

「プラテリア BSE」 操作法

1. サンプルの精製

(1) 試薬の調整

処理検体数に応じて（下表参照）、BSE精製キットの溶解液(Reagent A)でプロテイナーゼ Kを 250 倍に希釈する。

（希釈したプロテイナーゼK溶液は、室温で4時間保存可能である。）

検体数	Reagent A の容量	プロテイナーゼ K の容量
2	2 ml	8 μ l
10	6 ml	24 μ l
18	10 ml	40 μ l
26	14 ml	56 μ l
34	18 ml	72 μ l
42	22 ml	88 μ l
50	26 ml	104 μ l
58	30 ml	120 μ l
66	34 ml	136 μ l
74	38 ml	152 μ l
82	42 ml	168 μ l
90	46 ml	184 μ l

(2) 異常プリオンペプチド精製

- 1) ウシの胃 (Obex) 部位を 350 ± 40 mg を量り取る。
- 2) 量り取った検体をグライディングチューブに入れる。
- 3) グライディングチューブに入れたサンプルを完全にホモジナイズする。（この時点でホモジナイズしたサンプルは、 -20°C で数週間保存可能である。保存する場合、凍結・融解は一回限りとする。）
- 4) ホモジネートされたサンプルから固形物を含まないように注意しながら $500 \mu\text{l}$ 量り取り、 2 ml マイクロチューブ等に移す。（この時点でサンプルは、 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ で8時間、 -20°C で数週間保存可能である。）
- 5) 上記1. (1) で希釈したプロテイナーゼ K溶液を $500 \mu\text{l}$ 加え、よく混和する。酵素活性を均一にするため、プロテイナーゼK溶液を加える作業は、5分以内にすばやく行う。氷上に置いた場合は10分以内に行う。
- 6) よく混和したら、すばやく湯浴、インキュベーター又はヒートブロック等に置き、 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 10 ± 1 分間のインキュベーションを行う。5) と 6) との操作の間の時間は2分以上置いてはならない。

- 7) インキュベーション終了後、**2分以内**（チューブを氷上においた場合には**10分以内**）に **Reagent B** を 500 μ l 加え、溶液全体が青くなるまでよく混和する。（**Reagent B** を加える作業は、**5分以内**にすばやく行う。氷上においた場合は10分以内に行う。）
- 8) **20,000 \times g** で **5分間** 又は **15,000 \times g** で **7分間** 遠心する。
- 9) 遠心終了後、**5分以内** に上清を廃棄する。上清をできるだけ取り除くために、チューブを上下逆さにしてペーパー上に5分間置くか、あるいはアスピレーターで5分間吸引乾燥させる。
- 10) 上清を廃棄した後、**10分以内** にマイクロチューブに **Reagent C1** を 50 μ l 加える。ここではボルテックスで混和してはならない。
- 11) すばやく湯浴、インキュベーターまたはヒートブロック等に置き、**100 \pm 1 $^{\circ}$ C、5 \pm 1分間** のインキュベーションを行うこと。10) と 11) の操作の間の時間は**2分以上置い**てはならない。
- 12) インキュベーターからマイクロチューブを取り出し、ボルテックスでよく混和する。（この時点で、サンプルは2 \sim 8 $^{\circ}$ Cで5時間、-20 $^{\circ}$ Cで数週間保存可能である。保存した場合は、いずれも**100 \pm 1 $^{\circ}$ C、5 \pm 1分間** のインキュベーションを行った後、ボルテックスでよく混和する。）
- 13) **BSE 検出キットの希釈液(R6)** を 250 μ l 加え、混和する。（この時点でサンプルは2 \sim 8 $^{\circ}$ Cで5時間保存可能である。保存した場合は、よく混和してから、次の作業を行う。）混和後、検出キットのマイクロプレートのウェルにサンプルを分注する。（2. (2) 2) に続く。）

2. サンプル検出

(1) 試薬の調整

- 1) 使用する試薬、固相化マイクロプレートは、使用する前に冷蔵庫から出して常温（20 \pm 5 $^{\circ}$ C）に戻しておく。
- 2) **洗浄原液（R2）** を精製水で 10 倍希釈し、混和して**洗浄液（R2'）** とする。（2 \sim 8 $^{\circ}$ C で 2 週間保存可能である。）
- 3) **陽性コントロール（R4）** の瓶を軽くタッピングしてから開封し、精製水または希釈液（R6）を 2 ml 加える。1 分間放置した後、緩やかに混和して、溶解する。（2 \sim 8 $^{\circ}$ C で 2 時間、適量に分注した後、-20 $^{\circ}$ C で 6 ヶ月間保存可能である。）冷凍保存する場合は溶解後、直ちにマイクロチューブ等に小分けし-20 $^{\circ}$ C で保存する。
- 4) 使用直前に**酵素標識抗体（R7）** を洗浄液で 10 倍希釈し、緩やかに混和して**酵素標識抗体液（R7'）** とする。1 本のストリップに対して 1 ml の酵素標識抗体液（R7'）が必要となる。（2 \sim 8 $^{\circ}$ C で 6 時間保存可能である。）
- 5) アルミ箔等で遮光した容器に、**基質緩衝液（R8）** と **発色液（R9）** を 10 : 1 の割合で混合し、**基質発色液（R8+R9）** とする。1 本のストリップに対して 1 ml の基質発色液（R8+R9）が必要となる。（室温で 6 時間保存可能である。ただし、使用時に青く呈色している場合は、使用できないので新しく調整し直す。）

(2) 異常プリオンの検出

- 1) マイクロプレートラックから必要な数だけストリップを取り出す。(使用しないストリップは袋に戻し、乾燥剤を入れ、しっかりと空気を除きながら開封口を閉める。2~8℃で1ヶ月保存可能である。)
- 2) 以下のように**陰性コントロール(R3)**、**陽性コントロール(R4)**及び BSE 精製キットで調整した**サンプル**をマイクロプレートのウェルに分注する。複数枚のプレートを使用して検査する場合はプレートごとに、また1枚のマイクロプレートを複数回に分けて使用する場合は測定ごとに、それぞれコントロールをおく。

–A1, B1, C1, D1:	陰性コントロール(R3)	100 μ l
–E1, F1:	陽性コントロール(R4)	100 μ l
–G1, H1:	サンプル	100 μ l
- 3) シーリングフィルムで覆い、ヒートブロック (が望ましい) や孵卵器等で 37±1℃で75±15分のインキュベーションを行う。
- 4) シーリングフィルムをはがし、プレートを洗浄液 (18~22℃) で洗浄する。自動のマイクロプレートウォッシャーで洗浄する場合は、1ウェルあたり 800 μ l のオーバーフロー設定で3回の洗浄サイクルとする。手動で洗浄する場合は、ウェル上の溶液を除去した後、洗浄液 350 μ l を注入・除去する作業を3~6回 (洗浄回数は値を見ながら調整する) 繰り返す。洗浄終了後、洗浄液をウェルの中から完全に除去するために、ペーパーの上で液を叩き出す。この状態で5分以上置いてはならない。
- 5) **酵素標識抗体液(R7')**を 100 μ l ずつ、各ウェルに分注する。
- 6) シーリングフィルムで覆い、2℃~8℃で60±5分のインキュベーションを行う。
- 7) シーリングフィルムをはがし、プレートを洗浄液 (18~22℃) で洗浄する。自動のマイクロプレートウォッシャーで洗浄する場合は、1ウェルあたり 800 μ l のオーバーフロー設定で5回の洗浄サイクルとする。手動で洗浄する場合は、ウェル上の溶液を除去した後、洗浄液 350 μ l を注入・除去する作業を5~10回 (洗浄回数は値を見ながら調整する) 繰り返す。洗浄終了後、洗浄液をウェルの中から完全に除去するために、ペーパーの上で液を叩き出す。この状態で5分以上置いてはならない。
- 8) 基質発色液 (**R8+R9**) 100 μ l をウェルに分注し、アルミ箔でプレートを覆う等の処置をし、暗所遮光で30分、室温 (18~22℃) でインキュベーションを行う。インキュベーションの際、フィルムは使用してはならない。
- 9) **反応停止液(R10)**100 μ l をウェルに分注する。
- 10) 停止液添加後、30分以内にマイクロプレートリーダーで**主波長 450nm**、**副波長¹620nm**における OD を測定する。測定を行うまでは、常に光を避けるようにすること。

¹ 副波長については、600nm~700nm までの範囲においては判定に影響を及ぼさない。

3. 判定

判定は、次のようにカットオフ値を計算し、それを利用する。

$$\text{カットオフ値} = (4 \text{ つの陰性コントロールの平均吸光度} + \text{定数 } 0.210)$$

定数は、定期的に見直しを行うためキットの説明書に記載されている値を適用すること。

OD 値 < カットオフ値の-10% のとき陰性

OD 値 \geq カットオフ値の-10% のとき再検査

上記により再検査となったときは、マイクロプレートの2穴を利用し、1. (2) 4)における保存サンプルを用いて行う（再検査は、別の検査員が行うことが望ましい。）。

また、測定系は、陰性コントロール及び陽性コントロールの吸光度が以下の条件を満たしていることにより確認する。

- ① 陰性コントロールの吸光度が4穴とも全て < 0.150
- ② 陽性コントロールの吸光度が2穴とも全て \geq 1.000

再検査における判定は次のとおりとする。

- (1) 2穴のうち、いずれか一方のOD値がカットオフ値以上、又はカットオフ値の-10%以内のOD値を得たときは、陽性と判定する。
- (2) 2穴ともカットオフ値の-10%未満であったときは、陰性と判定する。