

取扱説明書

*本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用できません。
*下記 web 上に掲載しているプロトコルの最新版を確認の上、操作して下さい。
<https://www.cellspect.com/>

測定の意義

本キットは、COVID-19 の原因ウイルスである、SARS-CoV-2 のスパイクタンパクを認識するヒト IgA 抗体を検出するための研究用 ELISA キットです。
ウイルスの検出には、大きく分けて二種類のアプローチ法があり、PCR 法などのウイルス自体を検出する方法と、感染時に発現する免疫反応 (IgG, IgM, IgA) を検出する方法があります。IgA は唾液や鼻咽頭部などの粘膜部に特に多く存在し、一般的には感染を阻止する機能を持っています。

測定原理

- ① 固相化プレート上のリコンビナント SARS-CoV-2 スパイクタンパクと、これを認識する試料中の抗体 (以後、抗スパイクタンパク抗体と略称) を反応させる。
- ② 反応後、試料を洗浄操作により除去する。
- ③ 固相化プレート上の抗スパイクタンパク抗体と、HRP (Horseradish peroxidase) 標識抗ヒト IgA 抗体を反応させる。
- ④ 余剰の HRP 標識抗ヒト Ig A 抗体を洗浄操作により除去する。発色基質を加え、吸光度を測定する。

抗 SARS-CoV-2 スパイクタンパク抗体 (IgA) 測定

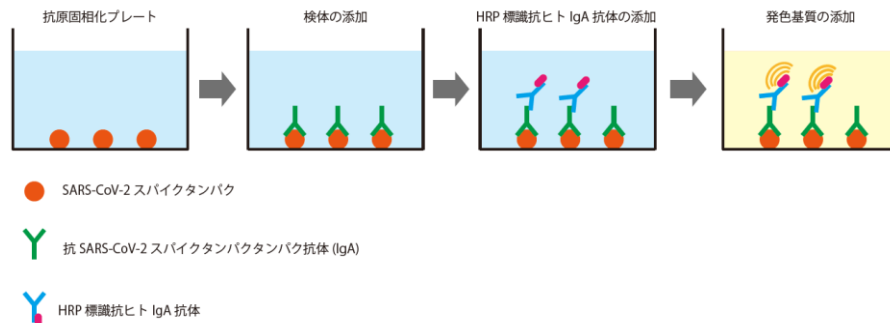


図 1 : 測定概略

キット内容

合計 96 測定分 (商品コード: RCAEL961-SF)		
1.	SARS-CoV-2 スパイクタンパク 固相化プレート	×1
2.	HRP 標識抗ヒト IgA 抗体	10 µL×1 ●
3.	洗浄液 (10× PBST)	50 mL×1 ●
4.	スキムミルク (ブロッキングバッファー用)	×1 ●
5.	Diluent 用バッファー (10×)	50 mL×1 ○
6.	R-1 : 発色基質 (TMB)	22 mL×1 遮光ボトル
7.	R-2 : 反応停止液 (1 mol/L 塩酸)	22 mL×1 ●
8.	マイクロプレートシール	×2

キット以外に必要な器具・試薬

- マイクロプレートリーダー
- マイクロピペットおよびチップ
- マルチチャンネルピペット
- メスシリンダー
- サンプルチューブ
- マイクロプレートシェーカー
- ペーパータオル
- マルチチャンネルピペット用 リザーバー
- 精製水
- 500 mL / 250 mL ボトル

操作方法

1. 試薬の調製
 - (1) Diluent (1×)調製
Diluent 用バッファー(10×)全量を精製水で 10 倍希釈し、Diluent (1×)とする。
※Diluent 用バッファー(10×)に析出が生じていた場合は、室温に戻して完全に溶解させてから希釈すること
 - (2) ブロッキングバッファー (5%(w/v)スキムミルク溶液) の調製
スキムミルク (ブロッキングバッファー用)、全量を Diluent (1×) 220 mL で溶解させる。
※使用前に溶解すること
※プレートを分割使用する場合は、必要量を計算し、秤量したスキムミルクを Diluent(1×)で溶解し、5%(w/v)スキムミルク溶液を調整する。
 - (3) 抗体 / 試料希釈液 (2%(w/v)スキムミルク溶液) の調製
ブロッキングバッファー 160 mL に Diluent(1×) 240 mL を加えて、混和させる。

取扱説明書

- (4) WR (Working Reagent : HRP 標識抗ヒト IgA) 調製
抗体 / 試料希釈液を用いて 1:20,000 に希釈し、WR : Working Reagent とする。

表 1. 希釈例

試験管 No.	希釈試料	試料量 (μL)	抗体 / 試料希釈液 (μL)	開始希釈倍率	希釈倍率
1	HRP 標識抗ヒト IgA 抗体	5	495	1	100
2	試験管 No.1	50	9950	100	20,000

- (5) WB (Wash Buffer : 洗浄液) 調製
洗浄液 (10×PBST) 全量を精製水で 10 倍希釈し、WB : Wash Buffer とする。
※洗浄液 (10×PBST) に析出が生じていた場合は、室温に戻して完全に溶解させてから希釈すること

2. SARS-CoV-2 スパイクタンパク固相化プレートのブロッキング

- (1) SARS-CoV-2 スパイクタンパク固相化プレートをアルミパウチより取り出し、WB にて 1 回洗浄する。
※洗浄操作
A) WB 200 μL をウェルに添加する。
B) 30 秒ほど経過後にウェル中の WB を廃棄する。
C) A)および B)を指定の回数繰り返す。
D) ペーパータオルに叩きつけるようにし、しっかりと液を切る。
(2) ブロッキングバッファーを SARS-CoV-2 スパイクタンパク固相化プレートのウェルに 200 μL ずつ分注し、室温下で 1 時間静置する。
(3) ブロッキングバッファーを廃棄し、WB にて 3 回洗浄する。(2.(1) ※洗浄操作 参照)

3. 測定試料の調製

試料は調製した 抗体 / 試料希釈液を用いて 1:200~1:2,000 に希釈し、測定試料とする。

表 2. 測定試料希釈例 (1 : 1,000)

試験管 No.	希釈試料	試料量 (μL)	抗体 / 試料希釈液 (μL)	開始希釈倍率	希釈倍率
1	測定試料*	10	190	1	20
2	試験管 No.1	10	490	20	1,000

*唾液、喀痰を測定試料とする場合は 3000rpm, 4℃, 15 分間遠心し、上清を用いる

4. 測定

- 調製した測定試料をブロッキングした固相化プレートのウェルに 100 μL ずつ分注する。
- 測定試料を分注した固相化プレートにマイクロプレートシールを貼り付け、室温で 1 時間反応させる。
- (2)の反応時間終了後、反応液を廃棄し、WB にて 5 回洗浄する。(2.(1) ※洗浄操作 参照)
- 洗浄した固相化プレートの各ウェルに、WR 100 μL を添加する。
- WR を添加した固相化プレートにマイクロプレートシールを貼り付け、室温で 1 時間反応させる。
- (5)の反応時間終了後、反応液を廃棄し、(3)と同様に WB にて 5 回洗浄する。(2.(1) ※洗浄操作 参照)
- 洗浄した固相化プレートに、R-1 100 μL を各ウェルに添加する。
- R-1 を添加した固相化プレートを、マイクロプレートシェーカーなどで振とうし、遮光して室温で 6 分間反応させる。
- (8)の反応時間終了後、R-2 100 μL を各ウェルに添加し、450 nm の吸光度を測定する。

注意点

1. 測定試料

- 試料は新鮮なもの又は-20℃以下で保存したものを使用して下さい。
- 保存料は使用しないでください。

2. 測定

- 別ロットの試薬は使用しないでください。
- 発色基質はできるだけ光を当てないでください。
- 洗浄後の固相化プレートは、測定終了まで乾燥させないでください。
- 固相化プレートは、底面にスパイクタンパクが固相化されています。ピペット等との接触により剥離すると、バラツキの要因になります。ピペット等がプレートの底面や壁面に触れないようにしてください。
- プレートの温度のムラは測定値のばらつきの原因となります。
A) 試薬及びプレートは、必ず室温(20~25℃)に戻してから使用して下さい。
B) 反応は必ず室温で行ってください。また、室内でも温度差や風当たりなどで、温度ムラの生じる箇所があります。エアコンの吹き出し口近辺などの温風や冷風の当たる場所、熱源近辺、窓際などの日光の当たる場所などでは使用しないでください。
C) 指などで長時間プレートに触れると、プレートが体温により加温されプレート内で温度差が生じます。プレートにはなるべく触れないようにしてください。
- 試薬は順番通り、正確な時間で添加してください。また、反応時間は正確にとってください。
- 反応停止液は強酸です。取り扱いには十分注意してください。

3. 本キットを分割使用する際の注意

- 本キットに付属の HRP 標識抗ヒト IgA 抗体は凍結融解を繰り返さないでください。
- HRP 標識抗ヒト IgA 抗体以外の試薬類は当日中に使用しない場合、キャップをしっかりと閉め、冷蔵保存してください。
- 調製済みのブロッキングバッファーは、冷蔵保管で 24 時間以内に使用してください。
- 固相化プレートの未使用ウェルストリップは、チャック袋に乾燥剤を同梱の上、冷蔵保管して下さい。
- 開封後の HRP 標識抗ヒト IgA 抗体、ブロッキングバッファー以外の試薬・固相化プレートの未使用ウェルストリップは、冷蔵で一週間保管が可能です。

製品仕様

固相化タンパク質：スパイクタンパク質(Full-Length)
測定数：96 測定
測定方法：間接 ELISA 法
測定波長：450 nm
測定試料：血清、唾液、喀痰
交差性：Human
プレートへの固相化抗原：SARS-CoV-2 スパイクタンパク (S1+S2 ドメイン, 哺乳類細胞発現系)
保管温度：2-8°C保管
品質保証期限：本品の有効期限は製造後 6 カ月です。

参考文献

- 1.) 平松 啓一, 標準微生物学, 第 11 版, 医学書院 (2012)
- 2.) Andrea Padoan, IgA·Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study, Clinica Chimica Acta, 507, 164-166, Aug., 2020.
- 3.) Yin Xia Chao, The role of IgA in COVID-19, Brain, Behavior, and Immunity, 87, Jul., 2020 .

製造販売業者

セルスペクト株式会社
〒020-0857 岩手県盛岡市北飯岡 2-4-23
※クオリサーチは、セルスペクト株式会社の試薬キットの名称です。

問い合わせ先

セルスペクト株式会社
TEL：019-134-6616
e-mail：support@cellspect.com
URL：https://www.cellspect.com/

- ※ 本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用できません。
- ※ 取扱説明書、測定プロトコール等、製品に関する最新の情報は下記弊社 web サイトのサポートコーナーでご確認下さい。
<https://www.cellspect.com/>
- ※ 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではありません。あらかじめご了承ください。
- ※ 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダーを用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承ください。
- ※ 品質に関してのお問い合わせの際は試薬キット包装袋に貼付の Lot No. をご確認の上、お問い合わせ下さい。
- ※ 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコールは予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切にご使用下さい。
- ※ 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については付属の安全データシート (SDS) に従って下さい。