

Bio-Plex Pro SARS-CoV-2 Serology Assay クイックガイド

Bio-Plex Pro Human IgG SARS-CoV-2 4-Plex Panel
 Bio-Plex Pro Human IgA SARS-CoV-2 4-Plex Panel
 Bio-Plex Pro Human IgM SARS-CoV-2 4-Plex Panel

本資料は Bio-Plex Pro SARS-CoV-2 Serology Assay の簡易取り扱い手順を示しています。ご使用前に必ずプロトコルの詳細および注意点について、英文 Instruction Manual(下記リンク)をご参照ください。
<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000133853.pdf>

Bio-Plex サイトカインアッセイキットなどの相違点

- サンプルの MFI (FI)と Product Data Sheet 記載の Cutoff 値から陽性/陰性を判定します。
- Quality Control (Negative および Positive)が付属しています。いずれも液体で希釈せずに使用します。
- Standard は付属していません。オプションとして VIROTROL SARS-CoV-2 Control (#200300A)を用いて、抗体(IgG)濃度(U/ml)を数値化するプロトコルを別途資料(Bulletin 7459)としてご用意しています。
https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_7459.pdf
- サンプルとして、ヒト血清およびヒト血漿で確認済みです。
 参考) SARS-CoV-2 ウイルスは 15 分から 60 分の熱処理 60°C で不活化します。
- 血清・血漿は、キット付属の Human serology sample diluent で 100 倍希釈してアッセイに供します。
 例) サンプル 2 uL + 198 uL Sample Diluent
- Bio-Plex サポートウェブサイト (<http://pdbu-support.bio-rad.co.jp/bio-plex.html>) から、各ソフトウェア(Bio-Plex Manager, xPONENT)用のプロトコルファイルがダウンロードできます。

準備

1. プレートのレイアウトを確認してください。
2. Bio-Plex システム*の Startup/Warm up 処理をしてください。この間に、バッファー類を室温に戻しておきます。また、凍結しておいたサンプルを氷上で溶かします。
 *: Bio-Plex 100/200 システム, Bio-Plex 3D システム, Luminex 200 システム, MAGPIX システム
3. **Wash Buffer の準備** 10 x のストックが室温に戻り、結晶が溶けずに残っていないことを確認し、ボトルを転倒混和して均一な状態にしてください。10x ストックを1容量に対して、dH₂O を9容量と混ぜて調製してください。その後、Wash Station など洗浄装置の準備をしてください。
4. Bio-Plex システムの Calibration を行ってください。
5. 血清・血漿サンプルはあらかじめ遠心処理により不溶物を除去しておきます。下表に従って希釈してください。Tips)アッセイ用とは別のプレートにサンプルを配置しておき、後のステップ(次項 3)において、マルチチャンネルピペットを用いて速やかにアッセイ用プレートに移すことをお勧めします

サンプルの種類	希釈液	希釈率
血清・血漿	Serology Sample diluent	100 倍

6. 抗原ビーズを 30 秒間ボルテックスし、Bio-Plex Assay Buffer で 1x 濃度に希釈します。その後遮光しておいてください。

	測定ウェル数	20x Beads (uL)	Assay Buffer (uL)	Total Volume (uL)
<input type="checkbox"/>	96	285	5415	5700
<input type="checkbox"/>	W =	W x 3 =	W x 57 =	W x 60 =

注意) Singleplex set をお使いの場合は、上記ビーズ量は 1 本当たりの量です。混合する本数に応じて、Assay Buffer の量を減らして、Total Volume が同じになるようにしてください。

Assay の実施

すべての試薬類が室温になっていることをご確認ください。

1. 抗原ビーズ (1x) をボルテックスしたのち、アッセイプレートの各ウェルに 50 uL ずつ加えます。
2. アッセイプレートの各ウェルを 100 uL の Wash buffer で、2 回洗浄します。
3. サンプル、Quality Control (Negative および Positive)、ブランク(Sample diluent)を各ウェルに 50 uL ずつ加えます。

(続く)

- プレートシールをして遮光して **30 分間室温にて**シェーカー上でインキュベートします。シェーカーは、液がはねないように徐々に回転数を上げ、850±50 回転にセットします。
- インキュベーションの残り時間が 10 分程度のとき、検出抗体のバイアルを 5 秒ほどボルテックスしたのち、軽くスピンドアウンします。次表に従い、1x に調製してください。

	測定ウェル数	20x Detection Antibody (ul)	Detection Antibody Diluent HB (ul)	Total Volume (uL)
<input type="checkbox"/>	96	150	2850	3000
<input type="checkbox"/>	W =	W x 3 =	W x 27 =	W x 30 =

注意) Singleplex set をお使いの場合は、上記抗体量は 1 本当たりの量です。混合する本数に応じて、Antibody Diluent の量を減らして、Total Volume が同じになるようにしてください。

- アッセイプレートの各ウェルを 100 uL の Wash buffer で 3 回洗浄します。
- 検出抗体(x1) をボルテックスした後、各ウェルに 25 uL ずつ加えます。
- プレートシールをして遮光して、**30 分間室温にて** 850±50 回転でインキュベートします。
- インキュベーションの残り時間が 10 分程度のとき、SA-PE のバイアルを 5 秒ほどボルテックスしたのち、軽くスピンドアウンします。下表に従い、1x に調製し、遮光しておいてください。

	測定ウェル数	100x SA-PE (ul)	Assay Buffer (ul)	Total Volume (uL)
<input type="checkbox"/>	96	60	5940	6000
<input type="checkbox"/>	W =	W x 0.625 =	W x 61.875 =	W x 62.5 =

- アッセイプレートの各ウェルを 100 uL の Wash buffer で 3 回洗浄します。
- SA-PE(x1) をボルテックスした後、各ウェルに 50 uL ずつ加えます。
- プレートシールをして遮光して、**10 分間室温にて** 850±50 回転でインキュベートします。
- アッセイプレートの各ウェルを 100 uL の Wash buffer で 3 回洗浄します。
- 各ウェルに 125uL の Assay Buffer を加えて、プレートシールをしてから、遮光して 30 秒間シェイクします(850±50 回転)。
- 遮光シールを剥がしてから、下記の設定でアッセイプレートを読み取ります。プロトコルの設定方法について、詳しくはソフトウェアマニュアルをご覧ください。

Instrument	ビーズ設定	Analysis Setting	PMT
Bio-Plex 200	Assay: Magnetic	-	Standard
Bio-Plex 3D	Bead Type; MagPlex	None	Standard
FlexMAP3D	Bead Type; MagPlex	None	Standard
Luminex 200	Bead Type; MagPlex	None	Standard
MAGPIX	-	None	-

Analyte	Bead Region	Bead Event
Nucleocapsid (N)	20	50
Receptor binding domain (RBD)	36	50
Spike 1 (S1)	28	50
Spike 2 (S2)	42	50

お問い合わせ先(バイオ・ラッド テックコール);

電話: 03-6404-0331 メール: life_ps_jp@bio-rad.com