



# HBs S Antigen Quantitative ELISA Kit, Rapid – II

## 使用手順書

BCL-SHP-21

### 背景

B型肝炎ウイルス（HBV）の表面抗原にはS抗原、M抗原およびL抗原の3種類があります。臨床的には、S抗原は感染者血液中に多いためHBsAg抗原と同義に使われ、定性的な測定値を元にHBV感染診断に広く使われています。本キットはこのS抗原を定量するキットです。

### 本製品の特徴

1. ヒト血清・血漿中のS抗原の定量が可能
2. 高感度測定が可能（0.05 nUnit/mL\*まで検出可能）

\*:Unit定義は、下記の「本キットにおける測定値の定義について」をご参照下さい。

### 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-AGC-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。迅速測定が可能。	
BCL-S2HP-01	HBs Pre-S2 Quantitative ELISA KIT,Rapid	1キット (96well×1plate)
	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。	

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](http://www.beacle.com))をご覧ください。

### 測定原理と測定時間

本キットはS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、いわゆるサイドイッチ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段階法：①固相化抗体・検出抗体との反応：60分間 → ②発色反応：30分間（計90分）\***

**2段階法：①固相化抗体反応：60分間 → ②検出抗体反応：60分 → ③発色反応：30分間（計150分）**

**【重要】①低濃度域での測定値が重要な場合や検出時の吸光度を高くしたい場合は、反応を室温(25℃前後)ではなく37℃で行うようにしてください。なお、37℃で反応させた場合、バックグラウンドが高くなる場合があります。**

### 本キットにおける測定値の定義について

Pre-S1やPre-S2抗原領域が結合したLタンパク質やMタンパク質のS抗原領域は、それがないSタンパク質のそれとは異なる抗原力価を示します（高次構造の違いと思われる）。そのため本キットではキットに添付の標準抗原の1 ng/mLの保有するS抗原力価を1 nUnit/mLとしています。この値はWHOの標準抗原の活性と比較すると凡そ0.5～1.0 IU/mLに相当します。

### 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。半年は安定です。



## 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

- 標準抗原 (Standard S Antigen) : 100 ng (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 (Anti S Detection IgG(HRP-labeled)) : 12μL (1本)
- 基質 A (Chromogenic Reagent A) : 6mL (1本)
- 基質 B (Chromogenic Reagent B) : 6mL (1本)
- 停止液 (Stop Solution) : 6.5mL (1本)
- 固相化済 96穴マイクロプレート (Assay Plate For S Antigen) : 1枚 (ストリップ型)
- 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=450nm)
- 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>

- 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。
- 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。
- 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100nUnit/mLになります。

### 1段階法で測定する場合 (迅速法)

#### <①スタンダード調製>

- チューブの一本に反応バッファーを900μL入れ、100 nUnit/mLの抗原原液を100μL添加し、よく混和し、10 nUnit/mL (STD①)の抗原溶液となります。以下、同様の手順で、下記の希釈表に従って反応バッファーによる抗原溶液の希釈系列を作ります。

STD ID	反応バッファー (or バッファーA)	添加する抗原溶液			希釈後濃度
		濃度	体積		
STD①	900 μL	100 nUnit/mL*	100 μL	を添加	10 nUnit/mL
STD②	500 μL	10 nUnit/mL	500 μL	を添加	5 nUnit/mL
STD③	600 μL	5 nUnit/mL	400 μL	を添加	2 nUnit/mL
STD④	500 μL	2 nUnit/mL	500 μL	を添加	1 nUnit/mL
STD⑤	500 μL	1 nUnit/mL	500 μL	を添加	0.5 nUnit/mL
STD⑥	800 μL	0.5 nUnit/mL	200 μL	を添加	0.1 nUnit/mL
STD⑦	500 μL	0.1 nUnit/mL	500 μL	を添加	0.05 nUnit/mL

\* : 抗原チューブで調整した抗原原液

注 : 反応バッファー1段階法、バッファーAは2段階法で使用

- 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. サンプルの S 抗原力価が本キットの測定範囲 (0.05~10nUnit/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 S 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・血漿サンプルを測定する場合、反応バッファーにて 100 倍に希釈して測定サンプルとしてください。

**【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%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。  
②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。

## <③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 STD①から STD⑦、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  $\mu$  L ずつ分注します (triplicate 測定)。
3. HRP 標識検出抗体溶液を反応バッファーで 500 倍希釈し、50  $\mu$  L ずつ 8 連ピペットにより各 well へ分注し、室温 (25°C前後) で 60 分間、インキュベーションします。

これ以降は<④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 (高感度法)

### <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 900  $\mu$  L 入れ、100 nUnit/mL の抗原原液を 100  $\mu$  L 添加しよく混和し、10 nUnit/mL (STD①)の抗原溶液となります。以下、同様の手順で、上記の希釈表に従ってバッファーAによる抗原溶液の希釈系列を作ります。

### <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 (0.05~10nUnit/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】** 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%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。  
②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。

### <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 3 well に 100  $\mu$  L ずつ分注し (triplicate 測定)、室温 (25°C) で 1 時間インキュベーションします。
3. 検出抗体を反応バッファーで 1000 倍希釈し、検出抗体溶液を調整します。
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 $\mu$ 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 100 $\mu$ L ずつ分注し、室温 (25°C) で 1 時間インキュベーションします。

これ以降は<④発色試薬の調製>へお進み下さい。

### <④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. 基質 A と基質 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  $\mu$  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  $\mu$  L ずつ 8 連ピペットにより各 well へ分注します。遮光し、室温で正確に 30 分間、静置します。
4. 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  $\mu$  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>**

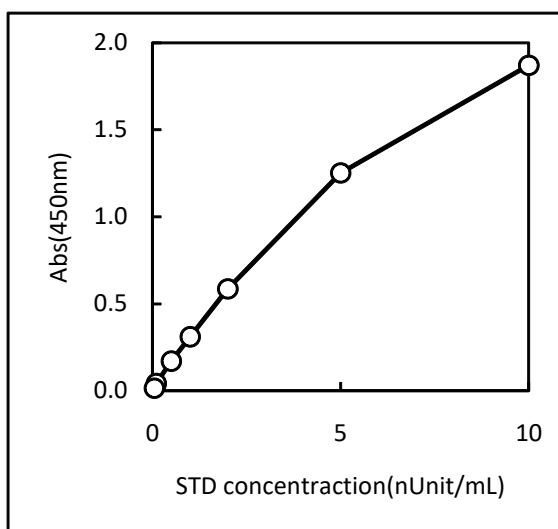
1. 反応停止後直ぐに発色サンプルの入ったプレートをプレートリーダー（吸収波長 450 nm）で吸光度を測定します。
2. 測定した吸光度からブランクで得られた値を引いた値をスタンダードとサンプルの測定値とします。
3. スタンダードの測定値を各スタンダード濃度に対してプロットしプロットに最もフィットする曲線をコンピューターなどによって求めます。通常は 4 パラメーターロジスティック曲線モデルを用います。
4. 得られた曲線式に基づいてサンプルの S 抗原力価を求めてください。
5. 本キットの測定範囲（0.05~10 nUnit/mL）を外れた測定値は採用しないで下さい。

**【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		Abs450nm
ID	nUnit/mL	
STD①	10	1.870
STD②	5	1.252
STD③	2	0.586
STD④	1	0.311
STD⑤	0.5	0.171
STD⑥	0.1	0.042
STD⑦	0.05	0.015



**【ご注意】** 本測定例は当社内で行って得られた 2 段階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。

**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](mailto:technical-support@beacle.com)

Website: [www.beacle.com](http://www.beacle.com)

以上