

HBs Pre-S2 Antigen Quantitative ELISA Kit, Rapid 使用手順書

BCL-S2HP-01

背景

B型肝炎ウイルス（HBV）の表面抗原にはS、M及びLタンパク質の3種類があります。Lタンパク質はS、Pre-S2及びPre-S1領域からなり、Pre-S1領域を欠くものがMタンパク質、Pre-S1及びPre-S2を欠くものがSタンパク質です。Pre-S2領域の役目に関しては肝細胞ガン発症への関与の報告もありますが、多くは未だ不明のままです。本キットは世界初の定量性のあるPre-S2抗原定量ELISAキットです。Pre-S2活性を測定することにより、HBV感染研究や新しい診断法の開発に役立つものと考えます。

本製品の特徴

1. ヒト血清中のPre-S2抗原の定量が可能 * * : 血漿中サンプルの定量については保証できません。
2. 高感度測定が可能 (0.1 nUnit/mLまで検出可能)
3. Pre-S2抗体を用いたサンドイッチ法で高い特異性
4. 従来品より3倍迅速で安定な測定

関連製品のご案内

当社では本キットと関連する製品として以下のものを用意しています。

製品番号	製品名	内容量
BCL-AG-01	B型肝炎ウイルス表面抗原 Lタンパク質 (HBsAg L-protein)	100 µg
	遺伝子組換えHBsAgでS、Pre-S1、Pre-S2全部の抗原活性を保有しています。	
BCL-AGX-02	高活性型B型肝炎ウイルス表面抗原 (HBsAg-XT)	100 µg
	HBV感染患者血清より高いHBsAg活性を示す非感染性抗原です。	
BCL-S1HP-01	HBs Pre-S1 Quantitative ELISA kit, Rapid	1 キット (96well×1plate)
	B型肝炎表面抗原のPre-S1領域検出用の定量キットです。迅速な測定が可能。	
BCL-SHP-21	HBs S Quantitative ELISA kit, Rapid-2	1 キット (96well×1plate)
	B型肝炎表面抗原のS領域検出用の定量キットです。迅速な測定が可能。	

HBsAg関連ではその他の関連製品もあります。詳しくは当社HP (www.beacle.com)をご覧ください。

測定原理と測定時間

本キットはPre-S2領域を認識する抗体と標準抗原を主要構成成分とするキットです。固相化抗体でコーティングしたプレートに、標準抗原とサンプルを添加し、検出抗体（HRP標識）でサンドイッチし、HRPの発色基質を用いて検出する、いわゆるサンドイッチELISA手法を用いています。測定に必要な時間の概略は、試薬調製、サンプリング操作、洗浄操作、吸光度測定などに必要な時間を除き、以下の通りです。

- 1 段階迅速法： 固相化抗体・検出抗体との反応：60分間 発色反応：30分間 (計90分)
 - 2 段階法： 固相化抗体反応：60分間 検出抗体反応：60分 発色反応：30分間 (計150分)
- 2段階法は、サンプルを極力希釈したくない場合に御利用下さい。何れの方法を用いてもシグナル強度や感度は殆ど同じです。

測定値について

HBsAgの各抗原領域はその存在様式（高次構造の違いと思われる）によって異なる抗原力価を示します。また、Pre-S2抗原には標準的な測定単位は存在しません。本キットでは、当社が独自に定めた測定単位、即ち、キット付属の標準抗原の1ngが保有するPre-S2抗原力価を1 nUnitと定義しています。

保存方法と保存安定性

本キットに付属の試薬は全て4℃で保存下さい。6ヶ月は安定です。

キットに付属する試薬等と準備する器具等

キット付属試薬

- ・ 検出抗体 (Anti Pre-S2 Detection IgG(HRP-labeled)) 溶液：18µL (1本)
- ・ 標準抗原 (Standard Pre-S Antigen)：10 µg (1本)



- ・ 20 倍濃縮バッファーA (Buffer A, 20 × conc.) : 20mL (1 本)
- ・ 3 倍濃縮反応バッファー(Reaction Buffer, 3 × conc.) : 20mL (1 本)
- ・ 検出抗体希釈バッファー (赤色、Dilution Solution For Detection IgG) : 6mL (1 本)
- ・ 発色試薬 A(Chromogenic Reagent A) : 6mL (1 本)
- ・ 発色試薬 B(Chromogenic Reagent B) : 6mL (1 本)
- ・ 発色反応停止液(Stop Solution) : 6.5mL (1 本)
- ・ 固相化済 96well マイクロプレート(Assay Plate For Pre-S2 Antigen) : 1 枚
- ・ 取扱説明書 : 1 部

必要な試薬、器具及び機材など

- ・ マイクロプレートリーダー (測定波長 abs=450 nm)
- ・ マイクロピペット
- ・ マイクロチューブ (標準抗原の希釈に用います)
- ・ プレートシラー (又はラップ)
- ・ 8 連マルチチャンネルピペット (同、リザーバー)
- ・ 精製水または蒸留水

実験手順

< 準備 >

1. バッファーAの調製 : 20 倍濃縮バッファーA を精製水にて 20 倍希釈して下さい。濃縮液は 4 保存時にしばしば塩の析出物が生じます。希釈時にこれらも完全に溶解されていることをご確認下さい。1 × バッファーA は 4 で保存下さい。
2. 反応バッファーの調製 : 3 倍濃縮反応バッファーを精製水にて 3 倍に希釈して下さい。濃縮液は 4 保存時に析出物が生じることがありますので、それらも溶解させてください。1 × 反応バッファーは 4 で保存ください。
3. 標準抗原の調製 : 凍結乾燥抗原チューブへバッファーA を 1 mL 加え溶かします。凍結乾燥粉末が蓋のほうについている場合もありますので転倒混和してください。得られた抗原溶液は 10 μ Unit/mL (10 μ g/mL) になります。
4. 検出抗体溶液の調製 : 赤色の抗体希釈バッファーをボトルから 0.5mL 採取し、検出抗体チューブへ入れよく混和します。蓋に抗体溶液が付いている場合もありますので良く転倒混和して下さい。全量を抗体希釈バッファーが入ったボトルへ戻しよく混合します。念のため、同じ操作を繰り返し、全ての抗体を抗体希釈バッファー用ボトルへ移行させて下さい。得られた抗体希釈液の全量は 6 mL になります。

1 段階迅速法で測定する場合

< スタンダード調製 >

1. チューブの一本に反応バッファーを 900 μ L 入れ、これに 10 μ Unit/mL 溶液を 100 μ L 加え、良く攪拌します。出来た希釈標準抗原液は 1000 nUnit/mL となります。以下、同様の手順で、下記の希釈表に従って標準抗原溶液の反応バッファーによる希釈系列を作ります。

反応バッファー (or バッファーA)	希釈用の抗原液	希釈後濃度	STD ID
900 μ L	10 μ Unit/mL 100 μ L	1000 nUnit/mL	
900 μ L	1000 nUnit/mL 100 μ L	100 nUnit/mL	
700 μ L	100 nUnit/mL 300 μ L	30 nUnit/mL	STD
600 μ L	30 nUnit/mL 300 μ L	10 nUnit/mL	STD
500 μ L	10 nUnit/mL 500 μ L	5 nUnit/mL	STD
800 μ L	5 nUnit/mL 200 μ L	1 nUnit/mL	STD
500 μ L	1 nUnit/mL 500 μ L	0.5 nUnit/mL	STD
600 μ L	0.5 nUnit/mL 400 μ L	0.2 nUnit/mL	STD
500 μ L	0.2 nUnit/mL 500 μ L	0.1 nUnit/mL	STD

注 : 反応バッファーは 1 段階迅速法、バッファーA は 2 段階法で使用

2. 検量線を得るために STD ~ STD の標準抗原希釈液を用います。

< サンプルの調製 >

1. サンプルの Pre-S2 抗原力価が本キットの測定範囲 (0.1 ~ 30nUnit/mL) になるように反応バッファ



ーにて希釈します。サンプルは反応バッファーで少なくとも 10 倍以上希釈してください。サンプル中の Pre-S2 抗原力価が不明の場合には、濃度の異なる複数の希釈サンプルを作ることをお勧めします。

2. ヒト血清サンプルを測定する場合、血清成分の影響を抑制するため、反応バッファーにて 100 倍以上に希釈して測定サンプルとしてください。

【ご注意】 夾雑タンパク質を含むサンプルの場合、反応が低下する可能性があります。血漿サンプルや 1% 超の血清を含むサンプルの場合、添加回収実験を行って回収率を確認することをお勧めします。
反応バッファーは 60mL 分だけがキットに付属しています。段階希釈する場合には途中はバッファー A で希釈する、或いはサンプルボリュームを減らすなどして節約して御利用下さい。

< 固相化抗体・検出抗体とのワンステップ反応 >

1. アルミ袋に入ったプレートを取り出します。
2. スタンダード用の STD から STD 、各測定サンプル、及び反応バッファーのみ (ブランク用) を各 3 well に 100 μ L ずつ分注します (triplicate 測定)。
3. 予め調製しておいた検出抗体溶液 (赤色) を 50 μ L ずつ 8 連ピペットにより各 well へ分注し、室温 (25) で 1 時間、インキュベーションします。

これ以降は < 発色試薬の調製 > へお進み下さい。

2 段階法で測定する場合

< スタンダード調製 >

1. チューブの一本に バッファー A を 900 μ L 入れ、これに 10 μ Unit/mL 溶液を 100 μ L 加え、よく攪拌します。出来た希釈標準抗原液は 1000 nUnit/mL となります。以下、同様の手順で、上記の希釈表に従って、標準抗原溶液の バッファー A による希釈系列を作ります。

< サンプルの調製 >

1. サンプル抗原値が本キットの測定範囲 (0.1 ~ 30nUnit/mL) になるようにバッファー A で希釈します。ヒト血清サンプルを測定する場合、血清成分の影響を抑制するため、バッファー A にて 100 倍以上に希釈して測定サンプルとしてください。
2. サンプルはバッファー A (PBS-T、pH 7.4) と相同の溶液状態 (抗原・抗体反応を妨害しない条件) であれば、希釈しないでそのまま利用することも可能です。

【ご注意】 夾雑タンパク質を含むサンプルの場合、反応が低下する可能性があります。血漿サンプルや 1% 以上の血清を含むサンプルの場合、添加回収実験を行って回収率を確認することをお勧めします。
バッファー A が足りない場合には自作の PBS - T を御利用下さい。

< 固相化抗体との反応、検出抗体との反応 >

1. アルミ袋に入ったプレートを取り出します。
2. スタンダード用の STD から STD 、各測定サンプル、及びバッファー A のみ (ブランク用) を各 3 well に 100 μ L ずつ分注し (triplicate 測定) 室温 (25) で 1 時間インキュベーションします。
3. 8 連ピペット用リザーバーに反応バッファーを 12mL 入れます。そこへ用意した検出抗体溶液 (赤色) 6mL を全量注ぎ、よく攪拌します。
4. 固相化抗体との反応が終わったプレートの反応液をデカンテーションの後、ペーパータオルへ叩き付けるようにして除きます。
5. バッファー A (300 μ L/well) で 3 回洗浄します。洗浄後、プレートをペーパータオルへ叩き付けるようにして、well に残った洗浄液を除きます。
6. 検出抗体溶液を 8 連ピペットにて各 well へ 150 μ L ずつ分注し、室温 (25) で 1 時間インキュベーションします。

これ以降は < 発色試薬の調製 > へお進み下さい。

< 発色試薬の調製 >

1. 抗体反応が終了する約 10 分前に発色試薬の調製を始めます。
2. 発色試薬 A と発色試薬 B を 6ml ずつ 8 連ピペット用リザーバーに入れ、混合します。

【ご注意】 発色用混合液は明るい場所では特に酸化しやすいので暗所に保管し、15 分以内を目処に速やかに御使用下さい。



< 発色反応 >

1. 反応液をデカンテーションの後、ペーパータオルへ叩き付けるようにして除きます。
2. バッファーA (300 μ L/well) で 5 回洗浄します。洗浄後、プレートにペーパータオルへ叩き付けるようにして、well に残った洗浄液を除きます。
3. 調製した発色試薬を 100 μ L ずつ 8 連ピペットにより各 well へ分注します。
4. 暗所に置くなどにより遮光し、室温 (25) で正確に 30 分間、静置します。
5. 発色反応停止液を、発色試薬を入れた時と同じ順番とスピードで 8 連ピペットを用いて 50 μ L ずつ各 well へ添加し、反応を停止させます。

【ご注意】 発色反応後に見られる青色は比較的早く退色します。正確な値を求めるためには、発色反応停止液を加えた後すぐに吸光度を測定するようにしてください。

< 測定と計算 >

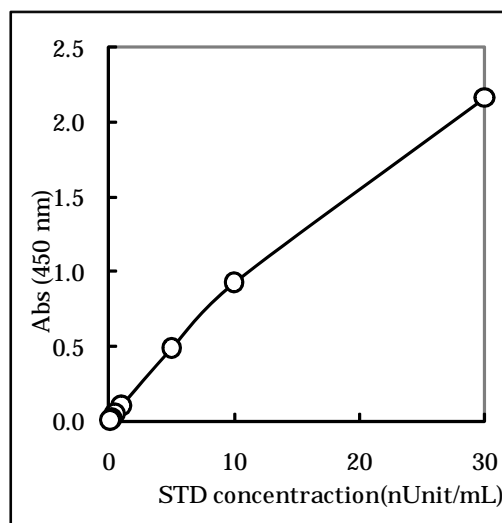
1. 発色サンプルの入ったプレートをプレートリーダー (吸収波長 450 nm) で吸光度を測定します。
2. 測定した吸光度からブランクで得られた値を引いた値をスタンダードとサンプルの測定値とします。
3. スタンダードの測定値を各スタンダード濃度に対してプロットしプロットに最もフィットする曲線をコンピューターなどによって求めます。通常は 4 パラメーターロジスティック曲線モデルを用います。
4. 得られた曲線式に基づいてサンプルの Pre-S2 抗原力価を求めてください。
5. 本キットの測定範囲 (0.1 ~ 30 nUnit/mL) を外れた測定値は採用しないで下さい。

【ご注意】 測定前にプレートの裏面がきれいであることを確認下さい。汚れていると正しい値が得られません。

< 検量線の例 >

下図に、測定例とその検量線を示します。

STD		Abs450 nm
ID	nUnit/mL	
STD	30	2.166
STD	10	0.927
STD	5	0.488
STD	1	0.103
STD	0.5	0.054
STD	0.2	0.022
STD	0.1	0.010



【ご注意】 本測定例は当社内で行って得られた 1 段階迅速法で得られたデータの一例です。実際に測定する場合、測定者の技量やその他の条件によって得られる結果は異なりますので、本キットの性能を保証するものではありません。なお、2 段階法を用いた場合もほぼ同等のシグナル強度が得られます。

問い合わせ先

株式会社ビークル
〒607-8465 京都市山科区上花山坂尻 25-10
TEL:075-582-8505 FAX :075-582-6055
E-mail: technical-support@beacle.com
Website: www.beacle.com

以上