

**HBsAg サブタイプ EIA** 24 テスト用

モノクローナル抗体による HBs 抗原のサブタイプ判定用キット

本試薬は、添付文書をよく読んでから使用してください。  
本試薬は研究用試薬であり、臨床診断には使用できません。

## 【キットの構成】

- HBs 抗体固相プレート(8 ウェル×12)…………… 1 枚  
(HBs マウスモノクローナル抗体)
- 陰性コントロール…………… 1 mL × 1 本
- 陽性コントロール d (緑)…………… 0.5 mL × 1 本
- 陽性コントロール y (黄)…………… 0.5 mL × 1 本
- 陽性コントロール r (赤)…………… 0.5 mL × 1 本
- 陽性コントロール w (白)…………… 0.5 mL × 1 本
- 酵素標識抗体 d (緑)…………… 1.5 mL × 1 本  
(ペルオキシダーゼ標識抗 d マウスモノクローナル抗体)
- 酵素標識抗体 y (黄)…………… 1.5 mL × 1 本  
(ペルオキシダーゼ標識抗 y マウスモノクローナル抗体)
- 酵素標識抗体 r (赤)…………… 1.5 mL × 1 本  
(ペルオキシダーゼ標識抗 r マウスモノクローナル抗体)
- 酵素標識抗体 w (白)…………… 1.5 mL × 1 本  
(ペルオキシダーゼ標識抗 w マウスモノクローナル抗体)
- 酵素基質…………… 10 mL × 1 本  
(TMB)
- 反応停止液…………… 10 mL × 1 本
- 洗浄原液(20 倍濃縮液)…………… 25 mL × 2 本  
(界面活性剤含有)
- プレートシール…………… 5 枚

## 【使用目的】

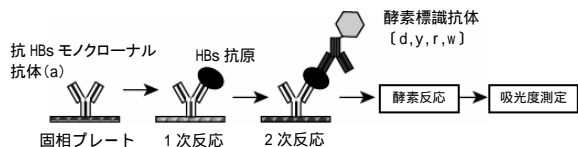
血清又は血漿中の HBs 抗原のサブタイプ (adr, adw, ayr, ayw 等) の判定

## 【測定原理】

HBs 抗原には全てのサブタイプに共通の抗原決定基 a とサブタイプに特異的な 2 組の相反する抗原決定基 d と y 及び r と w が存在します。

酵素免疫測定法 (EIA) を応用した本検出系は、二段階の抗原抗体反応と酵素呈色反応とからなります。第 1 次抗原抗体反応は、プレートに固相された共通抗原決定基 a に対するモノクローナル抗体 (抗 a マウスモノクローナル抗体) と、被検検体中の HBs 抗原との間で起こります。第 2 次抗原抗体反応は、固相抗体に結合した HBs 抗原と酵素標識されたサブタイプに特異的な 4 種類の抗体 (ペルオキシダーゼ標識抗 d、抗 y、抗 r、抗 w マウスモノクローナル抗体) との間で起こります。

検体中の HBs 抗原サブタイプに対応して通常は 2 種類の酵素標識抗体が反応し、その後酵素反応により発色します。



## 【操作方法】

## 1. 試薬の調製方法

## (1) 洗浄液

洗浄原液を精製水で 20 倍に希釈してください。  
使用後は 2~10℃で保存してください。

## 2. 必要な器具・器材

- マイクロピペット 50 μL, 100 μL
- メスシリンダー 500 mL
- アスピレーター及びポリ洗浄瓶又はマイクロプレートウォッシャー
- インキュベーター (37±1℃)
- 暗所 (暗い戸棚又は引き出しでも可)
- マイクロプレートリーダー (主波長 450 nm、副波長 620 nm 以上)

## 3. 測定操作法

キットの各試薬は使用前に必ず 15~30℃に戻してください。

## (1) 陰性、陽性コントロール及び検体の添加

ブランク用ウェルを残し、各ウェルに陰性、陽性コントロール及び検体を 50 μL ずつ入れてください。

プレートの代表的な使用 (検体割付) 例を下図に示します。

## 〈注意〉

プレートは着脱式で 12 分割が可能です。必要数を使用し未使用のものは乾燥剤と共にアルミ袋に密封し 2~10℃で保存してください。

## 検体割付例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	B	B	B	B	6	6	6	6	14	14	14	14	B: ブランク
B	N	N	N	N	7	7	7	7	15	15	15	15	N: 陰性コントロール
C	P-d	P-y	P-r	P-w	8	8	8	8	16	16	16	16	1~21: 検体
D	1	1	1	1	9	9	9	9	17	17	17	17	P-d: 陽性コントロール d
E	2	2	2	2	10	10	10	10	18	18	18	18	P-y: 陽性コントロール y
F	3	3	3	3	11	11	11	11	19	19	19	19	P-r: 陽性コントロール r
G	4	4	4	4	12	12	12	12	20	20	20	20	P-w: 陽性コントロール w
H	5	5	5	5	13	13	13	13	21	21	21	21	
	抗原決定基 d の検出	抗原決定基 y の検出	抗原決定基 r の検出	抗原決定基 w の検出	抗原決定基 d の検出	抗原決定基 y の検出	抗原決定基 r の検出	抗原決定基 w の検出	抗原決定基 d の検出	抗原決定基 y の検出	抗原決定基 r の検出	抗原決定基 w の検出	

## (2) 1 次反応

検体が蒸発しないようにプレートシールを貼り、37℃で 3 時間又は 15~30℃で 16~24 時間静置してください。(15~30℃で 16~24 時間静置の方が幾分高い測定値を示します。)

## (3) 洗浄

プレートシールをはがし、ウェル内容物をアスピレーターで吸引除去してください。ポリ洗浄瓶を用いて、プレートの各ウェルを「1. 試薬の調製方法 (1)」で調製した洗浄液で満たし、プレートを逆さまにして洗浄液を振り流します。この洗浄操作を 5 回繰り返してください。最後に、清潔なペーパータオル上でプレートを逆さまにして叩き、ウェルから洗浄液を除いてください。

## 〈注意〉

洗浄操作中、プレート表面が乾燥しないように注意し、洗浄終了後、迅速に次の操作を行ってください。

## (4) 酵素標識抗体の添加

抗原決定基 d、y、r、w をそれぞれ検出するためのウェルに対応させて、酵素標識抗体 d を 50 μL、酵素標識抗体 y を 50 μL、酵素標識抗体 r を 50 μL、酵素標識抗体 w を 50 μL 添加してください。但し、ブランク用ウェルには添加しないでください。

## (5) 2 次反応

プレートシールを貼り、37℃で 2 時間静置してください。

## (6) 洗浄

(3)と同じ手順でプレートを洗浄してください。

## (7) 酵素基質の添加

酵素基質を全ウェルに 100 μL ずつ加えてください。

## (8) 酵素反応

プレート上面に添付のプレートシールを貼り、プレートを暗所に入れて、15~30℃で 30 分間静置してください。

## (9) 反応停止液の添加

プレートシールをはがし、反応停止液を全ウェルに 100 μL ずつ加えてよく混合してください。

## (10) 吸光度の測定

マイクロプレートリーダー (主波長 450 nm、副波長 620 nm 以上) で各ウェルの吸光度を測定してください。

## 〈注意〉

- 0 点調整はブランク用ウェルを用いて行ってください。
- 反応停止後、30 分以内に測定してください。

【測定結果の判定法】

1. 判定に関する注意事項

- (1) 検体中の HBs 抗原が高力価である場合にはサブタイプの抗原決定基を比較的容易に検出することができますが、低力価の場合には検出困難なこともあります。
- \* (2) 一般的に抗原決定基 d と y の一方及び r と w の一方がそれぞれ陽性になります。(サブタイプ adr, adw, ayr, ayw のいずれかに対応します。) しかし、d, y, r, w の 3 種類以上が陽性となることも稀にあります。

2. 判定基準

- (1) 各抗原決定基の判定
  - ① カットオフ値の算出  
カットオフ値 = 各陰性コントロールの吸光度 + 0.2
  - ② 陰性・陽性の判定  
陰性: 検体の吸光度 < カットオフ値  
陽性: 検体の吸光度 ≥ カットオフ値
- (2) サブタイプの判定
  - ① 抗原決定基 d と y 及び r と w のそれぞれ一方が陽性の場合、その抗原決定基に対応するサブタイプとして判定してください。  
(例: 「d: +」、「y: -」、「r: +」、「w: -」 → サブタイプ adr)
  - ② 抗原決定基 d, y, r, w の 3 種類以上が陽性の場合、一般には d 対 y, r 対 w の各反応性を比較し優位な方を採用しますが反応性が拮抗する場合は両方を採用してください。

【使用上又は取扱い上の注意事項】

本添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。記載された使用目的及び操作方法以外での使用につきましては測定結果の信頼性を保証しかねます。

1. 一般的注意

- (1) 使用する機器の添付文書及び取扱い説明書をよく読んでから使用してください。
- (2) 誤って試薬を凍結させた場合には、正しい結果が得られないことがありますので使用しないでください。
- (3) キットの試薬は使用前に必ず 15~30℃に戻してください。
- (4) 製造番号の異なるキットの試薬を組み合わせ使用しないでください。また、プレートの再利用は避けてください。
- (5) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- (6) 試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。
- (7) 検査に用いる器具は、よく洗浄し、精製水でよく濯いだものを使用してください。
- (8) 検体ごと及び試薬ごとにマイクロペットのチップを替えてください。

2. 操作上の注意

- (1) ブランク、陰性コントロール及び陽性コントロール用ウェルは測定ごとに設けてください。
- (2) 操作開始後は定められた時間で速やかに全操作を行ってください。
- (3) 酵素反応停止後、30 分以内に吸光度を測定してください。

- (4) 操作中、プレート強くこすったり、底面に触れたりしないでください。また、プレート内面が乾燥しないように注意してください。

3. 取扱い上の注意

- (1) 試薬は皮膚や粘膜に接触させないよう注意してください。もし皮膚にかかったときは多量の水で洗い流してください。必要があれば医師の手当てを受けてください。
- (2) 検体は HBV, HCV, HIV などによる感染の危険性があるものとして取り扱ってください。また、陽性コントロール、陰性コントロールは HIV 抗体陰性を確認していますが、検体同様 HBV, HCV, HIV などによる感染の危険性があるものとして取り扱ってください。検査にあたっては感染の危険を避けるために使い捨て手袋を着用し、また口によるピペティングは行わないでください。
- (3) 使用後の検体、試薬及び検体に使用した器具類は、廃棄前に下記のいずれかの方法で処理を行ってください。
  - ① 0.05 w/v%ホルマリン溶液に 37℃、72 時間以上浸す。
  - ② 2 w/v%グルタルアルデヒド溶液に 1 時間以上浸す。
  - ③ 次亜塩素酸ナトリウム溶液(0.1%以上)に 1 時間以上浸す。
  - ④ 121℃、20 分以上オートクレーブにかける。
- (4) 陽性コントロール及び陰性コントロールの廃棄についてはアジ化ナトリウムが添加されているので、爆発性の金属アジドが発生しないように十分注意して多量の水で流してください。
- (5) 検体、廃液等が飛散した場合には、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度 1,000 ppm 以上、1 時間以上浸漬)、グルタルアルデヒド(2 w/v%、1 時間以上浸漬)等による拭き取りと消毒を行ってください。

4. その他

- (1) キット中の容器、付属品は他の目的に使用しないでください。
- (2) 本試薬は研究用試薬であり、臨床診断の目的には使用しないでください。

【貯法及び有効期間】

凍結を避け、2~10℃で保存  
製造後 1 年間有効(包装に表示の使用期限内に使用してください。)

【包装単位】

1 キット: 24 テスト用 CODE: 1A63

【主要文献】

Usuda S, Tsuda F, et al : A solid-phase enzyme immunoassay for the common and subtypic antigen determinants of hepatitis B surface antigen with monoclonal antibodies.  
J Immunol Methods **87** : 203-210, 1986.

【お問い合わせ先】

株式会社 特殊免疫研究所 営業部  
〒112-0004 東京都文京区後楽一丁目 1 番 10 号  
日本生命水道橋ビル  
TEL 03-3814-4081 FAX 03-3814-5957

測定手順

測定項目	ブランク	抗原決定基 d			抗原決定基 y			抗原決定基 r			抗原決定基 w		
		NC	PC	検体	NC	PC	検体	NC	PC	検体	NC	PC	検体
<b>1 次 反 応</b>													
37 3時間、又は 15 ~ 30 16 ~ 24時間													
< 洗 浄 > 5回繰り返し													
<b>&lt; 酵素標識抗体の添加 &gt;</b>													
陰性コントロール	-	50 µL	-	-	50 µL	-	-	50 µL	-	-	50 µL	-	-
陽性コントロール d	-	-	50 µL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
陽性コントロール y	-	-	-	-	-	50 µL	-	-	-	-	-	-	-
陽性コントロール r	-	-	-	-	-	-	-	-	50 µL	-	-	-	-
陽性コントロール w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50 µL	-
検体	-	-	-	50 µL	-	-	50 µL	-	-	50 µL	-	-	50 µL
<b>2 次 反 応</b>													
37 2時間													
< 洗 浄 > 5回繰り返し													
<b>&lt; 酵素基質の添加 &gt;</b>													
酵素	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
15 ~ 30 暗所 30分													
<b>&lt; 反応停止液の添加 &gt;</b>													
反応停止液	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
<b>&lt; 吸光度の測定 &gt;</b>													
吸光度測定 (主波長 450 nm、副波長 620 nm 以上)													

NC:陰性コントロール

PC:陽性コントロール

**Instruction Manual**

**HBsAg Subtype EIA**

EIA based hepatitis B surface antigen subtyping kit with monoclonal antibodies

- Thoroughly read this instruction manual before use of this kit.
- This kit is for research use only.

**I. Kit components**

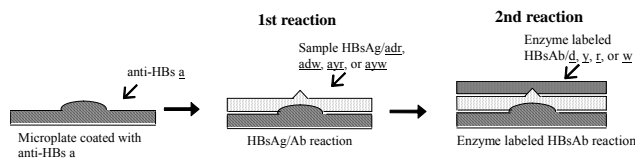
1. Microplate coated with anti-HBs a (8 wells/strip x 12)..... 1 plate
2. HBsAg negative control ..... 1 mL x 1 vial
3. HBsAg positive control (d) green ..... 0.5 mL x 1 vial
4. HBsAg positive control (y) yellow ..... 0.5 mL x 1 vial
5. HBsAg positive control (r) red ..... 0.5 mL x 1 vial
6. HBsAg positive control (w) white ..... 0.5 mL x 1 vial
7. Enzyme labeled monoclonal antibody (d) green..... 1.5 mL x 1 vial
8. Enzyme labeled monoclonal antibody (y) yellow ..... 1.5 mL x 1 vial
9. Enzyme labeled monoclonal antibody (r) red..... 1.5 mL x 1 vial
10. Enzyme labeled monoclonal antibody (w) white..... 1.5 mL x 1 vial
11. Enzyme substrate..... 10 mL x 1 vial  
(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine)
12. Reaction stopper..... 10 mL x 1 vial
13. 20x concentrated washing solution.....25 mL x 2 vials  
(containing detergent)
14. Plate seal .....5 sheets

**II. Application**

Determination of subtypes of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in serum or plasma

**III. Assay principle**

This kit has been developed as a reagent for research purposes to detect respective subtypic determinants, d, y, r, and w, in hepatitis B surface antigen (HBsAg) positive samples for identification of HBsAg subtypes such as adr, adw, ayr and ayw. Detection of subtypic determinants is based on the solid-phase sandwich EIA (Enzyme Immuno Assay). 96 wells of the microplate are coated with monoclonal antibody against the common determinant a of HBsAg. HBsAg in samples dispensed to wells is caught on the solid phase and their subtypic determinant, d, y, r, or w, is detected by peroxidase-labeled monoclonal antibody against corresponding determinant.



**IV. Operation**

**1. Preparation of the washing solution.**

- 1) Dilute 20 times 20x concentrated washing solution with purified water. Keep this solution at 2 ~ 10°C.

**2. Materials required but not provided**

- 1) Micro pipettes, 50 µL and 100 µL
- 2) Measuring cylinder, 500 mL
- 3) Aspirator (or plate washer)
- 4) Incubator capable of controlling temperature at 37 ± 1°C
- 5) Dark box (A light tight cupboard or a drawer will do.)
- 6) Dual wavelength microplate reader (main wavelength 450 nm and sub wavelength 620 nm or longer)

**3. Assay procedure**

Make sure to return the kit to 15 ~ 30°C before use.

**1) Addition of samples and the control sera**

Dispense 50 µL each of samples and the control sera in respective wells. Following chart shows a recommended pattern of wells assigned to samples and the control sera. Wells can be assigned in any way, however.

**An example of well layout**

**Note:**

Microplate can be divided into 12 strips. Strips not used should be kept in an aluminum pouch together with desiccant and stored at 2 ~ 10°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	B	B	B	B	6	6	6	6	14	14	14	14	B : Blank N : Negative Control 1~21 : Samples P-d : Positive Control d P-y : Positive Control y P-r : Positive Control r P-w : Positive Control w
B	N	N	N	N	7	7	7	7	15	15	15	15	
C	P-d	P-y	P-r	P-w	8	8	8	8	16	16	16	16	
D	1	1	1	1	9	9	9	9	17	17	17	17	
E	2	2	2	2	10	10	10	10	18	18	18	18	
F	3	3	3	3	11	11	11	11	19	19	19	19	
G	4	4	4	4	12	12	12	12	20	20	20	20	
H	5	5	5	5	13	13	13	13	21	21	21	21	
					detection of determinant d	detection of determinant y	detection of determinant r	detection of determinant w	determinant d	determinant y	determinant r	determinant w	

**2) 1st reaction**

Cover the microplate with the plate seal to prevent evaporation and leave the microplate to stand for 3 hrs at 37°C or 16 ~ 24 hrs at 15 ~ 30°C. Incubation for 16 ~ 24 hrs at 15 ~ 30°C assures higher absorbance.

**3) Washing**

Remove the plate seal from the microplate. Remove samples and microplate contents from all wells with an aspirator. Fill wells with the washing solution, turn the microplate upside down, and shake out the washing solution. Repeat this 5 times. Hold the microplate upside down and tap it against clean paper towel to thoroughly remove the washing solution from all wells.

**Note:**

While washing the microplate, care should be taken not to dry the microplate well surface. After washing the microplate, immediately follow the following step.

**4) Addition of the labeled antibody**

Dispense Enzyme labeled monoclonal antibody against determinant d, y, r or w in corresponding wells in the following manner. Dispense 50 µL each of the labeled monoclonal antibody against;

- determinant d to wells for detecting determinant d,
- determinant y to wells for detecting determinant y,
- determinant r to wells for detecting determinant r, and
- determinant w to wells for detecting determinant w.

**Note:**

Do not add the labeled monoclonal antibodies in the blank wells.

**5) 2nd reaction**

Cover the microplate with the plate seal and incubate for 2 hrs at 37°C.

**6) Washing**

Repeat washing as in **3)** above.

- 7) Addition of Enzyme substrate  
Add 100  $\mu$ L of Enzyme substrate in all wells.
- 8) Enzyme reaction  
Cover the microplate with the plate seal and incubate at 15 ~ 30°C for 30 min in the dark.
- 9) Addition of Reaction stopper  
Remove the plate seal and stop color development by adding 100  $\mu$ L of Reaction stopper in all wells.
- 10) Absorbance measurement  
Measure absorbance of each well by a microplate reader (main wavelength 450 nm and sub wavelength 620 nm or longer).

**Note:**

- Adjust the zero point using the blank well.
- Absorbance must be measured within 30 min after stopping color development.

**V. Interpretation of the results****1. Positive and negative determination**

Calculate the Cut-off value, that is, the absorbance of the Negative Control + 0.2.

Negative: Absorbance of samples < Cut-off value

Positive: Absorbance of samples  $\geq$  Cut-off value

**2. Determination of HBsAg subtypes**

- 1) When one of determinant d and y, or r and w (compound subtypes) are detectable, subtypic determinants should be detected as subtype corresponding to the determinant. (For example, when the case of "d:+", "y:-", "r:+", "w:-" should be determined as subtype "adr.")
- 2) When more than 3 of determinant d, y, r and w (compound subtypes) are detectable, majorities of determinant d or y, and r or w should be determined in general. If reactivities of them are alike, both compound subtypes should be determined.

**Note:**

- 1) When HBsAg titer of samples is high, subtypic determinants can be easily detected. When the titer is low, however, their detection sometimes becomes difficult.
- 2) Generally, samples test positive for either determinant d or y, as well as for either determinant r or w, corresponding to the four major HBsAg subtypes, adr, adw, ayr, or ayw. In rare samples, however, more than 3 of d, y, r and w (compound subtypes) are detectable.

**VI. Warnings and precautions**

**This kit must be used according to the instructions and for the purpose described in this manual. No result is guaranteed in any use or for any purpose other than those described in this manual.**

**1. General precautions**

- 1) Check accuracy of tools and properly use them according to their instructions.
- 2) Do not use a kit stored in frozen condition, because any result is not guaranteed.
- 3) Make sure to return the kit to 15 ~ 30°C before use.
- 4) Do not mix reagents of different production lots. Microplate wells can not be reused.
- 5) Do not use expired reagents.
- 6) Avoid contamination of the kit reagents with microorganisms.

- 7) Materials to be used for the assay must be clean and thoroughly washed with purified water in advance.
- 8) Replace micropipette tips for each sample and reagent.

**2. Operational precautions**

- 1) Measure blank and negative and positive controls for each assay.
- 2) Once assay is started, all operation must be finished promptly within specified time.
- 3) Absorbance must be measured within 30 min after stopping the enzyme reaction.
- 4) Do not scrape or touch the bottom of wells or do not dry the surface of the wells during assay.

**3. Handling precautions**

- 1) Avoid contact of reagents. If they contact skin, wash with plenty of water. Get medical care if need.
- 2) HBsAg positive and negative controls provided with this kit and samples should be handled as if they were potentially infectious with HBV, HCV, or HIV. Wear disposable gloves and thoroughly wash hands after assaying. Do not pipette with mouth.
- 3) Before discarding, treat samples, reagents and materials in either of the followings.
  - a) Immerse in 0.05 w/v% formalin for over 72 hrs at 37°C.
  - b) Immerse in 2 w/v% glutaraldehyde solution for over 1 hr.
  - c) Immerse in sodium hypochlorite solution (more than 0.1%) for over 1 hr.
  - d) Autoclave for over 20 min at 121°C.
- 4) The HBsAg positive and negative control sera contain sodium azide and should be washed down with a sufficient volume of water to prevent formation of explosive metal azide.
- 5) If sample or used reagents are spilled, wipe by using sodium hypochlorite solution (Concentration of effective chlorine: 1,000 ppm or more) or glutaraldehyde (immerse in 2 w/v%, for over 1 hr), and sterilize.

**VII. Storage and shelf life**

Store the kit at 2 ~ 10°C and avoid freezing. This kit is stable for 1 year after the date of manufacture. Validity of kit is shown in the package.

**VIII. Package**

1 kit for 24 tests      Code No. 1A63

**IX. Reference**

Usuda S, Tsuda F, et al: A solid-phase enzyme immunoassay for the common and subtypic antigen determinants of hepatitis B surface antigen with monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* **87**: 203-210, 1986.

Manufacturer and sold by;

**Institute of Immunology Co., Ltd.**

1-1-10, Koraku, Bunkyo-Ku,  
Tokyo 112-0004, JAPAN  
Tel : +81-3-3814-4081  
Fax : +81-3-3814-5957