

牛海綿状脳症診断用酵素抗体反応キット(ワンポット前処理法)

プリオン蛋白のコア領域に対するモノクローナル抗体を固相化したプレートに、ワンポット前処理法で調製した検体を添加し、酵素抗体法により牛海綿状脳症の異常プリオン蛋白を検出するためのキットである。

1 小分け製品の試験

1.1 特異性試験

1.1.1 試験材料

試験品及び非感染牛延髄（付記1）を用いる。

1.1.2 試験方法

1.1.2.1 陰性検体の作製

非感染牛延髄 110±20mg をバイオマッシャーに入れ、これを回収用チューブ内にセットし 15,000 G で 30 秒間の遠心操作を行う。バイオマッシャーを廃棄し、回収用チューブに酵素混合液（付記2）を 1mL 加え、全体が均一になるまで攪拌する。56°C で 10 分間反応後、直ちに 100°C で 10 分間加熱する。これを 37°C 以下まで冷却したものを陰性検体とする。

1.1.2.2 酵素抗体反応

抗体プレートの3穴に陰性コントロールを、3穴に陽性コントロール液（付記3）を、4穴に陰性検体をそれぞれ 100 μL ずつ加え、37°C で 1 時間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、希釈標識抗体液（付記4）を 100 μL ずつ加え、4~8°C で 30 分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、基質液を 100 μL ずつ加える。プレートを遮光して常温で 30 分間反応させた後、反応停止液を 100 μL ずつ加え、30 分以内に各穴の吸光度を波長 450nm で測定する。

1.1.2.3 判定

陰性コントロール液3穴の吸光度平均値が 0.2 以下、および陽性コントロールの吸光度から陰性コントロールの平均値を差し引いた値がいずれも 1.2 以上であるとき、試験が成立したものとする。

検体の吸光度から陰性コントロールの平均値を差し引いた値がカットオフ値（付記5）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。

陰性検体はすべて陰性でなければならない。

1.2 吸光度試験及び力価試験

1.2.1 試験材料

試験品、参照陽性抗原（付記6）及び標準試料溶液 L、M 及び H（付記7）を用いる。

1.2.2 試験方法

参照陽性抗原の2倍階段希釈系列を希釈用緩衝液（付記8）を用いて64倍まで作製し、各希釈の参照陽性抗原を抗体プレートの2穴ずつに、標準試料溶液 L、M 及び H を抗体プレートの8穴ずつに、陰性コントロールを3穴に加え、37°C で1時間反応させる。洗浄

液でプレートを洗浄し、希釈標識抗体液を 100 μ L ずつ加え、4~8°C で 30 分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、基質液を 100 μ L ずつ加える。プレートを遮光して常温で 30 分間反応させた後、反応停止液を 100 μ L ずつ加え、30 分以内に各穴の吸光度を波長 450nm で測定する。参照陽性抗原希釈系列の測定結果を用いて作成した検量線により、標準試料溶液 L、M 及び H の吸光度からこれらの濃度を算出する。

1.2.3 判定

参照陽性抗原の吸光度値から、陰性コントロールの平均値を差し引いた値は 1.2 以上でなければならない。また、標準試料溶液 L、M 及び H の算出濃度と、あらかじめ調整された濃度との誤差は 25.0% 以内でなければならない。

付記 1 非感染牛延髄

牛海綿状脳症に感染していない牛の延髄

付記 2 酵素混合液

試薬 A (破碎用緩衝液)、試薬 B (プロテイナーゼ K) 及び試薬 C (マイクロバイアルセリンプロテイナーゼ) を、100:1:1 の割合に混合したもの

付記 3 陽性コントロール液

陽性コントロールを、水 2mL で溶解したもの

付記 4 希釈標識抗体液

標識抗体溶液を標識抗体用希釈液で 30 倍希釈したもの

付記 5 カットオフ値

陰性コントロール 3 穴の吸光度の平均値に 0.30 を加えた値

付記 6 参照陽性抗原

組換え牛プリオン蛋白質が、0.002 μ g/mL になるように、アルブミン含有リン酸緩衝液 (付記 9) に溶解したもの

付記 7 標準試料溶液 L、M 及び H

組換え牛プリオン蛋白質をアルブミン含有リン酸緩衝液に溶解し、希釈用緩衝液で次の濃度に調整したもの

L: 0.00007 \pm 0.00003 μ g/mL

M: 0.0002 \pm 0.0001 μ g/mL

H: 0.0008 \pm 0.0002 μ g/mL

付記 8 希釈用緩衝液

陰性コントロールと同様の組成を持つもの

付記9 アルブミン含有リン酸緩衝液

1000mL 中

アルブミン（乾燥脱糖卵白） 10g

塩化カリウム 0.2g

塩化ナトリウム 8.0g

リン酸二水素カリウム 0.2g

リン酸水素二ナトリウム・12水 2.9g

アジ化ナトリウム 0.5g

水 残量

pHを7.2に調整する