

研究用

Code No. MK120

Takara

Influenza A Virus EIA Kit

説明書

インフルエンザウイルスにはA,B,Cの3つの型があります。現在、インフルエンザウイルスで流行を起こすのはA型のH1亜型（ソ連かぜ）、H3亜型（香港かぜ）、そしてB型の3種類です。ウイルスの構造を図1に模式的に示します。インフルエンザウイルスの型は核蛋白質（NP）の抗原性の違いによって分類され、それらはさらに、ウイルス表面蛋白質であるヘマグルチニン（haemagglutinin: 以下HAと略す）とノイラミニダーゼ（neuraminidase: 以下NAと略す）の抗原性の違いによって亜型に分類されます。ちなみに死者のでるA型：ソ連かぜはH1N1型、A型：香港かぜはH3N2型です。H2N2型は1968年以降日本での分離例はありません。インフルエンザA型ウイルスのHAは、球状部領域（head region）と幹領域（stem region）の2つに分けられます。球状部領域は、ウイルスが標的細胞に結合するためのレセプター結合部位を含んでいます。また幹領域は、ウイルス膜と標的細胞の細胞膜と膜融合に必要な融合ペプチド配列を含んでいます。本製品はインフルエンザA型ウイルスに対するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を組み合わせて用いた、インフルエンザA型ウイルス検出用の高感度ELISAキットです。96穴プレートを用いているため、多数の検体処理に最適です。

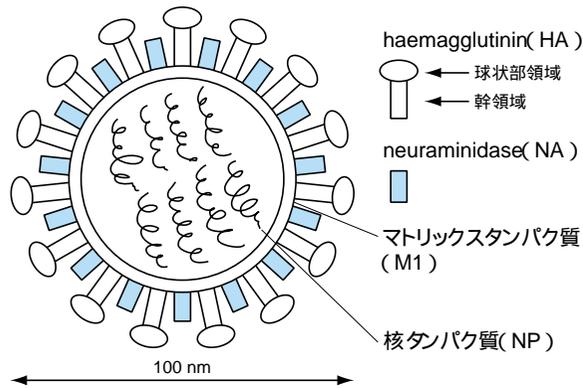
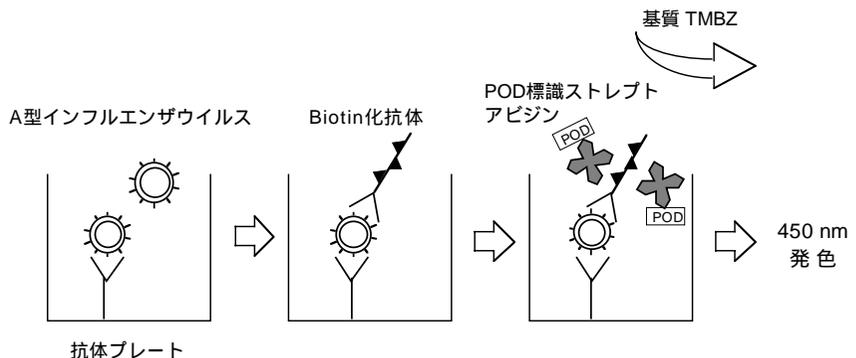


図1 インフルエンザウイルスの模式図

I. 測定原理

インフルエンザA型の核蛋白（NP）に対するモノクローナル抗体を固相化したプレート（抗体プレート）でウイルス抗原を捕らえ、捕捉された抗原を、ビオチン標識したウサギ抗インフルエンザA型ポリクローナル抗体（ビオチン化抗体）ではさみ、抗原に結合したビオチン標識二次抗体にPOD標識ストレプトアビジンを結合させ、PODの基質を加えて発色させることにより、インフルエンザA型ウイルスを間接的に検出する。



II. キットの内容

【ラベル番号】

| | |
|--|------------------------------------|
| Antibody Coated Microtiterplate 抗Influenza Aモノクローナル抗体プレート | 96 well (8 well × 12 strips) × 1 枚 |
| Positive Control A型ウイルス陽性コントロール (不活性済・凍結乾燥品) | 1 ml用 × 1 本 |
| Antibody-biotin Conjugate ビオチン化抗Influenza Aポリクローナル抗体 | 11 ml用 × 1 本 |
| Avidin-POD Conjugate POD標識ストレプトアビジン | 11 ml用 × 1 本 |
| Substrate Solution (TMBZ) 基質液 (TMBZ ; 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン) | 12 ml × 1 本 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Stop Solution 反応停止液 (1 N 硫酸*) * 1 N 硫酸は腐食性があり、また皮膚に触れるとただれ等を起こすことがあります。 皮膚や粘膜についた場合は直ちに多量の水で洗い流し、医師の指示に従ってください。 | 12 ml × 1 本 |
| Sample Diluent 検体希釈液 (ウイルスを溶解するための界面活性剤含有) | 11 ml × 2 本 |

III. 使用目的

ヒト、トリ、ブタに由来する検体または培養細胞等におけるA型インフルエンザウイルスの検出に使用できます。96穴プレートを用いているため、多数の検体の検査に適しています。本キットは研究用試薬です。人や動物の臨床診断には使用できません。

IV. 使用方法

1. 検体の調製方法

- ・ヒト、ブタ由来の場合：
鼻汁や咽頭ぬぐい液を検体として使用できる。鼻汁はチューブまたは綿棒で採取する。粘性が高い場合は、少量のPBSに懸濁し、不溶物を遠心除去する。その上清100 μlに等量の検体希釈液を加えて2倍希釈し、測定に供する。
- ・トリ由来の場合：
糞便を採取して検体とする。同様に少量のPBSに懸濁し、不溶物は遠心除去する。その上清100 μlに等量の検体希釈液を加えて2倍希釈し、測定に供する。
- ・測定まで検体を保存する必要がある場合は-20 以下で保存する。
- ・ウイルス量が少ない場合は、いったんMDCK (イヌ腎臓細胞) に接種してウイルスを培養し、培養後に細胞を検体希釈液で抽出し、これをそのままELISAに供してもよい。
- ・いずれの検体も感染性のあるものとして取扱い、全ての作業においてバイオハザード (微生物学的危険性) に対する対策を講じること。廃棄の際は、オートクレーブで必ず滅菌すること。

2. 試薬の調製

- ・ 抗体プレート (Antibody Coated Microtiterplate)
使用前に室温に戻してから開封する。
- ・ 陽性コントロール (Positive Control)
Positive Controlは、蒸留水1 mlを加えて溶解する。定量目的で検量線を作成する場合は、 の検体希釈液で2倍希釈したものを最高濃度として段階希釈し、各濃度の標準液として使用する。0濃度としては の検体希釈液をそのまま用いる。1 mlで復元した陽性コントロールの原液の濃度はロットごとに異なることがある。HA価はインフルエンザのもつ赤血球凝集能を利用したインフルエンザ定量法 (赤血球凝集法) の単位で、感染性のあるウイルスの活性を表す基準である。1 HAは、検体の原液 (1倍希釈) でようやく赤血球を完全に凝集できるウイルス量に相当する。ウイルス量が多いほど希釈倍率が高くなり、HA価は大きくなる。本キットで使用されている単位1 unitは、1 HA (CCAでは0.1) のウイルスに相当する抗原量を表わす。ELISAの場合ではウイルスが不活化されていても抗原性があるので、検出される。したがって、解釈には注意を必要とする。
この溶液の保存は4 で1週間までとする。それ以上保存する場合は、-20 以下で凍結する。ただし、凍結融解は1回までとする。
- ・ ビオチン化抗Influenza Aポリクローナル抗体 (Antibody-biotin Conjugate)
Antibody-biotin Conjugateを蒸留水11 mlで溶解する。この溶液の保存は4 で1週間までとする。それ以上保存する場合は、-20 以下で凍結する。ただし、凍結融解は1回までとする。
- ・ POD標識ストレプトアビジン (Avidin-POD Conjugate)
Avidin-POD Conjugateを蒸留水11 mlで溶解する。この溶液を保存する場合は4 で1週間までとする。それ以上保存する場合は-20 以下で凍結する。ただし凍結融解は1回までとする。
- ・ 基質液 (Substrate Solution (TMBZ))
Substrate Solution (TMBZ)は反応に用いる前に室温にもどし、そのまま使用する。
金属イオンと反応すると呈色するおそれがあるので、特に水道水が混入しないよう注意する。
- ・ 反応停止液 (Stop Solution)
そのまま用いる。強酸性のため取り扱いには注意する。
- ・ 検体希釈液 (Sample Diluent)
そのまま用いる。この液には界面活性剤が含まれているため、ウイルス粒子から抗原蛋白質が可溶化される。

3. 使用器具および準備物

- ・ ピペット、マイクロピペットおよびピペットチップ
- ・ 洗浄用 0.1% Tween 20含有PBS
[PBS タブレット (TaKaRa Code T900) を用いて調製すると便利です]
- ・ マイクロプレートリーダー
(450 nmの設定で吸光度3.0まで測定可能なもの)

4. 操作法

- ・測定は2連 (duplicate) で行う。
 - ・キット中の各試薬ならびにサンプルは使用前に室温にもどし、泡立ないように混和し、液を均一にしてから用いる。
1. 検体希釈液で希釈したサンプルおよび陽性コントロールを抗体プレートの2つずつのwell (2連) に100 μl/wellずつ加え、37 °C で1時間インキュベートする。この場合、サンプルをあらかじめ別の96穴プレートで2倍希釈しておき、8連ピペット等を用いてそれらを抗体プレートのwellにすみやかに (5分以内) 加えるようにする。(一次反応)
 2. 反応液を捨て、各wellを洗浄用緩衝液 (0.1% Tween/PBS) で3回洗浄する。8連ピペット等を用いて各wellに のビオチン化抗体を100 μlずつ加え、37 °C で30分インキュベートする。(二次反応)
 3. 反応液を捨て、各wellを洗浄用緩衝液 (0.1% Tween/PBS) で3回洗浄する。8連ピペット等を用いて各wellに のPOD標識ストレプトアビジンを100 μlずつ加え、37 °C で30分インキュベートする。(三次反応)
 4. 反応液を捨て、各wellを洗浄用緩衝液 (0.1% Tween/PBS) で3回洗浄する。8連ピペット等を用いて各wellに の基質液を100 μlずつ加え、室温 (20 ~ 30 °C) で5 ~ 15分間発色させる。(発色反応)
 5. 基質液を加えた順番で、各wellに の停止液を100 μlずつ加えて反応を停止させ、よく混和する。
 6. 蒸留水を対照としてマイクロプレートリーダーのゼロ調節を行った後、波長450nmで各wellの吸光度を測定する。発色は反応停止後1時間まで安定である。
 7. 陽性コントロールを用いて検量線を作成する場合は、グラフ用紙の横軸に各ウイルス単位を、縦軸にそれに対応する吸光度を0 unit (検体希釈液) の吸光度でブランク補正した後、プロットする。この検量線を利用して、検体の吸光度から対応するウイルス単位を読み取る。

V. 性能

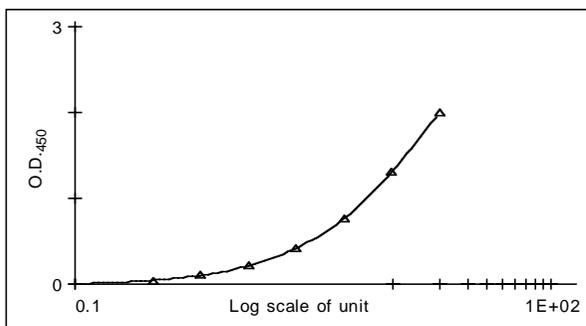
1. 検出感度

HA価で0.4以上のウイルスを検出できる。

測定範囲 (典型的な検量線の例を以下に示す。しかし、検量線は測定ごとに作成しなければならない。)

Curve Fit: 4-Parameter Corr. Coeff: -1.00

$$y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$$
A = -0.00686 B = 0.986 C = 23.8 D = 4.41



(ブランク補正済み)

| Positive Control (unit) | 20.0 | 10.0 | 5.00 | 2.50 | 1.25 | 0.625 | 0.313 | 0.00 |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| O.D.450 | 2.184 | 1.484 | 0.945 | 0.597 | 0.396 | 0.285 | 0.226 | 0.173 |

2.再現性

同時再現性

陽性コントロールを希釈して作製した3種類のサンプルを用いて同時再現性試験を実施した。(n=16)

同時再現性 (n=16)

| | X (unit) | Sd (unit) | CV (%) |
|-------|----------|-----------|--------|
| サンプル1 | 2.730 | 0.102 | 3.7 |
| サンプル2 | 0.867 | 0.038 | 4.4 |
| サンプル3 | 0.367 | 0.020 | 5.5 |

日差再現性

陽性コントロールを希釈して作製した3種類のサンプルの測定を3日間にわたり行い、日差変動を調べた。

日差変動 (n=3)

| | X (unit) | Sd (unit) | CV (%) |
|-------|----------|-----------|--------|
| サンプル1 | 2.680 | 0.046 | 1.7 |
| サンプル2 | 0.828 | 0.038 | 4.5 |
| サンプル3 | 0.336 | 0.031 | 9.2 |

VI. 測定に関する基本資料

1.抗体プレートの特異性

プレートに固相化されている抗体は、サブタイプH5N9のA型インフルエンザウイルス (A/Turkey/Ontario/7732/66) をマウスに感作して得られたモノクローナル抗体で、A型インフルエンザウイルスのNP (核蛋白質) に反応します。したがって、全てのA型を検出できると考えられます。

2.ビオチン化抗体の特異性

ビオチン標識された抗体はA型H1N1株、A型H3N2株、B型三重株、B型広東株の混合ウイルスをウサギに感作して得られたウサギ・ポリクローナル抗体で、インフルエンザA型およびB型いずれにも反応します。

3.検出可能なウイルスの一覧

| | | | |
|--------|--|---------|---------------------------------|
| (H1N1) | A/PR/8/34 A/Bangkok/10/83 A/Yamagata/120/86 A/Osaka/930/88 A/Suita/1/89 | (H3N8) | A/Budgreiger/Aichi/1/77 |
| (H2N2) | A/Okuda/57 A/Adachi/2/57 A/Kaizuka/2/65 A/Izumi/5/65 A/Takatsuki/4/65 | (H4N6) | A/Duck/Czechoslovakia/1/56 |
| (H3N2) | A/Aichi/2/68 A/Fukuoka/C29/85 A/Sichuan/2/87 A/Ibaraki/1/90 A/Suita/1/90 | (H5N3) | A/Whistling swan/shimane/476/83 |
| | | (H5N9) | A/Turkey/Ontario/7732/66 |
| | | (H6N5) | A/Shearwater/Australia/1/72 |
| | | (H6N6) | A/Whistling swan/shimane/37/80 |
| | | (H7N7) | A/Tufted duck/shimane/124R/80 |
| | | (H8N4) | A/Turkey/Ontario/6118/68 |
| | | (H9N2) | A/Turkey/Wisconsin/66 |
| | | (H10N7) | A/Chicken/Germany/N/49 |
| | | (H11N6) | A/Duck/England/56 |

4. MDCK細胞へのウイルス接種とサンプル調製の方法

検体（鼻汁）中のウイルス量が少ない場合、鼻汁をそのまま測定しても陰性となることがあります。そのような場合は培養細胞中でウイルスを増殖させてからELISAに供する方法もあります。この場合のサンプル調製法を簡単に示します。

血清含有培地を用いて96穴プレート中で80%飽和まで培養したMDCK細胞から培養上清を除き、200 µlのPBSでwellを1回洗浄する。wellから液を十分に除いた後、PBSで希釈した鼻汁をwellに25 µl加え、37 °Cで60分放置してウイルスを細胞に感染させる。さらに血清含有培地をその上に100 µl添加し、15～20時間培養する。培養後、100 µlの検体希釈液を加え、軽くピペティングする。この細胞懸濁液を原液のまま測定に供する。

5. ウイルス分離法との比較

ELISA法は、ウイルス粒子が1つ存在すれば検出可能というウイルス分離法と比べて感度的には及びませんが、測定時間が短いという利点があります。本キットを用いた場合では、2時間15分の操作時間内で測定を行うことができます。鼻汁サンプル（未希釈）を本法とウイルス分離法とで測定し、両者を比較した結果を次に示します。

ウイルス分離法でA型陽性であった検体 50例中
ELISA法でA型陽性であった検体 34例

6. 他社キットとの比較

本キットとBecton Dickinson社製ディレクティジェンFlu Aを用いて検体を測定し、両者の結果を比較したところ、結果はすべて一致した。

陽性コントロールを用いた検出感度の比較では本キットが20倍上回った。

VII. 使用上の注意

1. ロット番号の異なるキットや試薬を混ぜて使用しないでください。
2. 保存もしくは反応中に、試薬を強い光に当てないでください。
3. Substrate Solution (TMBZ)および Stop Solutionに用いるピペット等は、金属が使用されていないものを使用してください。
4. Substrate Solution (TMBZ)や Stop Solutionは皮膚や粘膜につかないようご注意ください。
5. 着色した Substrate Solution (TMBZ)は使用しないでください。
6. 各反応は時間や温度の影響を受けますので、測定ごとに検量線を作成してください。
7. ウイルスの感染や拡散を避けるために、検体の取り扱いには充分注意してください。

VIII. 注意

本製品は、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。

IX. 参考文献

- 1) Wiley (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56, 365-394.
- 2) 植田稔、奥野良信 (1997) 日本胸部臨床 56巻11号 : S116-S121.

製品についての技術的なお問い合わせ先

Takara テクニカルサポートライン

Tel 077-543-6116 Fax 077-543-1977

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社