



ELISA アッセイの迅速かつ効率的な処理

Tecan HydroSpeed™プレートウォッシャーと Infinite® F50 吸光リーダーを使用

注: このノートには、米国食品医薬品局など規制当局の許可または承認を受けていない自動化と試薬キットとの組み合わせについて記載されていません。体外診断 (IVD) 用アプリケーションの自動化を実行する前に現地の規制当局に確認をしてください。

緒言

このアプリケーションノートでは、Tecanの新しいハイドロスピードプレートウォッシャーとインフィニットF50 吸光リーダーを使用したHBs Agアッセイにおいて良好な評価が得られた試験結果を報告している。このHBs Agアッセイは、ヒトの血清または血漿を用いてB型肝炎ウイルス表面抗原 (HBs Ag) を検出するための1ステップ「サンドイッチ法」による定量的酵素免疫測定 (ELISA) の1例として使用する(1)。

B型肝炎はB型肝炎ウイルス (HBV) を起因とする感染症であり、ウイルスがヒトの肝臓に感染して炎症を起こす。感染した血液または感染した他の体液に接触することでウイルスは伝播し、世界人口の約3分の1はHBVに感染している。

HBs Agアッセイにより、ヒトの血清または血漿からHBs Agを検出することが可能になる。HBs Agは感染後、最初に出現するマーカーであり、検出されてから2~3週間後に疾患の最初の臨床的および生物学的症状が生じる(1)。B型肝炎は輸血で感染する危険性が高いため、HBVの検出は、世界中で日常的に行われている最も重要な臨床検査である。

供血時にHBs Agを検出して輸血時のHBV伝播を防止することは、非常に重要である。

Tecanの新しいハイドロスピードプレートウォッシャー (96および384ウェルプレート形式) は、ELISAおよび細胞を用いたアッセイにおけるバキュームフィルトレーション、マグネティックビーズ分離・洗浄などのアプリケーションの範囲で最先端の特徴を提供する。ハイドロスピードのAnti-Clogging™ (目詰まり防止) 機能により信頼性の高い操作が提供され、プレート間のアイドル時間中に、通常、洗浄液の結晶化によって生じるニードルの詰まりを防止する。

インフィニットF50は、正確かつ再現可能な迅速測定を提供するだけでなく、小型化された革新的デザインによって新しい基準を打ち立てたTecanの最新の8ウェル同時測定吸光マイクロプレートリーダーである。Tecanの使いやすい制御およびデータ解析用ソフトウェアMagellan™とともに、インフィニットF50は多様なELISAアプリケーションに最適である。

ハイドロスピードプレートウォッシャーとインフィニットF50吸光リーダーは、ELISAアッセイにとって申し分のない組み合わせであり、高速処理および正確なデータ獲得/解析を可能にし、臨床研究検査室の主要な要求事項を満たすことができる。

材料および方法

機器

- ELISA および細胞洗浄用に 96HT または 96 インデックスヘッドを備えたハイドロスピード プレートウォッシャー
- インフィニット F50 吸光リーダー

マイクロプレート

- NUNC® MaxiSorp™ 96 ウェルストリッププレート(キットに付属)

試薬

- HBs Ag ELISA キット

アッセイの手順

HBs Ag ELISA は、薄いサンプル濃度で微量の B 型肝炎ウイルス表面抗原を検出し、アルカリ性洗浄バッファーおよびテトラメチルベンジジン (TMB) を用いて発色を検出する。この ELISA アッセイの詳細な情報および原理の説明については、アッセイの解説を参照する(1)。

アッセイは、製造会社のアッセイマニュアルに従い、キットの陰性対照 (NC) および陽性対照の他、患者の血清の陽性サンプル 15 点および陰性サンプル 76 点を用いて実施した(図 1)。96HT 洗浄ヘッドまたは 96i 洗浄ヘッドを備えたハイドロスピードプレートウォッシャーを用いてすべての洗浄ステップを実施し、インフィニット F50 吸光リーダーを用いてデータを読み取った。洗浄プログラムおよび測定条件の詳細な情報については、図 2 および表 1 を参照する。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC1	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos
B	NC2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
C	NC3	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg
D	NC4	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
E	PC1	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
G	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
H	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos

図 1: プレートの配置。NC1-4 = 陰性対照、PC1 = 陽性対照、Pos = 患者の陽性サンプル、Neg = 患者の陰性サンプル

測定条件および洗浄プログラム

測定パラメータ	
プレート定義ファイル	NUN96ft.pdfx
波長	450 nm
基準波長	620 nm

表 1: インフィニット F50 吸光リーダーの測定パラメータ

Program Parameter:

Program name:	ELISA_HBsAg_96	Wash head:	96
Program mode:	Plate	Aspiration rate:	4
		Perform tip prime:	No
Plate parameter:			
Plate name:	NUNC MaxiSorp_ELISA		
Aspiration position 1:	2000 µm	Dispense Y offset:	2200 µm
Aspiration position 2:	0 µm	Bottom position:	3500 µm
Aspiration position 3:	-2000 µm	Overflow position:	14600 µm
Aspiration position 4:	2000 µm	Bottom form:	Flat
PROGRAM BEGIN 1 ELISA_HBsAg_96			
CYCLE 1 Number of Cycles: 5			
WASH	Mode: Crosswise, Z-Position aspiration: BOTTOM, Z-Position wash: OVERFLOW, Channel: 1, Volume: 800 µl, Head speed: 10 mm/s, Wash rate: 280 µl/s, Aspirate rate: 4, Aspirate time: 4 s		
CYCLE 2 Number of Cycles: 1			
WASH	Mode: Crosswise, Z-Position aspiration: BOTTOM, Z-Position wash: CUSTOM, Z-Position wash value: 4.0 mm, Channel: 1, Volume: 500 µl, Head speed: 10 mm/s, Wash rate: 280 µl/s, Aspirate rate: 4, Aspirate time: 4 s		
FINAL ASPIRATE	Mode: Crosswise, Z-Position: BOTTOM, Time: 5 s, Head speed: 10 mm/s, Aspiration rate: 4		
PROGRAM END			

図 2: 96HT 洗浄ヘッドを備えたハイドロスピードプレートウォッシャーの洗浄プログラム。96i 洗浄ヘッドの場合は、同一プログラムで洗浄速度 180 µl/s を使用した。

結果および考察

アッセイの結果の解釈(キットマニュアルより)

1. 陰性対照の値 (NC1 - NC4) はすべて吸光度 ≤ 0.08 OD であること
2. 各陽性対照の吸光度は ≥ 1.0 OD であること
3. カットオフ値: NC 平均値 + 0.05
4. 比の計算: サンプルの OD / カットオフ時の OD
 比 > 1 : サンプルは陽性
 比 < 0.9 : サンプルは陰性
 比 > 0.9 かつ < 1 : サンプルは陰性であるが、再検査を要する。

図 3: Magellan - 生データ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SM1_4 1/1 negative		SM1_20 1/1 negative	SM1_28 1/1 negative	SM1_36 1/1 negative	SM1_44 1/1 negative	SM1_52 1/1 negative		SM1_88 1/1 negative	SM1_96 1/1 negative		
B	SM1_5 1/1 negative	SM1_13 1/1 negative	SM1_21 1/1 negative	SM1_29 1/1 negative	SM1_37 1/1 negative		SM1_53 1/1 negative	SM1_61 1/1 negative	SM1_69 1/1 negative	SM1_77 1/1 negative	SM1_85 1/1 negative	
C	SM1_8 1/1 negative	SM1_14 1/1 negative		SM1_30 1/1 negative	SM1_38 1/1 negative	SM1_46 1/1 negative	SM1_54 1/1 negative	SM1_62 1/1 negative	SM1_70 1/1 negative		SM1_98 1/1 negative	
D	SM1_7 1/1 negative	SM1_15 1/1 negative	SM1_23 1/1 negative	SM1_31 1/1 negative		SM1_47 1/1 negative	SM1_55 1/1 negative	SM1_63 1/1 negative	SM1_71 1/1 negative	SM1_79 1/1 negative	SM1_87 1/1 negative	
E	SM1_3 1/1 negative		SM1_24 1/1 negative	SM1_32 1/1 negative	SM1_40 1/1 negative	SM1_48 1/1 negative	SM1_56 1/1 negative	SM1_64 1/1 negative	SM1_72 1/1 negative	SM1_80 1/1 negative	SM1_88 1/1 negative	
F	SM1_1 1/1 negative	SM1_9 1/1 negative	SM1_17 1/1 negative	SM1_25 1/1 negative	SM1_33 1/1 negative	SM1_41 1/1 negative	SM1_49 1/1 negative	SM1_57 1/1 negative	SM1_65 1/1 negative	SM1_73 1/1 negative	SM1_81 1/1 negative	SM1_89 1/1 negative
G	SM1_2 1/1 negative	SM1_10 1/1 negative	SM1_18 1/1 negative	SM1_26 1/1 negative	SM1_34 1/1 negative	SM1_42 1/1 negative		SM1_58 1/1 negative	SM1_66 1/1 negative	SM1_74 1/1 negative	SM1_82 1/1 negative	SM1_90 1/1 negative
H	SM1_11 1/1 negative	SM1_19 1/1 negative		SM1_35 1/1 negative	SM1_43 1/1 negative	SM1_51 1/1 negative	SM1_59 1/1 negative		SM1_75 1/1 negative	SM1_83 1/1 negative		

図 4: Magellan - カットオフ時の結果

図 3 および 4 は、生データおよび 96HT 洗浄ヘッドを備えたハイドロスピードプレートウォッシャーを用いた Magellan ソフトウェアから得たカットオフ時の最終結果を示す。全陰性対照は吸光度が 0.08 OD 未満、全陽性対照は吸光度が 1.0 超とする。患者の全陽性サンプルおよび陰性サンプルは正確に検出され、偽陽性および偽陰性結果は認められなかった。再検査を要するサンプルはなかった。96i 洗浄ヘッドでの結果は示していないが、上記のデータとほぼ同じであった。

注: 患者の陽性サンプルは、いずれもプローブをあらかじめ希釈せずに使用した。したがって、生データの値は「オーバーフロー」(OD > 4)として示されている。その結果、これらのウェルは通常陽性サンプルを示す赤色を表示しなかった。

結論

このアプリケーションノートに示した結果は、ハイドロスピードプレートウォッシャーとインフィニット F50 吸光リーダーが HBs Ag アッセイ等、ELISA の迅速かつ効率的な処理に十分適していることを明確に示している。

Austria +43 62 46 89 33 Belgium +32 15 42 13 19 China +86 21 2898 6333 Denmark +45 70 23 44 50 France +33 4 72 76 04 80 Germany +49 79 51 94 170
Italy +39 02 92 44 790 Japan +81 44 556 73 11 Netherlands +31 18 34 48 174 Portugal +351 21 000 82 16 Singapore +65 644 41 886 Spain +34 93 490 01 74
Sweden +46 31 75 44 000 Switzerland +41 44 922 89 22 UK +44 118 9300 300 USA +1 919 361 5200 Other countries +41 44 922 8125

Tecan Group Ltd.では本文書において正確かつ最新の情報をご提供するよう最善の努力を尽くしておりますが、誤謬や脱漏が生じる可能性があります。したがって、Tecan Group Ltd.では明示的または暗示的にかかわらず、本文書における情報の正確性または完全性につき、何らの表明または保証を行うものではありません。また、本文書は予告なく変更する場合があります。記載された商標はすべて法律によって保護されています。本文書に記載された仕様書の技術的詳細および詳しい手順については、テカンの担当者までご連絡ください。本文書で取り上げたアプリケーションおよび製品は一部の市場で入手困難な場合がありますので、営業担当者にお問い合わせください。

Tecan, Infinite は主要諸国における Tecan Group Ltd. (スイス、Männedorf) の登録商標です。HydroSpeed, Magellan, AntiClogging は同商標です。NUNC は Nalge Nunc International の登録商標で、MaxiSorp は同商標です。

©2010 Tecan Trading スイス、著作権所有

www.tecan.com

ハイドロスピードプレートウォッシャーは卓越した洗浄性能を提供し、本試験で使用した未希釈の血清プローブ等、危険なサンプルが処理可能になる。

また、これは 96 ウェルプレート を 20 秒以内で超高速測定する 8 チャンネル光学系を備えたインフィニット F50 のコンセプトに合致する。

参考文献

(1) www.biorad.com

略語一覧

HBs Ag	B型肝炎ウイルス表面抗原
NC	陰性対照
Neg	患者の陰性サンプル
PC	陽性対照
Pos	患者の陽性サンプル
TMB	テトラメチルベンジジン
OD	吸光度
HT	高速処理

謝辞

これらの実験にご協力いただいた Tobias Kiesslich 博士と Josef Lang 氏 (オーストリアのザルツブルグ、パラケルスス医科大学 SALK 第一内科) に心より感謝いたします。

2010年12月(オーストリア、Groedig)