

「ニッピブル®BSE」操作方法

1. キットの構成

[構成]

1) ニッピブル®BSE 検査キット前処理用

1-1) 前処理用試薬セット (2箱)

No. 名称	容量 (1箱)
① 試薬 A 破砕用緩衝液	60mL×1本
② 試薬 B プロテインナーゼ K	0.6mL×1本
③ 試薬 C マイクロバイアルセリンプロテインナーゼ	0.6mL×1本

1-2) 前処理用器材セット (2箱)

No. 名称	容量 (1箱)
④ 採材用トレイ	50個
⑤ 採材用メス	50個
⑥ 採材用フォーク	50個
⑦ バイオマッシャー® (図1) I 破砕棒	50個
II フィルターチューブ	50個
⑧ 回収用チューブ (ジルコニアビーズ入り)	50個

2) ニッピブル®BSE 検査キット検出用 (96検体)

検出用試薬セット (1箱)

No. 名称	容量 (1箱)
⑨ 抗体プレート 抗プリオン蛋白質モノクローナル抗体	96 ウェル×1枚
⑩ 標識抗体溶液 HRP 標識抗プリオン蛋白質モノクローナル抗体	0.4mL×1本
⑪ 標識抗体用希釈液 トリス緩衝液	12mL×1本
⑫ 陽性コントロール リコンビナント牛プリオン蛋白質	凍結乾燥品×1本
⑬ 陰性コントロール トリス緩衝液	3mL×1本
⑭ 基質液 TMB 発色基質液	15mL×1本
⑮ 停止液 0.5mol/L 硫酸	12mL×1本
⑯ 濃縮洗浄液 リン酸緩衝液	50mL×1本

付属品 プレートカバーシール 4枚

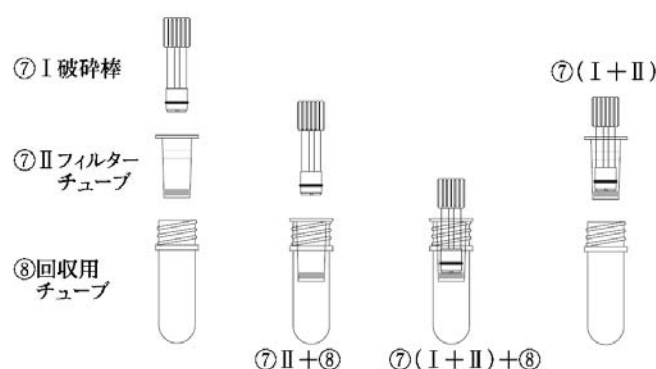


図1. バイオマッシャー®

[貯法]

前処理用器材セット	: 室温
前処理用試薬セット	: 2~8°C
検出用試薬セット	: 2~8°C

[キットには含まれない器具および器材]

- 消毒液 (2%次亜塩素酸ナトリウム又は 1mol/L 水酸化ナトリウム液)
- 吸湿性用紙又はペーパータオル
- バイザー付き保護眼鏡およびマスク
- 使い捨て手袋
- 冷蔵庫 (4~8°C)
- 恒温器 (37°C、96 ウェルプレートを保温できるもの)
- 恒温器 (56°C、2mL チューブを保温できるもの)
- 恒温器 (100°C、2mL チューブを保温できるもの) または煮沸器
- 遠心分離機 (2mL チューブが使用可能であり 15,000×g の回転が可能なもの)
- 細胞破碎装置
- プレートリーダー (測定波長: 450nm および 580~650nm の任意の波長)
- プレートウォッシャー
- マイクロピペット (20μL~1000μL 可変対応) およびチップ
- 標識抗体液調製用試験管 (5mL 又は 10mL 又は 20mL)
- 洗浄液作製用メスシリンダー (100mL) およびビーカー (2L)
- 基質液 (TMB 溶液) 採取用試験管 (5mL~15mL)
- 精製水

2. 前処理操作のための準備

1) 恒温器の設定

前処理の作業を開始する前に2台の恒温器の電源を入れ、温度をそれぞれ 56°C と 100°C に設定する。

2) 酵素混合液の調製

①試薬 A、②試薬 B および③試薬 C を静かに転倒混和し、変化のないことを確認する。

試薬 A の量は (検体数+1) mL とする。試薬 A、試薬 B および試薬 C を表に従い 100:1:1 の比率で混合し、酵素混合液を調製する。酵素混合液は緑色を呈する。酵素混合液は用時調製し、使用まで氷上、あるいは冷蔵庫内で静置する。

表. ①試薬 A、②試薬 B および③試薬 C の混合例

検体数	①試薬 A (mL)	②試薬 B (μL)	③試薬 C (μL)
2	3 mL	30 μL	30 μL
10	11 mL	110 μL	110 μL
15	16 mL	160 μL	160 μL
20	21 mL	210 μL	210 μL
25	26 mL	260 μL	260 μL
30	31 mL	310 μL	310 μL
35	36 mL	360 μL	360 μL
40	41 mL	410 μL	410 μL
45	46 mL	460 μL	460 μL
50	51 mL	510 μL	510 μL

3. 前処理操作方法

- 1) ④採材用トレイ、⑤採材用メス、および⑥採材用フォークを用いて、門部を含む延髄 110±20mg を採取する。
- 2) バイオマッシャー®の⑦Ⅱフィルターチューブを⑧回収用チューブ内にセットし、採取した組織を入れ、試料がフィルター面に接するまで⑦Ⅰ破碎棒を確実に押し込む。
- 3) 15,000×g, 30 秒間の遠心分離操作を行う。
- 4) フィルターチューブと破碎棒(⑦Ⅰ + ⑦Ⅱ)を取り外し破棄する。⑧回収用チューブに酵素混合液 1mL を加える。
- 5) 蓋を閉め、細胞破碎装置*により全体が均一になるまで攪拌する。
*FastPrep (Qbiogene) を使用する場合は、強度 4 で 30 秒間攪拌する。
マルチビーズショッカー (安井器械) を使用する場合は、2,000rpm で 30 秒間攪拌する。
- 6) 恒温器 (56°C) で 10 分間反応させる。
- 7) 数回転倒混和し、すぐに 100°C で 10 分間反応させる。
- 8) 室温まで冷却する。
- 9) 冷却後、転倒混和し (ボルテックスでも可) 検出用試薬セットにより異常プリオン蛋白質の検出を行う。

4. 検出操作のための準備

- 1) 洗浄液の調製
⑯濃縮洗浄液は、40 倍の濃度である。使用前に常温に戻し十分に転倒混和する。濃縮洗浄液 25 mL に対して精製水を 975mL 加え混和する。これを洗浄液とする。冷蔵保存し 2 週間以内に使用する。
- 2) 希釈標識抗体液の調製
希釈標識抗体液は、1 検体当たり 100 μL 必要である。
使用前に、別に用意した標識抗体液調製用試験管を用いて、⑰標識抗体用希釈液で⑱標識抗体溶液を 30 倍希釈し、希釈標識抗体液とする。この操作は、希釈標識抗体液添加の直前の洗浄前に行う。
⑱標識抗体溶液の残りは、強く蓋を閉め冷蔵で保存する。有効期限内に再度使用できる。
*例：1 ストリップ (8 ウェル) の場合
標識抗体溶液 30 μL を取り、標識抗体用希釈液を 870 μL 加えよく混和後 100 μL ずつ使用する。
- 3) 基質液
⑲基質液は、1 検体当たり 100 μL 必要である。
測定検体数分に余剰分を加味した分量を、別に用意した基質液採取用試験管に直接移し、そこから正確に 100 μL ずつ使用する。一度試験管に移した基質液は元に戻さないこと。パツ

クグラウンドの上昇の原因となる。

⑭基質液の残りは、強く蓋を閉め冷蔵で保存する。有効期限内に再度使用できる。

4) 陽性コントロールの調製

⑫陽性コントロールのバイアル瓶に精製水を 2mL 加えて完全に溶解し、そのまま使用する。調製後の陽性コントロールを長期間測定に供しない場合は小分け分注して凍結保存する。凍結後 12 ヶ月の保存が可能である。凍結融解の繰り返しは行わないこと。

5. 検出操作方法

試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し変化のない事確かめること。検体の測定と同時に陽性コントロールと陰性コントロールを測定する。

- 1) ⑨抗体プレートの 2 ウェルに⑬陰性コントロールを 100 μ L ずつ分注する。
- 2) 調製済み検体と⑫陽性コントロールを抗体プレートにそれぞれ 100 μ L ずつ分注する。
- 3) 抗体プレートにシールをして 37°C の恒温器中で 1 時間反応させる。
- 4) 300 μ L 以上の洗浄液で洗浄操作を 4 回行う。4 回の洗浄後、残液を完全に取り除く。次の操作までに 5 分以上の間隔をあけない。
- 5) 希釈標識抗体液を各ウェルに 100 μ L ずつ分注する。
- 6) 抗体プレートにシールをして 4~8°C で 30 分間反応させる。
- 7) 300 μ L 以上の洗浄液で洗浄操作を 6 回行う。6 回の洗浄後、残液を完全に取り除く。次の操作までに 5 分以上の間隔をあけない。
- 8) すべてのウェルに⑭基質液を 100 μ L ずつ分注し、遮光下、常温で 30 分間反応させる。陽性コントロールのウェルは徐々に青色に変化する。
- 9) すべてのウェルに⑮停止液を 100 μ L ずつ分注する。陽性コントロールのウェルは青色から黄色に変化する。
- 10) プレート底面のよごれや水滴を拭き取り、液面に気泡がないことを確認した後、30 分以内に検体・陽性コントロール・陰性コントロールのそれぞれについて、主波長 450nm および副波長 580~650nm の吸光度を測定する。

ニッピブル®BSE検査キット 操作方法

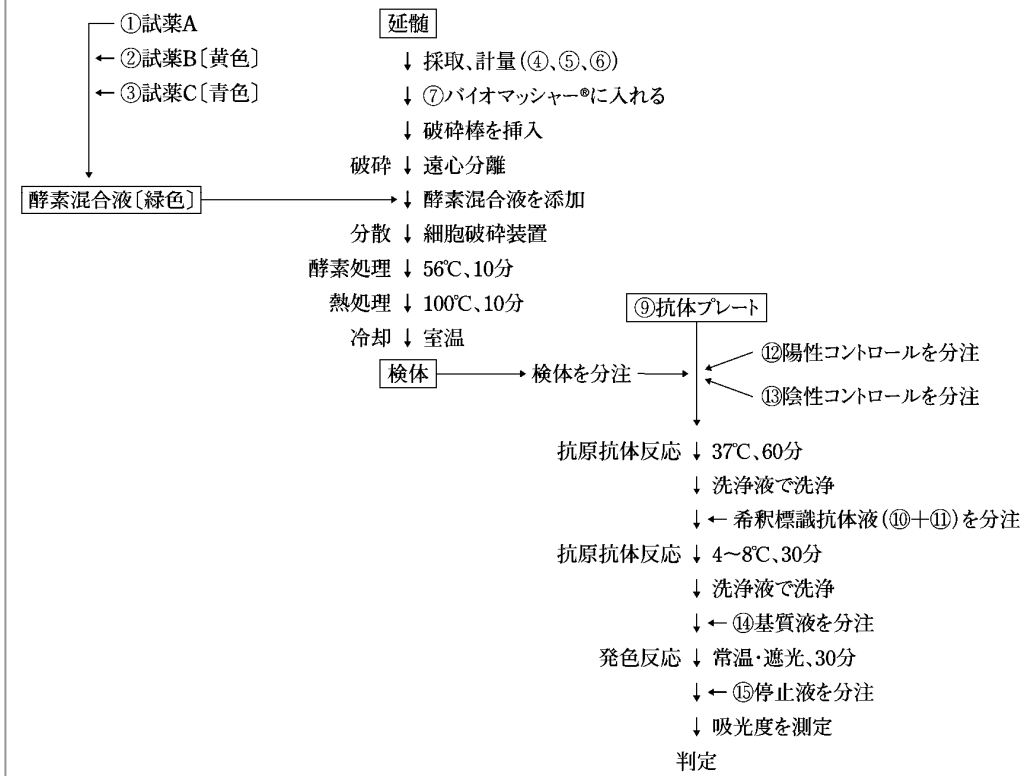


図2. ニッピブル®BSE 検査キット操作方法

6. 判定方法

1) 測定系の確認

陰性コントロールの平均吸光度およ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を確認する。以下の条件を満たしていない場合は操作方法に問題がある可能性があるため、再度試験を実施する。この場合の再検査には前処理を終了した検体を用い、5. 検出操作方法から行う。

$$[\text{陰性コントロールの平均吸光度}] \leq 0.20$$

$$[\text{陽性コントロールの吸光度}] - [\text{陰性コントロールの平均吸光度}] \geq 1.20$$

2) カットオフ値の算出

陰性コントロールの平均吸光度に 0.30 を足した数値をカットオフ値とする。

$$[\text{カットオフ値}] = [\text{陰性コントロールの平均吸光度}] + 0.30$$

3) 結果の判定方法

試験した検体の吸光度がカットオフ値以上の場合を陽性、カットオフ値未満の場合を陰性と判定する。

$$\text{陽性} : [\text{検体の吸光度}] \geq [\text{カットオフ値}]$$

$$\text{陰性} : [\text{検体の吸光度}] < [\text{カットオフ値}]$$

4) 判定上の注意

4-1) カットオフ値よりわずかに低い吸光度 (-10%以内) を示した検体および陽性と判定された検体は再検査を実施する。

4-2) 再検査は、2.2) と 3.1) の前処理操作に従い、門部位が含まれる先に採取した部位の近傍から検体 110±20mg を採取するところから行う。

4-3) 再検査は 1 検体につき 2 ウェルを使用して試験する。

4-4) 再検査において少なくとも 1 つのウェルがカットオフ値以上の値を示した場合は陽性と判定する。

4-5) 本製剤で陽性と判定された検体は、他の免疫学的検査、病理組織学的検査および免疫組織化学的検査等を用いて確認を行い、最終判定とする。

4-6) 確認検査のためのサンプル送付に際しては、前処理操作を終了した検体（冷凍状態）も同封する。