1000mL)。
- 7) 蒸留水または脱イオン水。

試薬の調製

- 1) 標準液 (B-0 から B-7) は下記の濃度に調整済みなので、そのまま使用してください。

B 0 (0 濃度)

B 1 (8.23 ng/mL)

B 2 (24.7 ng/mL)

B 3 (74 ng/mL)

B 4 (222.22 ng/mL)

B 5 (666.66 ng/mL)

B 6 (2000 ng/mL)

B 7 (6000 ng/mL)

2) Cの標識 DON 溶液は使用直前時に 120 μ L 全量を標識体希釈液Dに加え、十分攪拌してから使用して下さい。

***全量使用しない場合は、使用するマイクロストリップ分のD標識体希釈液を取り分け、ここに1/50容量のC標識DON溶液を添加、攪拌してご使用ください。**

(例；4ストリップ分使用の場合、2mLのD標識体希釈液に対し、40 μ LのC標識DON溶液を添加)

- 3) DON抗体溶液は調整済みなので、そのまま使用して下さい。
- 4) Fの酵素基質液は使用時に室温に戻してから使用して下さい。
- 5) Gの反応停止液は調整済みなのでそのまま使用して下さい。
- 6) Hの濃縮洗浄液は50 mL全量を精製水450 mLにて希釈し、プレート洗浄用に使用して下さい。

測定操作

- 1) キットの各バイアルを室温にもどす。
- 2) 初めに各ウェルに標準液または測定する検体 50 μ L 入れる。
- 3) 続いて、希釈液Dで希釈した標識溶液を各ウェルに 50 μ L 入れる。
- 4) 次に抗DON抗体溶液Eを各ウェルに 50 μ L を加える。
- 5) プレートを指で軽く叩き振動させ攪拌。(プレート振とう器がある場合はそれを使用する)。

- 6) プレートカバーをし、室温 (20~25 $^{\circ}$ C) で1時間反応。
- 7) 各ウェル中の液を除き、各ウェルに 350 μ L の洗浄液を満たした後、液を捨てる。これを3回繰り返した後、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして完全に液を除く。
自動洗浄器を使用する場合は、洗浄液量を 350 μ L に、洗浄回数は3回に設定して使用。
- 8) 各ウェルに酵素基質溶液F 100 μ L を入れ、室温で10分間反応。
- 9) 各ウェルに酵素反応停止液G 50 μ L を入れる。
- 10) マイクロタイタープレート吸光度計にて波長 450 nm を測定。DON標準液の各濃度 (8ポイント) の測定値から標準曲線を作成し、検体中のDON測定値を標準曲線に当てはめ、濃度を算出。

4parameter あるいは log-logit 係数を用いた算出をお勧め致します。
(得られた値に希釈倍率を乗じたものが試料に含まれるDON濃度となります)。

VI. 操作上の注意

- 1) 調整した検体に濁度が見られる場合は再度遠心、ろ過などを行い、検体試料中に浮遊物などが確認されない状態のものをういてください。
- 2) 試薬は用時調製 (希釈) を原則とし、また調製ごとに新しい容器をお使いください。ただし、洗浄液は希釈した状態で4 $^{\circ}$ Cで6カ月間保存できます。
- 3) 濃縮洗浄液Hは保存中に沈殿を生ずることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。

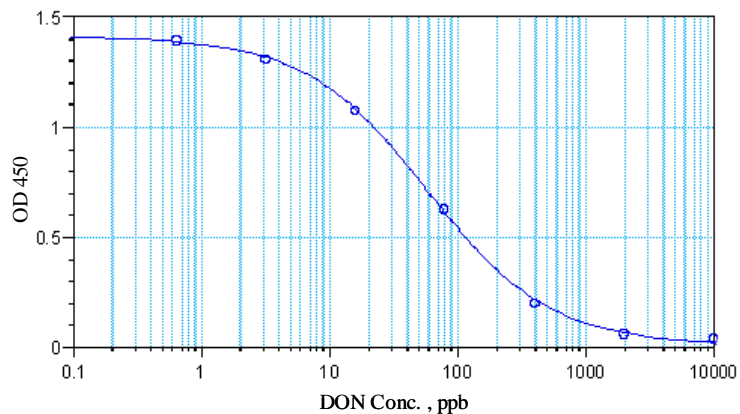
- 4) 各ウェルの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行ってください。また各検体ごとに新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。
- 5) 6000ng/mL を超える高値検体の場合は、検体を PBS で希釈してから測定してください。
- 6) 測定はすべて 2 重測定で行ってください。
- 7) 発色反応停止後は速やかに吸光度測定を行ってください。
- 8) 酵素基質の発色レベルは、反応温度、時間、プレートの振とうの程度などでわずかに影響を受けることがありますので、必ず測定毎に検量線を作成してください。
- 9) キット使用時、もしくは保存時には強い光が当たらないように注意してください。

留意事項

- a. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせる使用しないこと。
- b. 試験・研究用にのみ使用し、診断等には使用しないこと。

VII. 基本性能

標準的な濃度曲線例



他のトリコセセン系マイコトキシンとの交差反応性

DON	100%
15Ac-DON	120%
3Ac-DON	0.10%
NIV	5%
T2 Toxin	<0.1%

同時再現性 CV (%) 3.2~6.8

日差再現性 CV (%) 4.8~8.6

VII. 貯蔵法および有効期限

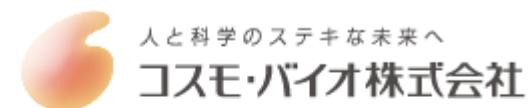
○2~8℃遮光下で保存して下さい。

○製造日より6ヶ月間は安定です。

製造：(株) フロンティア研究所

住所 〒061-3241 北海道石狩市新港西1丁目777-12

販売・お問い合わせ先：



〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)
TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620