

牛海綿状脳症診断用ウエスタンブロット反応キット

プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロット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 小分製品の試験

1.1 特異性試験及び力価試験

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 指示陰性検体及び指示陽性検体の作成

非感染牛延髄の適量を正確に秤量し、これに10倍量のホモジナイズ用緩衝液を加えてホモジナイズする。このホモジナイズしたものを100 µLに消化用緩衝液10 µLを加え、更にプロテイナーゼK 10 µLを加えてよく混合し、48 °Cで40分間反応させ、その後消化停止液10 µLを加えたものを指示陰性検体とする。また、このホモジナイズしたものを100 µLに消化用緩衝液10 µLを加えてよく混合し、48 °Cで40分間反応させた後、消化停止液10 µLを加えたものを指示陽性検体とする。

1.1.2.2 電気泳動

指示陰性検体及び指示陽性検体にPAGE試料緩衝液をそれぞれ100 µLずつ加え、よく混合し、96 °Cで5分間加熱する。

電気泳動槽にゲル板を装着し、左端のレーンにあらかじめ65 °Cで2分間加熱処理したコントロール試料10 µLを注入する。次に隣接する2レーンに指示陰性検体をそれぞれ10 µLずつ注入する。更に隣接する2レーンにPAGE試料緩衝液で10倍希釈した指示陽性検体をそれぞれ10 µLずつ注入する。

電圧をかけ、泳動のフロントラインがゲルの底面から約1～2 cmのところに来るまで通電する。

1.1.2.3 プロットティング

前処理したプロットティング用膜にゲルをのせ、プロットティング用緩衝液（付記2）を満たしたプロットティング装置を用いて冷却しながらゲル上の蛋白を膜上に転写させる。プロットティング用膜とゲルを離し、プロットティング用膜を染色液（付記3）で染色し、コントロール試料のレーンに所定の分子量マーカーが観察されることを確認し、その後TBST液（付記4）で脱色する。

1.1.2.4 抗原抗体反応

ブロッキング用緩衝液50 mLにブロッキング用膜を浸し、常温で30分間振とう処理する。

TBST液50 mLに第一抗体液（マウス抗プリオン蛋白モノクローナル抗体液）10 µLを加え、そこにプロットティング用膜を浸して振とうさせ、常温で1時間反応させる。その後、プロットティング用膜をTBST液で1回あたり5分間、3回洗浄する。

TBST液50 mLに第二抗体液（酵素標識ヤギ抗マウスIgG抗体液）10 µLを加え、そこにプロットティング用膜を浸し振とうさせ、常温で30分間反応させる。その後、プロットティング用膜TBST液で1回あたり5分間、5回洗浄する。

1.1.2.5 露光

ルミネッセンス緩衝液50 mLにプロットティング用膜を5分間浸した後、余分なルミネッセンス緩衝液を除く。ルミネッセンス緩衝液で希釈した化学発光基質液（付記5）をプロットティング用膜上に均一に拡げ、常温で5分間処理する。余剰の水分を取り除き、直ちに膜をラップで覆う。

暗室においてプロットティング用膜をX線フィルム又は簡易現像型フィルムに適切な時間露光させ、フィルムを現像するか、又は画像検出装置を用いてバンドを検出する。

1.1.3 判定

コントロール試料及び指示陽性検体では、全てのレーンで25～35 kDaのバンドが観察されなけ

ればならない。また、指示陰性検体では、全てのレーンでバンドが観察されてはならない。ただし、31kDa のバンドが観察されることがあるが、これはプロティナーゼKによるものなので無視する。

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 プロットティング用緩衝液

1,000mL 中

トリスベース 30.28 g

グリシン 144.13 g

水 残 量

使用時に、本品 200mL を水で 1,800mL まで希釈し、これに 200mL のメタノール (100%) を加える。

付記 3 染色液

0.5w/v% ポンソー S を 5vol% 酢酸に溶解したものを TBST 液で 20 倍希釈したもの

付記 4 TBST 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8 g

塩化カリウム 0.2 g

トリスベース 3 g

ポリソルベート 20 0.5 mL

水 残 量

塩酸で pH を 7.4 に調整する。

付記 5 化学発光基質液

0.0125mol/L 化学発光用アルカリ・ホスファターゼ・サブストレーートをルミネッセンス緩衝液で 50 倍希釈したもの