

SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein ELISA Kit

抗原検出用 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質 ELISA キット

【I】キットについて

【I-1】背景と測定原理

2019 年に中国で発生した新型コロナウイルス 感染症（Covid-19）によるパンデミックは世界中に広まり、2021 年 7 月末の時点では世界で 1 億 9719 万人が感染し、421 万人が死亡しています。Covid-19 の原因ウイルスとして同定された SARS-CoV-2 は全長約 30,000 塩基対の RNA を遺伝子として持つコロナウイルスの一種ですが、ウイルスゲノム中の S 遺伝子にコードされたスパイクタンパク質はウイルス表面に発現する膜タンパク質です。スパイクタンパク質は S1、S2 の二つのドメインから構成されます。

SARS-CoV-2 が細胞に感染する際、まず細胞表面のアンジオテンシン変換酵素 2（ACE2）にスパイクタンパク質の S1 ドメインが結合し、その後ウイルスが細胞内に取り込まれることが明らかとなっており、ACE2 は SARS-CoV-2 の受容体と考えられています。さらに、スパイクタンパク質については S1 ドメインの構造解析から、ACE2 に結合する狭い領域（受容体結合ドメイン、RBD）が同定されています(1)。

本製品は、スパイクタンパク質 S1 ドメインの RBD に特異的かつ親和性が高い 2 種類の中和抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により、サンプル中の SARS-CoV-2 スパイクタンパク質を測定することができます。

【I-2】キットの特長

- ・血清、血漿などのサンプル中の SARS-CoV-2 スパイクタンパク質を測定することが可能です。
- ・特殊な装置は不要で、通常のプレートリーダーがあれば測定できます。

本品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。 本マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。

- ・ SARS-CoV-2 S1 ドメインの RBD に対する 2 種類の抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により、感度よく特異的に SARS-CoV-2 スパイクタンパク質を測定します。
- ・ この ELISA に用いた抗体は、武漢型のほか、アルファ、ベータ、ガンマ、デルタ型すべての変異株ウイルスと強く反応します（論文準備中）。

【I-1】キットの原理

プレートには抗 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗体が固相されていて、検体を加えると検体中の SARS-CoV-2 スパイクタンパク質がトラップされます。洗浄後、トラップされたタンパク質に対して HRP 標識した抗 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗体を反応させ、基質添加後 HRP による発色をプレートリーダーで読み取り定量化します。

【I-2】構成品

保存温度：冷蔵（2～8℃）

	内容	容量	数量	危険表記および取扱上の注意
1	抗 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗体 固相化プレート	96well (8well x 12 strips)	1 枚	成分は労働安全衛生法に非該当ですが、取扱う際には眼鏡・手袋 などの保護具を着用の上、人体への接触を避けるよう十分に配慮してください。
	標準タンパク質	200μL (25,000pg/mL)	1 本*	
2	アッセイバッファー	25mL	1 本	
3	洗浄バッファー (10 倍濃縮)	25mL	1 本	
4	HRP 標識抗 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗体 (500 倍濃縮)	20μL	1 本	
5	基質液	12mL	1 本	（成分として硫酸を 9.8%含む） 労働安全衛生法 第 57 条および第 57 条の 2 に該当 危険   
6	停止液(2N H ₂ SO ₄)	6mL	1 本	

				・吸入すると有害（気体、蒸気、ミスト） ・重篤な皮膚の薬傷及び眼の損傷 ・重篤な眼の損傷 ・呼吸器系の障害のおそれ ・長期にわたる、又は反復ばく露による呼吸器系の障害のおそれ
8	プレートシール		2 枚	

*n=2 として、標準曲線 4 回分

ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- ・マイクロピペット（10～1000μL）
- ・マルチチャンネルピペット
- ・リザーバー
- ・プレートシェーカー
- ・プレートリーダー（波長 450nm が測定可能なもの）
- ・プレートウォッシャー

【Ⅱ】試薬、サンプルの調製方法

【Ⅱ－１】洗浄バッファの調製

洗浄バッファ（10 倍濃縮）を精製水で 10 倍希釈します。

例）プレート 1 枚分：洗浄バッファ（10 倍濃縮）25mL に精製水 225mL を加え、混合します。

【Ⅱ－２】標準タンパク質の希釈調製（プレート 1 枚あたり 2 ウェル分ずつ調製）

	標準タンパク質 濃度(pg/mL)	標準タンパク質	アッセイ バッファ	希釈率
A	25000			
B	2500	50μL of A	450μL	10

C	1250	250μL of B	250μL	2
D	625	250μL of C	250μL	2
E	312.5	250μL of D	250μL	2
F	156.3	250μL of E	250μL	2
G	78.1	250μL of F	250μL	2
H	39.1	250μL of G	250μL	2

標準タンパク質（上表の A）50μL にアッセイバッファー450μL を加え（10 倍希釈）、よく混合した溶液を B とします。この B 溶液 250μL にアッセイバッファー250μL を加え（2 倍希釈）、よく混合した溶液を C とします。以下、同様に 2 倍希釈した溶液を調製し、100μL ずつ測定して下さい。各濃度 $n=2$ では、 $100\mu\text{L} \times 2 = 200\mu\text{L}$ 使用します。

【Ⅱ-3】抗体の調製

HRP 標識抗 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗体(500 倍濃縮)をアッセイバッファーで 500 倍希釈します。

例) プレート 1 枚分：アッセイバッファー10mL に HRP 標識抗 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗体(500 倍濃縮)を 20μL を加え、転倒混和します。希釈調製した HRP 標識抗 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗体は必要量を用時調製してください。

【Ⅱ-4】サンプルの調製

血清・血漿を用いる場合は、アッセイバッファーを用いて 2 倍以上に希釈してサンプル溶液としてください。

【Ⅲ】測定方法

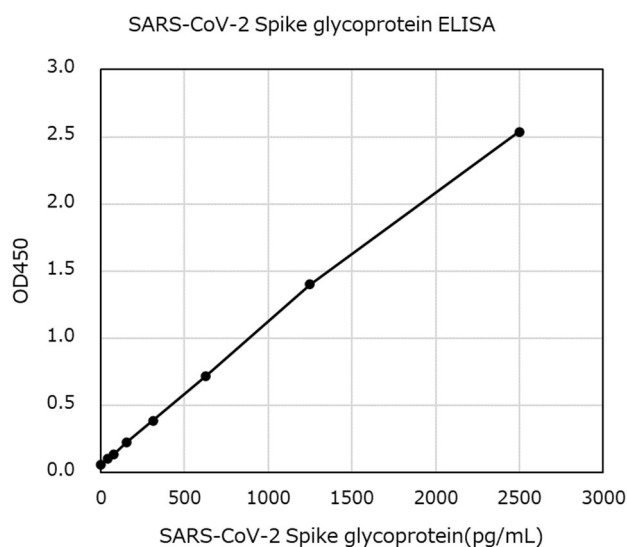
1. サンプル及び操作上の取り扱いについては、必要に応じた適切なバイオハザード対策を講じて、各規則に従って適切に廃棄物処理してください。
2. 抗 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗体固相化プレートと試薬を室温に戻します。
3. 標準タンパク質を希釈調製します（【Ⅱ-2】）。
4. 2 で希釈調製した標準タンパク質(39.1～2500 pg/mL)もしくはサンプル溶液を 1 ウェルあたり 100μL ずつプレートへ加えます。
5. プレートにシールし、プレートシェーカーで攪拌(800rpm, 30 秒)します。

6. 室温で 2 時間静置反応します。
7. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 μ L の洗浄バッファー（【Ⅱ-1】）を加え、洗浄します。
この操作を 3 回行って下さい。
8. 希釈調製した HRP 標識抗 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗体（【Ⅱ-3】）を各ウェルに 100 μ L ずつ加えます。
9. プレートにシールし、プレートシェーカーで撹拌します。
10. 室温で 2 時間静置反応します。
11. 抗体溶液を完全に除去し、各ウェルに 300 μ L の洗浄バッファーを加え、洗浄します。この操作を 3 回行って下さい。
12. 基質液を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、室温で遮光して 20 分間静置反応します。
13. 発色の濃度を確認後、各ウェルに 50 μ L ずつ停止液を加えます。
14. プレートリーダーにて各ウェルの吸光度を測定します（測定波長：450nm）。
15. 横軸に標準タンパク質濃度、縦軸に吸光度を取り、標準曲線を描きます。
16. サンプルから得られた吸光度を標準曲線に対応させ、サンプル溶液の SARS-CoV-2 スパイクタンパク質濃度(pg/mL)を算出し、希釈倍数を乗じます。

【Ⅳ】 測定例

【Ⅳ-1】 標準曲線

一例として、標準タンパク質に対する吸光度(OD450)をグラフに描くと図 1 のようになります。ただし、アッセイ毎に新たな標準曲線を描いて、サンプル中の濃度を算出してください。



標準タンパク質 (pg/mL)	吸光度(450nm)		平均吸光度
	1	2	
0	0.058	0.057	0.058
39.1	0.094	0.106	0.106
78.1	0.136	0.142	0.139
156.3	0.221	0.233	0.227
312.5	0.391	0.381	0.386
625	0.738	0.697	0.718
1250	1.382	1.420	1.401
2500	2.465	2.608	2.537

図1 標準タンパク質による標準曲線

【IV-2】 サンプルの測定例

SARS-CoV-2 スパイクタンパク質 (S1,S2 ドメイン) を強制発現させた Expi293 の培養上清から超遠心法により精製したエクソソーム (15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000ng/mL) をウェルに 100μL ずつ加え測定しました。エクソソーム濃度(ng/mL)と吸光度 (OD450)を グラフに表すと図2のようになります。

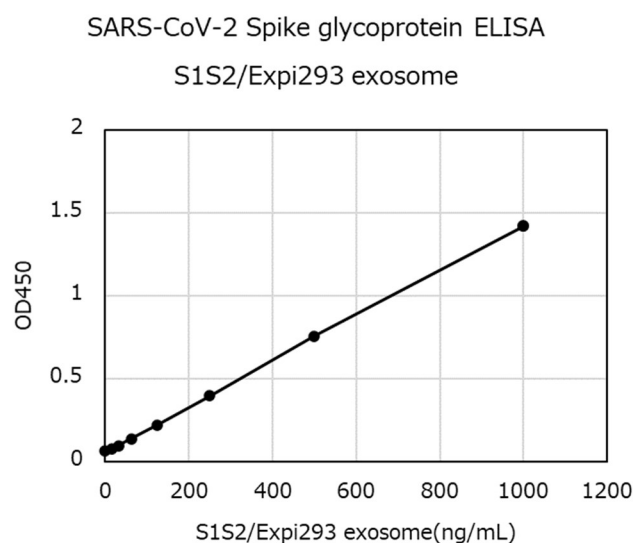


図2 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質 (S1,S2 ドメイン) を強制発現させたエクソソームの測定

【参考文献】

- (1) Alexandra C. Walls, Young-Jun Park, et al., Cell 180, 1-12 (2020)

SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein ELISA Kit

【 I 】 About this kit

【 I – 1 】 Background and Measurement Principal

The pandemic caused by the new coronavirus infection (Covid-19), which spread from China to the world in 2019, have infected 197.19 million people and killed 4.21 million people by the end of July 2021 in the worldwide. SARS-CoV-2, which was identified as the causative virus of Covid-19, is a type of coronavirus that has an RNA with a total length of 30,000 base pairs as a gene. The spike protein encoded by the S gene in the viral genome is a membrane protein expressed on the surface of the virus. The spike protein is composed of two domains, S1 and S2.

It has been clarified that the S1 domain of the peplomer protein first binds to angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) on the cell surface when SARS-CoV-2 infect cells, so that ACE2 is considered as a receptor for SARS-CoV-2. In addition, the structural analysis of the S1 domain has identified the narrow region which binds to ACE2 (receptor binding domain, RBD) (1).

This product can measure SARS-CoV-2 spike protein in a sample by the sandwich ELISA method using two types of neutralizing antibodies that are specific and have high affinity for the RBD.

【 I – 2 】 Features

- Measures SARS-CoV-2 spike protein in samples such as serum and plasma.
- No special equipment required, measurement is possible with a normal plate reader.
- SARS-CoV-2 spike protein can be measured sensitively and specifically by sandwich ELISA method using two types of antibodies against RBD in the SARS-CoV-2 S1 domain.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

• The antibodies used for this ELISA strongly react with various mutant viruses such as alpha, beta, gamma and delta types as well as original Wuhan type (paper is being prepared).

【 I – 3】 Kit Principle

Anti-SARS-CoV-2 spike protein antibody is immobilized on the plate. When the sample is added, the SARS-CoV-2 spike protein in the sample is trapped. After washing, the trapped protein is reacted with an HRP-labeled anti-SARS-CoV-2 spike protein antibody, and after substrate addition, the color development by HRP is read and quantified with a plate reader.

【 I – 4】 Kit Component

Storage temperature : 2 ~ 8 °C

	Reagent	Volume	Quantity
1	Anti-SARS-CoV-2 Spike protein Antibody Immobilized Plate	96well (8well x 12 strips)	1 plate
	Standard Protein	200μL (25,000pg/mL)	1 tube*
2	Assay Buffer	25mL	1 vial
3	Washing Buffer (10X)	25mL	1 vial
4	HRP Conjugated Anti- SARS-CoV-2 Spike protein Antibody (500X)	20μL	1 vial
5	Substrate Solution	12mL	1 vial
6	Stop Solution (2N H2SO4)	6mL	1 vial
8	Plate Seals		2 sheets

* Sufficient to create 4 standard curves with n=2.

Required Materials Not Included in the Kit

- Micropipettes (10 ~ 1000 μL)
- Multichannel micropipette
- Multichannel micropipette Reservoir
- Plate shaker
- Microplate reader (enable to measure at wavelength 450nm)

- Plate washer

【Ⅱ】 Preparation of Reagents and Samples

【Ⅱ – 1】 Preparation of Washing Buffer

- Dilute Washing Buffer (10×) to 10 folds with purified water.
e.g. For 1 plate, add 225mL of purified water to 25mL of Washing Buffer (10 x) and mix well.

【Ⅱ – 2】 Preparation of Standard Protein solution

	Concentration (pg/mL)	Standard Protein	Assay Buffer	Dilution factor
A	25000			
B	2500	50μL of A	450μL	10
C	1250	250μL of B	250μL	2
D	625	250μL of C	250μL	2
E	312.5	250μL of D	250μL	2
F	156.3	250μL of E	250μL	2
G	78.1	250μL of F	250μL	2
H	39.1	250μL of G	250μL	2

- To prepare Solution B, add 450μL of Assay Buffer into 50μL of Standard Protein (Solution A), and then mix well (10 times dilution). To prepare Solution C, add 250μL of Assay Buffer into 250μL of Solution B, and then mix well (2 times dilution). Similarly, 2 times dilution series for Solution D through H should be prepared.
- Use 200μL for measurement, using 2 wells for each solution (n=2).
- Diluted Standard Protein Solution(39.1~2500 ng/mL) should be freshly prepared at each time before use.

【Ⅱ – 3】 Preparation of antibody solution

- Dilute HRP conjugated anti- SARS-CoV-2 Spike protein antibody (500x) to 500 folds using Assay Buffer.

e.g. For 1 plate, add 20 μ L of antibody (500x) into 10mL of Assay Buffer. Mix by inverting the tube.

* Diluted antibody solution should be freshly prepared at each time before use.

【II –4】 Preparation of Samples

When using serum or plasma, dilute it 2-fold or more with assay buffer to make a sample solution.

【III】 Sample measurement procedure

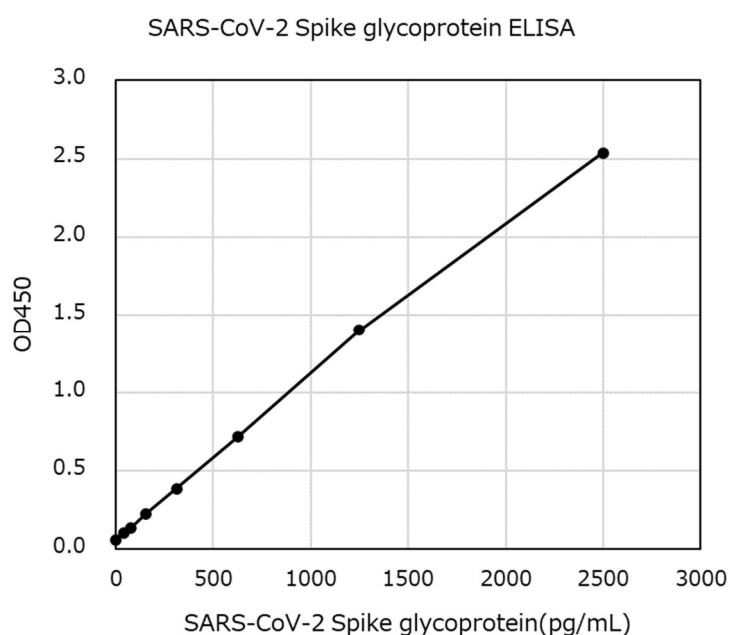
- 1. Regarding the handling of samples and operations, take appropriate biohazard measures as necessary, and dispose of waste appropriately in accordance with each rule.**
2. Leave Anti-SARS-CoV-2 Spike protein Antibody Immobilized Plate and each reagent to the room temperature.
3. Prepare Standard Protein solution by serial dilution. (from step 【II –2】)
4. Add 100 μ L each of serial diluted Standard Protein solution (39.1 ~ 2500pg/mL) or Sample solution into the well.
5. Seal the microplate with Plate Seals, place into plate shaker, and then shake it at 800 rpm for 30 sec.
6. Incubate at room temperature for 2hrs for static reaction.
7. Discard all the reaction solution, and then rinse each well with 300 μ L of Washing Buffer (from step 【II-1】). Repeat this step for 3 times.
8. Add 100 μ L each of diluted HRP conjugated anti-SARS-CoV-2 Spike protein antibody (from step 【II-3】) to the well.
9. Seal the plate, and then shake in the plate shaker.
10. Incubate at room temperature for 2hrs for static reaction.
11. Discard the antibody solution, and then rinse each well with 300 μ L of Washing Buffer. Repeat this step for 3 times.

12. Add 100 μ L of Substrate Solution into each well, and then incubate at room temperature protected from light for 20min for static reaction.
13. Visually confirm the coloring, and then add 50 μ L each of Stop Solution.
14. Place into the plate reader, and read the absorbance of each microwell on a spectrophotometer at the wavelength of 450nm.
15. Create a standard curve for the SARS-CoV-2 Spike protein by plotting the mean absorbance (y axis) against the Standard protein concentration (x axis) (Fig. 1).
16. Calculate the concentration by comparing the absorbance obtained from the sample solution to the standard curve. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, to obtain the concentration of SARS-CoV-2 Spike protein in the sample.

【IV】 Example of Results

【IV-1】 Standard curve

As a reference example, Fig. 1 shows the graph of absorbance (OD450) for a standard protein. However, draw a new standard curve for each assay and calculate the concentration in the sample.



Standard Protein (pg/mL)	Absorbance (450nm)		Average
	1	2	
0	0.058	0.057	0.058
39.1	0.094	0.106	0.106
78.1	0.136	0.142	0.139
156.3	0.221	0.233	0.227
312.5	0.391	0.381	0.386
625	0.738	0.697	0.718
1250	1.382	1.420	1.401
2500	2.465	2.608	2.537

Fig. 1 Standard curve and measured values

【IV-2】 Sample measurement example

Exosomes (15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000ng/mL) purified from the culture supernatant of Expi293 in which SARS-CoV-2 Spike protein was forcibly expressed were measured.

Figure 2 shows the exosome concentration (ng / mL) and absorbance (OD450) graphically.

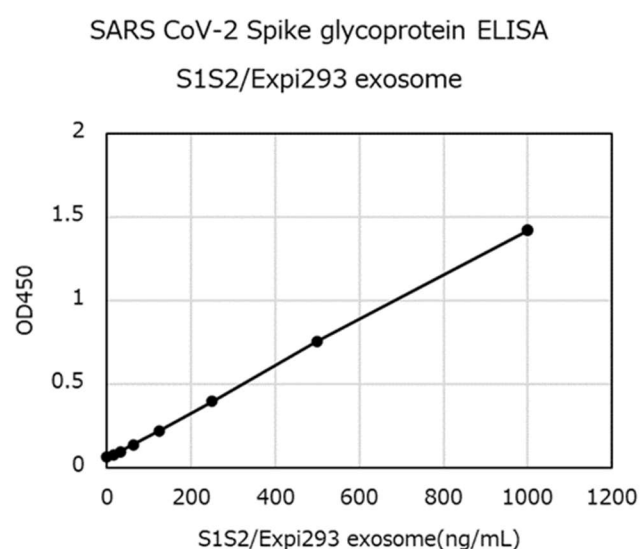


Fig. 2 Measurement of exosomes overexpressing SARS-CoV-2 spike protein (S1, S2 domain)

【Reference】

- (1) Alexandra C. Walls, Young-Jun Park, et al., Cell 180, 1-12 (2020)