

検定後の ELISA 用マイクロプレートの洗浄法について

長尾 記明・西尾 健

横浜植物防疫所

A Simple Cleaning Method for Re-use of ELISA Microplates. Noriaki NAGAO and Takeshi NISHIO (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 19: 105-107 (1983).
Abstract: Microplates used in ELISA of satsuma dwarf virus can be easily cleaned for reuse by soaking for 1 to 2 days in detergent solution of Diposh (30 g/l, Kankyo Kagaku Center Co.) or Cica-Clean MI (20g/l, Kanto Chemical Co.). Dynatech Immulon plates 96 K cleaned with these solutions for ELISA had higher positive absorbancy values than did new ones.

はじめに

酵素結合抗体法 (ELISA) は植物ウイルスの検出に極めて優れた技法であることが VOLLER ら (1976), CLARK and ADAMS (1977) により実証されて以来, 果樹, 作物, 野菜などの数多くのウイルス病の診断あるいはウイルスの定量に応用されてきた。

近年, 我国の母樹検疫, 隔離検疫におけるウイルス病の診断にも ELISA が取り入れられ, 今後益々種々のウイルス病検査に本法が適用されていくものと思われる。

ELISA 用マイクロプレートの検定後の洗浄は, 一般にクロム酸混液に一定時間浸漬後超音波などで良く水洗する方法がとられている。しかしクロム酸混液の排液は水質汚濁防止法により特殊処理が必要であり, これに代る無害でより処理の容易な洗浄法を検討する目的で本試験を行なった。報告にあたり, ウイルス株を分譲下さった植物ウイルス研究所の宇杉富雄氏に心よりお礼申し上げます。

材料および方法

1. 供試ウイルス

宇杉氏より分譲を受けた Satsuma dwarf virus (SDV) を供試した。SDV の純化は罹病 *Physalis floridana* の凍結組織を材料とし, 宇杉・斎藤 (1977) の方法のうち, 硫酸塩析を PEG (8%), 0.2M NaCl による処理とした一部改変法により実施した。

2. 酵素結合抗体法

SDV 抗血清は, 純化 SDV を家兔に筋肉注射 4 回, 静脈注射 1 回を実施し得たもので, 力価は 1024~2048 倍である。抗血清からの γ -グロブリンの純化は硫酸塩析

法によった。アルカリ性リン酸分解酵素と γ -グロブリンの混合比は 2.5: 1 (重量比) とし, これの結合法と以後の ELISA 検定手順はすべて CLARK and ADAMS (1977) によった。酵素結合 γ -グロブリン溶液は, トリス緩衝液 (pH 7.6) で十分に透析後, 酵素濃度が 1mg/ml となるように調整し原液として 4°C にて保存した。コーティング γ -グロブリン溶液は 2.5 μ g/ml 液, 酵素結合 γ -グロブリン溶液は原液の 800 倍希釈液を用いた。1 試料当りマイクロプレートの 2 穴を用い, 最終反応液に 2.5ml の水を加えて 405nm の吸光度を, 光路長 10mm のセルを用いて測定し, ELISA 値とした。

3. ミクロプレートの洗浄法

マイクロタイタープレート 96K, F 型 (ダイナテック社) およびディスポ U プレート (三光純薬) を供試した。

SDV 検定後のマイクロプレートは, 実験室用ガラス器具洗浄剤ディポッシュ (環境科学センター): 30g/l, シカクリン MI (関東化学): 20g/l と家庭用洗剤のチェリーナ (花王石けん): 3ml/l, ママレモン (ライオン): 4.5ml/l の各種溶液に 1~2 日間浸漬し, 水道水で約 10 回水洗後最後に蒸留水ですすぎ風乾した。

結果および考察

SDV の純化液 (濃度 OD₂₆₀=4.5 の 1000 倍液) を原液として PBS-Tween (0.02M リン酸緩衝液, pH 7.4+0.15MNaCl+0.05% Tween 20) で 2 倍希釈し, 各希釈液を等量の健全カンキツ葉汁液に加えて ELISA 検定用試料とした。葉汁液は健全カンキツ葉 (藤中温州) の生重当り 10 倍量の緩衝液 (PBS-Tween+2% ポリビニールピロリドン+0.05% チオグリコール酸) を加えてすり

鉢で磨碎し、低速で遠心して調製した。

マイクロタイタープレートを用いた場合は、ディポッシュまたはシカクリーン MI で洗浄したプレートは新プレートより発色が良く、ELISA 値は高くなった。非特異発色は見られなかった。両洗剤の洗浄効果には大きな差異は認められなかった。

検定・洗浄を4回くり返した時の結果を Fig. 1 に示した。

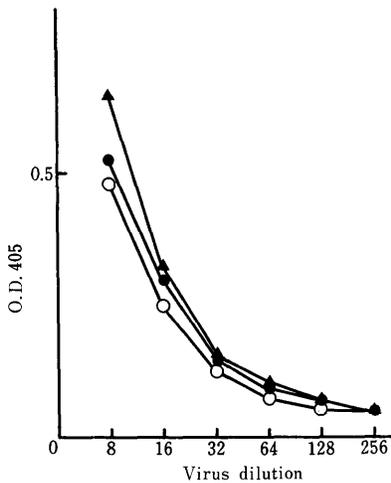


Fig. 1 A comparison of the ELISA values of cleaned and new Dynatech Immulon plates 96 K.

Purified satsuma dwarf virus (\therefore 0.5 mg/ml) was diluted in PBS-Tween, then added same volume of healthy leaf sap of *Citrus* sp.

Microplates were; cleaned with Cica-Clean M1 (▲) and DipoSch (●); new (○).

新プレートでは32倍希釈、洗浄プレートでは64倍希釈まで発色し、高濃度区においても洗浄プレートのELISA値が常に高かった。くり返し洗浄によるプレートの損傷はほとんど認められず、反復実験においても同様の安定した結果が得られた。したがってELISA検定後のプレートはディポッシュまたはシカクリーン MI の浸漬、水洗により、再使用しても全く支障がないことが明らかとなった。

家庭用洗剤のマレモンあるいはチェリーナの洗浄では抗体の洗い出しが不完全で、健全葉でも発色することがあった。

ディスポUプレートを用いて同様に洗浄効果を調べた

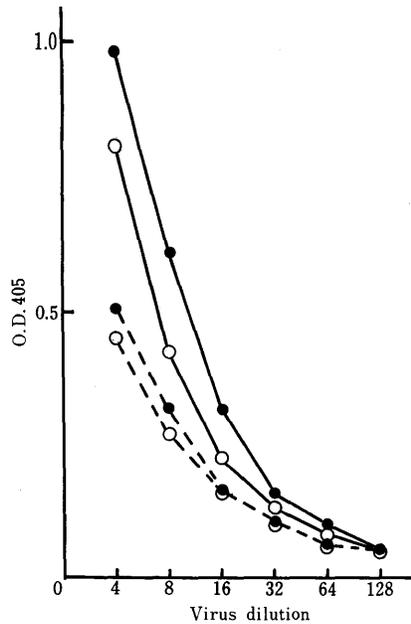


Fig. 2 A comparison of the ELISA values of cleaned and new Dispo-U-plates 220-24K (Sankojunyaku Co., Ltd.) Virus solution were same as Fig. 1. Microplates were; cleaned with Cica-Clean M1 (1st Expt. ●-) and DipoSch (2nd Expt. ○-); new (1st Expt. ●- and 2nd Expt. ○-).

結果を Fig. 2 に示した。

ディポッシュ (Expt. 2) またはシカクリーン (Expt. 1) で洗浄したプレートは新プレートの発色より極端に悪くなり、SDV 高濃度区で ELISA 値が約1/2に低下した。しかし非特異発色は認められず、2回目以後の洗浄プレートの ELISA 値は1回洗浄のそれと変らなかった。

したがって蛋白質などの吸着を良くし、発色を高めるよう特殊処理されたプレートあるいは材質によっては、ディポッシュ、シカクリーンなどの洗浄によって発色が悪くなることもあるので、プレートの再使用に当っては予備試験を行って、発色の良否をチェックする必要があると思われる。

太田 (1982) はマイクロプレートの種類や製造番号によっては検定に支障をきたすものがあり、このようなプレートはカナダバルサムあるいは塩化ビニルフィルムを石油エーテルに溶解し、スプレーすると検定可能となり、再使用する場合は同様に処理後洗剤による洗浄を行うと良いとしている。本実験に供試したプレートは安定した発色を示し、製品間のバラツキは認められなかった。

PETERSEN (1981) は数種のウイルスを用いてマイクロプレートの洗浄法を検討してエチルアルコールの飽和硫酸化ナトリウム溶液に一夜浸漬して水洗する方法を推奨している。この洗浄処理により OD₄₀₅ 値が高くなるとしているが、この所見は我々がマイクロタイタープレートで得られた結果と一致している。

二重抗体法におけるコーティング γ -グロブリンを洗い流す方法とは異なって BAR-JOSEPH ら (1979) は、カンキツトリステザウイルス、カーネーションモットルウイルスを 0.2M glycine-HCl, pH 2.2 の液に 60 分浸漬することによって、コーティング γ -グロブリンから分離させ、洗浄する方法を報告している。しかしこの方法では pH によって、またウイルスの種類により洗浄できないことがあり一般的ではない。

このようにプレートの再使用にあたって種々の洗浄法が工夫されているが、本実験で得られた方法は非常に簡単であり、コーティング γ -グロブリンを洗い流すので、他のウイルスの検定のプレートにも適用できると思われる。

引用文献

- BAR-JOSEPH, M., MOSCOVITZ, M. and SHARAFI, M. (1979) Reuse of coated enzyme-linked immunosorbent assay plates. *Phytopathology* **69**: 424-426.
- CLARK, M.F., and ADAMS, A.N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* **34**: 475-483.
- 太田孝彦 (1982) ELISA 用マイクロプレートの有機溶媒による前処理とカンキツモザイクウイルス (CiMV) 検出の安定性. *日植病報* **48**: 88 (講要)
- PETERSEN, A.C., Jr. and BANTARI, E.E. (1981) A simple cleaning technique for re-use of cassettes for enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* **71**: 899 (Abstract).
- VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D.E., CLARK, M.F. and ADAMS, A.N. (1976) The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. gen. Virol.* **33**: 165-167.