



HBs Pre-S1 Antigen Quantitative ELISA Kit (Genotype D)

使用手順書

BCL-S1D-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、その内、Pre-S1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-S1はヒト肝細胞の認識と感染に重要な領域です。本キットはHBsAgのLタンパク質に発現するPre-S1を検出するための定量性のあるELISAキットです。本キットを用いてPre-S1活性を測定することで、HBVの感染能力などを定量的に評価することが可能になります。

本製品の特徴

1. ヒト血清中のPre-S1抗原（Genotype D）の定量が可能（血漿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（0.01 nUnit/mLまで検出可能）
3. Pre-S1（Genotype D）抗体を用いたサンドイッチ法で高い特異性

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。	
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。	
BCL-S1HP-01	HBs Pre-S1 Quantitative ELISA kit, Rapid	1キット
	B型肝炎表面抗原のPre-S1領域検出用の定量キット。迅速測定が可能。	(96well×1plate)
BCL-S2HP-01	HBs Pre-S2 Quantitative ELISA kit, Rapid	1キット
	B型肝炎表面抗原のPre-S2領域検出用の定量キット。迅速測定が可能。	(96well×1plate)
BCL-SHP-21	HBs S Quantitative ELISA kit, Rapid-2	1キット
	B型肝炎表面抗原のS領域検出用の定量キット。迅速測定が可能。	(96well×1plate)

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) をご覧下さい。

測定原理と測定時間

本キットはPre-S1領域（Genotype D）を認識する抗体と標準Pre-S1抗原（Genotype D）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固相化抗体反応：180分間 → ②検出抗体反応：180分 → ③発色反応：30分間（計390分）

測定値について

Pre-S1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-S1（Genotype D）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-S1 (D) Detection IgG(HRP-labeled)）溶液：12µL（1本）
- ・ 標準抗原（Standard Pre-S1 (D) Antigen）：0.1 µg（1本）
- ・ 20倍濃縮バッファA (Buffer A, 20×conc.)：20mL（1本）
- ・ 検出抗体希釈バッファ（赤色、Dilution Solution For Detection IgG）：12mL（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-S1 (D) 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)
- ・ マイクロチューブ (標準抗原の希釈に用います)
- ・ 8連マルチチャンネルピペット (同、リザーバー)
- ・ マイクロピペット
- ・ プレートシラー (又はラップ)
- ・ 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. 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1mL加え溶かします。凍結乾燥粉末が蓋の方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100 nUnit/mL (100 ng/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12 mLになります。

<①スタンダード調製>

1. チューブの一本にバッファーAを800 µL入れ、これに100 nUnit/mL溶液を200 µL加え、良く攪拌します。出来た希釈標準抗原液は20 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バッファーAによる希釈系列を作ります。

バッファー A		希釈用の抗原液		希釈後濃度	STD I.D.
800 µL	+	100 nUnit/mL 200 µL	=	20 nUnit/mL	STD①
600 µL	+	20 nUnit/mL 200 µL	=	5 nUnit/mL	STD②
800 µL	+	5 nUnit/mL 200 µL	=	1 nUnit/mL	STD③
600 µL	+	1 nUnit/mL 400 µL	=	0.4 nUnit/mL	STD④
600 µL	+	0.4 nUnit/mL 200 µL	=	0.1 nUnit/mL	STD⑤
600 µL	+	0.1 nUnit/mL 400 µL	=	0.04 nUnit/mL	STD⑥
600 µL	+	0.04 nUnit/mL 200 µL	=	0.01 nUnit/mL	STD⑦

2. 検量線を得るために STD①～STD⑦の標準抗原希釈液を用います。

<②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(0.01~20nUnit/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) と同一の溶液状態 (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】 ①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。

②バッファーAが足りない場合には自作のPBS-T (PBS + 0.05% Tween-20) を御利用下さい。

<③‘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 STD①から STD⑦、各測定サンプル、及びバッファーAのみ (ブランク用) を各3wellに100 µLずつ分注し (triplicate 測定)、室温 (約 25℃) で3時間インキュベーションします。
3. 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。



4. 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。
5. 8 連ピペット用リザーバーに用意した検出抗体溶液 (赤色) 12mL を全量注ぎます。
6. 検出抗体溶液を 8 連ピペットにて各 well へ 100 μ L ずつ分注後、プレートシール等でカバーし、室温 (約 25 $^{\circ}$ C) で 3 時間インキュベーションします。

<④発色試薬の調製>

1. 抗体反応が終了する約 5 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】 ① 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。

<⑤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。
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 (約 25 $^{\circ}$ C) 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。

<⑥測定と計算>

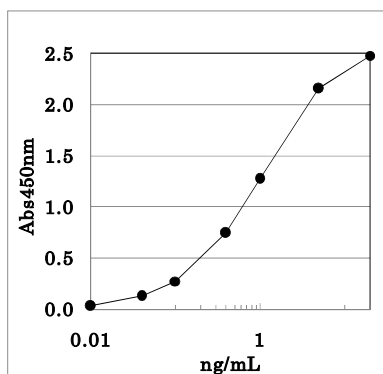
1. 発色サンプルの入ったプレートをプレートリーダー (吸収波長 450 nm) で吸光度を測定します。
2. 測定した吸光度からブランクで得られた値を引いた値をスタンダードとサンプルの測定値とします。
3. スタンダードの測定値を各スタンダード濃度に対してプロットしプロットに最もフィットする曲線をコンピューターなどによって求めます。通常は 4 パラメーターロジスティック曲線モデルを用います。
4. 得られた曲線式に基づいてサンプルの Pre-S1 抗原力価を求めてください。
5. 本キットの測定範囲 (0.01~20 nUnit/mL) を外れた測定値は採用しないで下さい。

【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。

<⑦検量線の例>

下図に、測定例とその検量線を示します。

ID	STD	
	Conc. (ng/mL)	Abs 450 nm (-Blank)
STD①	20	2.48
STD②	5	2.16
STD③	1	1.28
STD④	0.4	0.74
STD⑤	0.1	0.27
STD⑥	0.04	0.12
STD⑦	0.01	0.03
Blank	0	0.00



【ご注意】 本測定例は当社内で行って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。

本製品の SDS は、当社 HP (https://beacle.com/download_jp/)よりダウンロードできます。

問い合わせ先

株式会社ビークル

〒606-8305 京都市左京区吉田河原町 14-1

TEL:075-762-5055 FAX :075-762-3055

E-mail: technical-support@beacle.com

Website: www.beacle.com