

ダイナビーズアンチクリプトスポリディウム/ダイナビーズGC-コンボの使用法

A サンプル調製

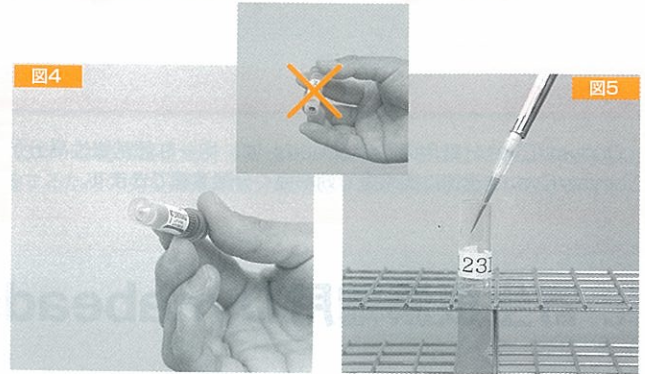
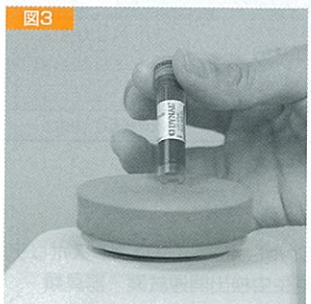
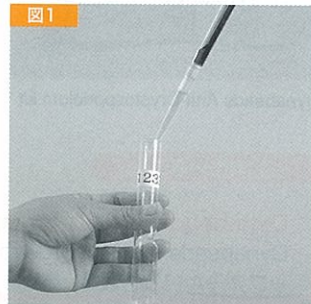
1. サンプルは、標準フィルター・遠心分離法により濃縮後、最終的にIMS法（免疫磁気ビーズ法）に必要な10mLを用意します。
2. サンプルが室温以下で貯蔵されていた場合は、室温と同一になる迄放置して下さい。
3. サンプルが界面活性剤や防腐剤を含んだ液で懸濁されている場合は、必ず水に再懸濁させて下さい。

B 試薬調製

1. 1テスト（サンプル10mL）あたり、1×SL-バッファーA、10×SL-バッファーA及び10×SL-バッファーBを各々1mL使用します。
2. 1×SL-バッファーAを調製するには、10×SL-バッファーA（無色透明液）をoocysts、cystsを含まないイオン交換水で希釈します。例えば、1mLの1×SL-バッファーAは、100μLの10×SL-バッファーAにイオン交換水を加えて1mLにします。
3. 調製した1×SL-バッファーAは、後のオーシスト/シストの捕捉ステップ12で使用します。

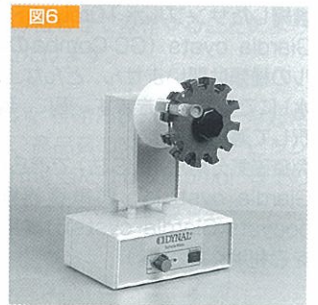
C オーシスト又はシストの捕捉

1. 10×SL-バッファーA 1mLを試験管（例えばφ16×125mm片面が平らなダイナルL10チューブ）へ入れます（図1）。
2. 次に10×SL-バッファーB（赤紫色液）1mLを、既に10×SL-バッファーA 1mLを入れた試験管へ加えます（図1）。
3. 10mLのサンプルを両バッファーが各々1mL入っている試験管へ加えます（図2）。試験管には識別ラベルを付けて下さい。
4. Dynabeadsを10秒間ボルテックスで攪拌して下さい（図3）。
5. ビーズチューブを逆さにして完全に懸濁されて、チューブの底にベレットが溜まっていないかを確認します（図4）。均一にしたビーズ100μLをサンプルと両バッファーが入っている試験管へ加えます（図5）。



注：サンプル水からCryptosporidium oocystとGiardia cystsを同時に濃縮したい場合は、GCコンボの2種のビーズを一緒に100μLずつ加えます。

6. ビーズを加えた試験管を回転ミキサー（例えばダイナルサンプルミキサーMX-1）に取り付け室温で1時間、15~20回転/分でビーズを混和させます（図6）。
7. 1時間の混和後、試験管をミキサーから外し、ダイナル製磁石（マグネットMPC-1）に試験管を取り付けます。この際、試験管の平らな面が磁石へ向く様に取り付けて下さい。
8. 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。
9. そして試験管を90度の角度まで起こしたり、寝かせる動作を繰り返し行います。この動作は、1秒間に1回起こす速度で2分間続けます（図7）。
10. ステップ7の操作は、低質量の磁性又は磁化する物質が磁石に付かない様にするものです。もしMPC-1に取り付けたサンプルを10秒以上動かさずに放置した場合は、次のステップに進む前に、ステップ7の操作を再度繰り返して下さい。
11. 試験管のキャップが上になる様にMPC-1を垂直に立て、直ちにキャップを外し、試験管から上澄み液全部を適当な容器に移します（図8）。この際、試験管を振ったりMPC-1から試験管を外さない様に注意し



て下さい。

12. 試験管からMPC-1を外し、1×SL-バッファーA 1mLを加えて、試験管内容物を緩やかに混和させ、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下さい(図10)。

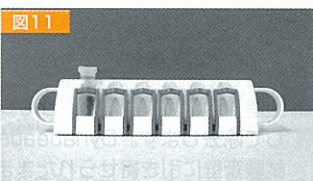


13. 試験管内の液全量を識別ラベルを付けた1.5mLマイクロ遠心管に移します。この時、ダイナル製磁石(マグネットMPC-S)から磁石板を取り外した架台を遠心管立てとしてお使い下さい(図11)。



14. MPC-Sに磁石板を取り付けます。

15. マイクロ遠心管をMPC-Sに取り付けたまま、緩やかに180度揺さぶります。



180度の揺さぶりは1秒間に1回の速度で1分間続け、この動作完了時には、ビーズ+oocysts、ビーズ+cysts複合体はマイクロ遠心管の背面にハッキリした点として見えます。

16. 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澄み液を吸引除去[®]します。

※上澄み液の除去は、手動でピペット操作する事をお奨めします。水流ポンプでの吸引除去は、ビーズと一緒に吸われてしまう事があります。

もし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澄み液を吸引する前に180度の揺さぶりを3回行って下さい。この時マイクロ遠心管の磁石側内壁の付着物に触れぬ様、更に操作中、遠心管を振動させたり、MPC-Sから外さぬ様にして下さい。

D ビーズ+oocysts複合体、ビーズ+cysts複合体の解離

—検鏡・計数の測定—

1. MPC-Sの後部から磁石板を取り外します。
2. マイクロ遠心管に0.1N塩酸50 μ Lを加え、10秒間ボルテックスします(図12)。
3. 遠心管をMPC-S架台に取り付けて、室温で少なくとも10分間垂直に静置します。
4. その後、更に10秒間ボルテックスします。
5. サンプルがすべてマイクロ遠心管の底にあることを確かめてMPC-Sに取り付けます。
6. 次いでMPC-Sに磁石板を装着して10秒間静置します。

7. スクリーニング用に識別ラベルを付けたウエルスライドを用意し、ウエルに1N水酸化ナトリウム5 μ Lを入れます(図13)。



8. マイクロ遠心管内のビーズに触れないように注意し、遠心管から液全量を、既に1N水酸化ナトリウム5 μ Lを入れてあるスライドのウエルに移します(図14)。

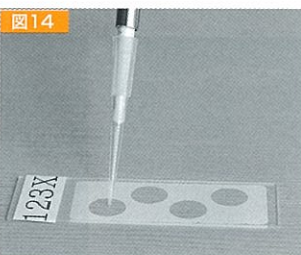


9. スライド上の試料を風乾させます。(50 $^{\circ}$ Cで1時間程度乾燥させても可)。

E 蛍光染色(検鏡・計数の測定)

蛍光染色/検出は、各ラボの既法に準じて行う事ができますが、ダイナル社は以下の方法を推奨します。

注意：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。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. スライドの各ウエルにメタノールを一滴(50 μ L)加え、室温で乾くまで蒸発させます。
2. スライドの各ウエ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(Waterborne社、Aqua-Glo G/C Direct FLあるいはCrypt-a-Glo FL)を加えます。各ウエルを確実に覆い尽くす様にして下さい。
3. スライドを保湿チャンバーに入れ、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートします。
4. 各ウエルからモノクローナル抗体を静かに吸引除去します。
5. 各ウエルに4, 6-diamidino-2-phenyl indole (DAPI) のPBS溶液(0.4 μ gDAPI/mL)を一滴(50 μ L)加え1分間置きます。
6. 各ウエルのDAPI溶液を静かに吸引除去します。
7. 各ウエルに残っているPBSとDAPIを除く為にイオン交換水を一滴(50 μ L)加え1~3秒間置きます。
8. その後、各ウエ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、スライドの各ウエルに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様にかぶせます。この際、スライドとピペットチップの先が接触しない様にして下さい。