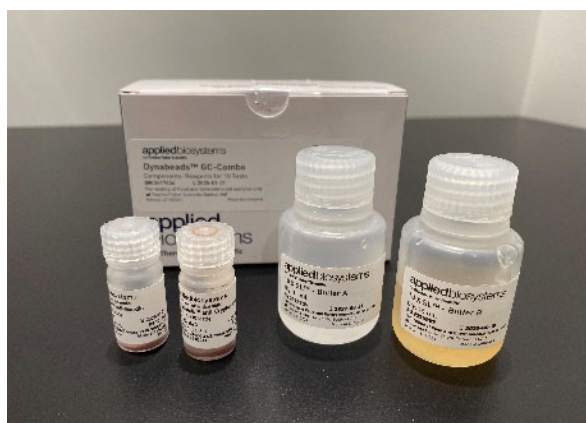


Dynabeads anti-Cryptosporidium および Dynabeads GC-Combo ユーザーマニュアル



Dynabeads GC-Combo (DB73002)

対象製品

コード No.	品名	梱包単位	保存温度
DB73001	Dynabeads anti-Cryptosporidium	10 tests	冷蔵 (2-8°C)
DB73011	Dynabeads anti-Cryptosporidium	50 tests	冷蔵 (2-8°C)
DB73002	Dynabeads GC-Combo	10 tests	冷蔵 (2-8°C)
DB73012	Dynabeads GC-Combo	50 tests	冷蔵 (2-8°C)

概要

クリプトスポリジウム(Cryptosporidium)およびジアルジア(Giardia)は脊椎動物の消化管などに寄生する原生生物で、ヒトに感染するとクリプトスポリジウム症およびジアルジア症を引き起こします。

Dynabeads™ anti-Cryptosporidium は、濃縮サンプル水から免疫磁気分離(IMS)法によりクリプトスポリジウムのオーシスト(oocyst)を迅速かつ選択的に分離できます。同様に、Dynabeads GC-Combo は、濃縮サンプル水からクリプトスポリジウムのオーシスト、およびジアルジアのシスト(cyst)を分離できます。これらの製品には、抗クリプトスポリジウム抗体あるいは抗ジアルジア抗体を表面に結合した直径 4.5 μm の免疫磁気ビーズが含まれています。

操作の流れとしては、磁気ビーズと 2 種類のバッファーをサンプル水へ加え、室温でインキュベートすることにより、ビーズ表面にコートされた抗体にオーシストまたはシストを捕捉します。次に、磁石を用いてビーズ+オーシスト(またはシスト)複合体を分離・洗浄します。最後に、希塩酸を用いてオーシスト(またはシスト)をビーズから完全に剥がし、中和後に顕微鏡観察します。

特長

厚生労働省が定める「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」中のオーシスト等の分離・精製方

法として、「免疫磁気ビーズ法」を用いる際に使用できます。濃縮したサンプル水 10 mL から、クリプトスポリジウムのオーシスト、またはジアルジアのシストを分離します。上水道用のどのような処理水または未処理水(環境水)から濃縮したサンプル水にも使用できます。密度勾配遠沈法(浮遊法)を用いて分離・精製する場合と比べて、以下のような利点があります。

- より高純度な分離が可能
- 夾雑物が少なく、顕微鏡観察が容易 (約半分の時間で観察可能)
- 実験者間のバラつきが少ない
- 回収率が 10%程度上がる

キット構成

Dynabeads anti-Cryptosporidium

- Dynabeads anti-Cryptosporidium *
- 10X SL-Buffer A (10 倍濃縮、無色透明溶液)
- 10X SL-Buffer B (10 倍濃縮、黄色溶液)

Dynabeads GC-Combo

- Dynabeads anti-Cryptosporidium *
- Dynabeads anti-Giardia *
- 10X SL-Buffer A (10 倍濃縮、無色透明溶液)
- 10X SL-Buffer B (10 倍濃縮、黄色溶液)

* 抗体結合ビーズが 0.1% BSA/0.02% NaN₃/PBS, pH7.4 に懸濁されています。

使用方法

A サンプル調製

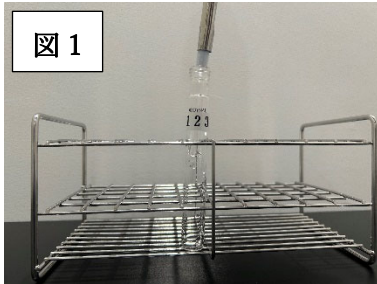
1. サンプルは標準のろ過および遠心分離法で濃縮後、最終的に IMS 法(免疫磁気ビーズ法)に必要な 10 mL を用意します。
2. サンプルが室温以下で保存されていた場合は、室温と同一になるまで放置してください。
3. サンプルが溶出液、界面活性剤、防腐剤を含んだ液に懸濁されている場合は、必ず水に再懸濁してください。

B 試薬調製

1. 1 テスト(サンプル 10 mL)あたり、1X SLTM-Buffer A、10X SL-Buffer A、および 10X SL-Buffer B

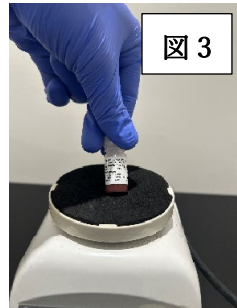
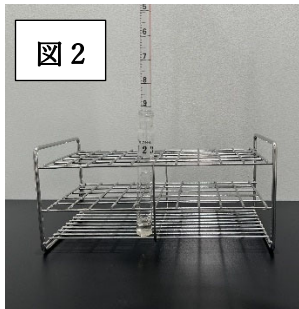
を、各 1 mL 使用します。

2. 1X SL-Buffer A を調製するには、10X SL-Buffer A(無色透明溶液)を、オーシスト・シストを含まないイオン交換水で希釈します (例えば、100 μ L の 10X SL-Buffer A にイオン交換水を加えて 1 mL にします)。調製した 1X SL-Buffer A は、後のステップ(C-10)で使用します。
3. 1 mL の 10X SL-Buffer A を試験管(ϕ 16 \times 125 mm で片側が平らな Dynabeads L10 Tubes など)へ入れます(図 1)。
4. 同じ試験管に、さらに 1 mL の 10X SL-Buffer B (黄色溶液)を加えます(図 1)。



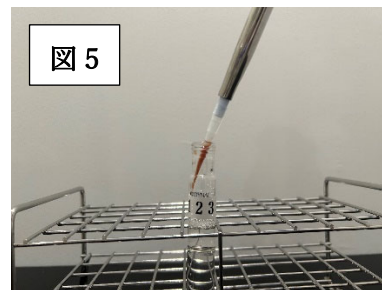
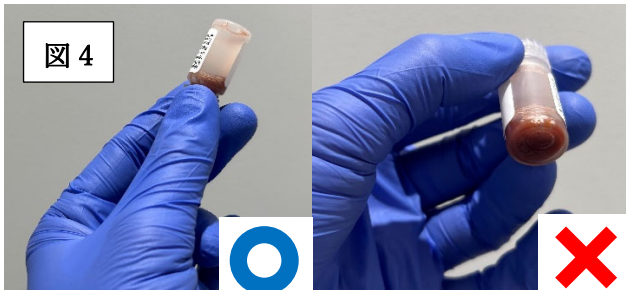
C オーシストまたはシストの捕捉

1. 10 mL のサンプルを、10X SL-Buffer A と 10X SL-Buffer B の入った試験管へ加えます(図 2)。試験管には識別ラベルを付けてください。
2. Dynabeads をボルテックスで 10 秒間攪拌します(図 3)。



3. Dynabeads のチューブを逆さにし、ビーズが完全に懸濁されてチューブの底にペレットが溜まっていないことを確認します(図 4)。均一にしたビーズ 100 μ L を、サンプルと SL-Buffer の入った試験管へ加えます(図 5)。

※ サンプル水からクリプトスポリジウムのオーシストと、ジアルジアのシストを同時に濃縮したい場合は、GC-Combo のビーズ 2 種を 100 μ L ずつ一緒に加えます。

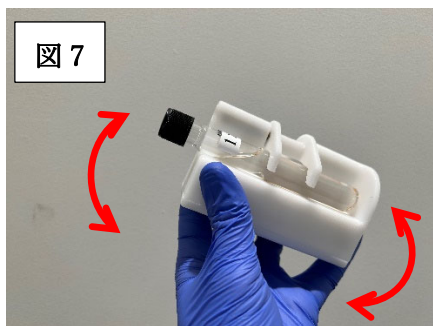


4. ビーズを加えた試験管を回転ミキサー(HulaMixer™ Sample Mixer など)に取り付け、室温で1時間、15-20 rpm でビーズを混和します(図6)。



5. 1時間の混和後、試験管をミキサーから外し、Dynabeads 専用磁石(MPC™-1)に取り付けます。この時、試験管の平らな面が磁石へ向くようにしてください。
6. 試験管を MPC-1 に取り付けたまま、磁石面を上にして試験管を水平にします。
7. 試験管を 90° の角度に起こしては寝かせます。この動作を 1 秒間に 1 回起こす速度で繰り返し、2 分間続けます(図7)。

※ この操作は、低質量の磁性物質または磁化する物質が磁石へ付着することを防ぎます。もし MPC-1 に取り付けたサンプルを 10 秒以上動かさず放置した場合は、次のステップに進む前に、試験管を MPC-1 から取り外してビーズを緩やかに混和し、再度この操作を繰り返してください。



8. 試験管のキャップが上になるように MPC-1 を垂直に立てます。直ちにキャップを外し、試験管から上清すべてを適当な容器に移します(図8)。この時、試験管を振ったり MPC-1 から外したりしないようご注意ください。

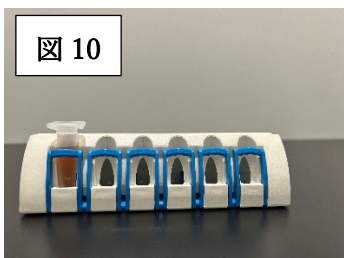


9. 試験管を MPC-1 から外し、1 mL の 1X SL-Buffer A を加えて、内容物を緩やかに混和し再懸濁します(図 9)。

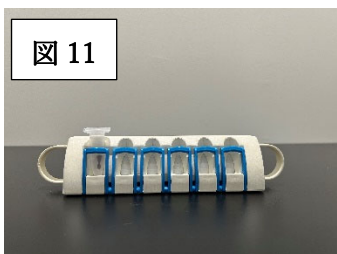
※ この時ボルテックスは絶対に使用しないでください(図 9)。



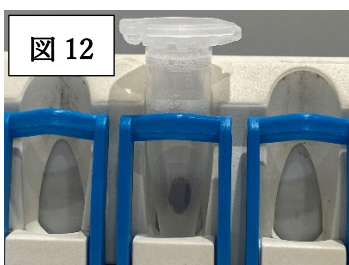
10. 試験管内の液全量を、識別ラベルを付けた 1.5 mL マイクロ遠心管に移します。この時、Dynabeads 専用磁石(MPC -S)から磁石板を取り外した架台を、遠心管立てとしてご使用ください(図 10)。



11. MPC -S に磁石板を取り付けます(図 11)。



12. マイクロ遠心管を MPC -S に取り付けたまま、緩やかに 180° 傾けます。この動作を 1 秒間に 1 回の速度で 1 分間続けます。完了時には、ビーズ+オーシスト(またはシスト)複合体はマイクロ遠心管の背面に明確な点として見えます(図 12)。



- 直ちに、MPC-Sに取り付けられているマイクロ遠心管から上清を吸引除去します。複数のサンプルを同時に進めている場合は、各マイクロ遠心管から上清を吸引する前に 180° 傾ける動作を 3 回行ってください。

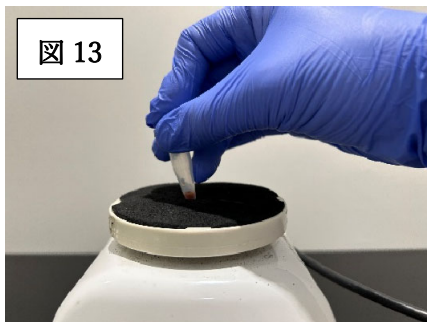
この時、マイクロ遠心管の磁石側内壁の付着物にピペットで触れないようにしてください。また、操作中に遠心管を振動させたり MPC-S から外したりしないでください。

※ 上清の除去には、手動のピペット操作をお奨めします。水流ポンプで吸引するとビーズが一緒に吸われてしまう事があります。

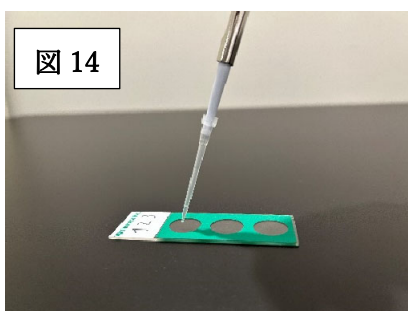
D ビーズ+オーシスト(またはシスト)複合体の解離 ー検鏡・計数測定ー

【生育活性測定は、セクション F へ進んでください】

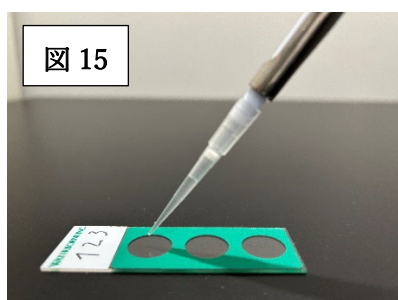
- MPC-S の後部から磁石板を取り外します。
- マイクロ遠心管に 50 μ L の 0.1N 塩酸を加え、10 秒間ボルテックスします(図 13)。



- 遠心管を MPC-S 架台に取り付け、室温で少なくとも 10 分間垂直に静置します。
- さらに 10 秒間ボルテックスします。
- サンプルがすべて遠心管の底にあることを確かめてから、遠心管を MPC-S に取り付けます。
- MPC-S に磁石板を取り付け、10 秒間静置します。
- スクリーニング用に識別ラベルを付けたウェルスライドを用意し、ウェルに 5 μ L の 1N 水酸化ナトリウムを入れます(図 14)。



8. 遠心管内のビーズに触れないように注意して、遠心管から液全量を、すでに 1N 水酸化ナトリウムを入れてあるスライドのウェルに移します(図 15)。



9. スライド上の試料を風乾します(50°C、1 時間ほどの乾燥でも可)。

E 蛍光染色 ー検鏡・計数測定ー

蛍光染色／検出は、各ラボの既法に準じて行うことができますが、Dynabeads 使用時には以下の方法を推奨します。

※ スライドでの、間接蛍光抗体の使用は好ましくありません。また、1:10,000 以上の高濃度エヴァンスブルー(対比染色剤)の入ったモノクローナル抗体の使用もお奨めできません。

1. スライドの各ウェルにメタノールを 1 滴(50 μ L)加え、室温で風乾します。
2. 各ウェルへ適当に希釈した 50 μ L のフルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識モノクローナル抗体を加えます。各ウェルを確実に覆いつくすようにしてください。
3. スライドを保湿チャンバーに入れ、37°Cで 30 分間インキュベートします。
4. 各ウェルからモノクローナル抗体を静かに吸引除去します。
5. 各ウェルに 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)の PBS 溶液(0.4 μ g DAPI/mL)を 1 滴(50 μ L)加え、5 分間置きます。
6. 各ウェルから DAPI 溶液を静かに吸引除去します。
7. 各ウェルに残っている PBS と DAPI を除くために、イオン交換水を 1 滴(50 μ L)加え、1-3 秒間置きます。
8. 各ウェルから静かに水を吸引除去します。
9. 蛍光顕微鏡でスクリーニングする直前に、各ウェルに DABCO/glycerol 固定化液(10 μ L)を自然落下させて、カバースリップを押し付けないようにかぶせます。この時、ピペットチップの先がスライドに接触しないようにしてください。

F ビーズ+オーシスト(またはシスト)複合体の解離 ー生育活性測定ー

【検鏡・計数測定ではありません】

1. MPC -S から磁石板を取り外します。
2. マイクロ遠心管に、1 mL の酸性 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)を加えます。HBSS は、使用前に塩酸で pH2.75 に調整しておきます。
3. 遠心管を MPC -S 架台に取り付けたまま、37°Cで 1 時間インキュベートします。
4. 遠心管を 5 秒間ボルテックスします。
5. 磁石板を取り付けた MPC -S に、遠心管を取り付けて 10 秒間静置します。
6. 液全量を、識別ラベルを付けた新しいマイクロ遠心管に移します。ピペットチップはサンプル毎に取り替えてください。
7. オーシストまたはシストをマイクロ遠心分離(11,000-13,000×g、30 秒間)してペレットにします。
8. オーシストまたはシストを次のように 2 回洗浄します。ペレットに HBSS を加えて懸濁し、遠心分離(11,000-13,000×g、30 秒間)した後、上清を除去します。2 回洗浄したペレットを HBSS に再懸濁します。
9. DAPI および PI の染色を経て、生育活性測定の検鏡をします。

感度

この使用方法により、Dynabeads anti-Cryptosporidium は、ペレット量 5%以下のサンプル 10 mL から単一のクリプトスポリジウムのオーシストを分離することができます。

従来の密度勾配遠沈法(浮遊法)は浮上性密度によって分離しますが、Dynabeads anti-Cryptosporidium は特異的にクリプトスポリジウムのオーシストを単離します。そのため感度が向上し、そのバックグラウンドが鮮明になり検出率が改善されます。一般に感度は、検出方法およびその前処理方法によっても左右されます。Dynabeads anti-Cryptosporidium には、ある程度の非特異結合が見られますが、SL-Buffer の使用により抑えることができます。この使用方法ではビーズ性能、特にオーシスト捕捉能力に何ら影響はありません。

(上記は、Dynabeads GC-Combo によるジアルジアのシスト捕捉についても同様です。)

精度、回収率

この方法による精度は、接種実験により確認されています。

オーシストまたはシストの回収率は、濃縮サンプル中のオーシストまたはシストの数に影響されますが、60-95%です。サンプル試験の際、陽性コントロールも併せて実験し、回収率を検定することをお奨めします。

使用器具・装置および試薬

- 原水(環境水)からのサンプル準備に必要なフィルター、遠心分離器など
- ボルテックスミキサー
- レイトンチューブ(Dynabeads L10 Tubes, DB74003 など)
- 試験管、ガラス器、ピペットおよびマイクロ遠心管
- マイクロピペット(10-100 μ L)
- 回転ミキサー(Thermo Fisher Scientific 社製 HulaMixer Sample Mixer, 15920D など)
- Dynabeads™専用磁石(MPC-1, DB12001 および MPC™ -S, DBA13346)
- 1 mL 分注用ピペット
- マルチスポットスライド(ϕ 9-15 mm ウェルのスライド)およびカバースリップ
- 保湿チャンバー
- インキュベーター($37 \pm 1^\circ\text{C}$)
- マイクロ遠心分離器
- 蛍光顕微鏡
- 陽性/陰性コントロールスライド
- イオン交換水(オーシスト・シスト不含)
- 塩酸(規定標準品)
- 水酸化ナトリウム溶液(規定標準品)
- メタノール
- フルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識された抗クリプトスポリジウム オーシスト抗体あるいは抗ジアルジア シスト抗体(WATERBORNE 社製 Aqua-Glo G/C Direct FL など)
- リン酸緩衝液(PBS)
- 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)
- DABCO/glycerol 固定化液
- Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)

※ 試薬はすべて分析用グレードをご使用ください。

注意事項

- Dynabeads のビーズは使用前に再懸濁し、均一な懸濁状態にしてください。
- SL-Buffer A,B は使用前に振ってください。
- ラテックス手袋、ラボ用白衣を着用して実験してください。
- ピペットを直接口で吸わないでください。
- 本製品は、保存剤としてアジ化ナトリウムを 0.02%含んでいます。アジ化ナトリウムは配管中の鉛

や銅に反応して爆発性の金属アジドを生成します。廃棄する際は、金属アジドが生成されないように多量の水で流してください。

- 本製品は研究用です。ヒトの診断および治療用には使用できません。

株式会社ベリタス

〒105-0013 東京都港区浜松町 1-18-16 住友浜松町ビル 6階

TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076

技術的なお問い合わせは：TEL 03-5776-0040 E-mail Tech_support@veritastk.co.jp