



PPV 抗体検出用 ELISA キット使用説明書

対象製品：SNV-10-7400-02 SVANOVIR® PPV 抗体検出用 ELISA

原理

PPV 抗体検出 ELISA Kit は血清中のブタパルボウイルス特異的抗体を検出するための ELISA キットです。このキットの方法は競合 ELISA 法に基づいており、マイクロタイタープレートのウェル上には非感染性の PPV 抗原がコートしてあります。テストサンプル中に PPV に対する抗体が含まれている場合、酵素標識した抗体と競合し抗体ウェル上のウイルス抗原に結合します。テストサンプル中に PPV に対する抗体が含まれていない場合、酵素標識した抗体が結合し、基質溶液を加えることで色の変化が起こります。つまり色の変化がない場合、陽性ということになります。色の変化はマイクロプレートフォトメーターで 450nm の OD を測定します。

製品構成

- 非感染性PPV抗原をコートしたマイクロタイターストリップ (8ウェル x 12ストリップ)
- 凍結乾燥した HRP 標識マウス抗PPV抗体
- PBS-Tween Solution 20 x concentrate (125mL)
- Substrate Solution (20mL)– (tetramethylbenzidine in substrate buffer containing H2O2) –暗所保存
- Stop Solution (10mL) – Contains sulphuric acid –腐食性につき取り扱い注意
- Positive Control Serum A (250 μ l)–0.05% merthiolate.
- Negative Control Serum B(250 μ l) – 0.05% merthiolate.

必要な器具試薬

1. 精密ピペット (5 to 200 μ l)
2. ピペットチップ
3. 精製水
4. 洗浄瓶、マルチチャネルピペッターもしくはプレートウォッシャー
5. PBS-Tween用の容器 (1-2L)
6. マイクロプレートフォトメーター, 450 nm フィルター

検体情報

血清：1サンプルあたり10 μ Lの希釈していない血清もしくは血漿が必要です。新鮮、冷蔵、凍結した血清（血漿）サンプルが使用可能です。

試薬の調整

PBS-Tween Buffer: PBS-Tween Solution 20 x concentrate を20倍に蒸留水で希釈します。1プレートあたり500mLのPBST溶液が必要になりますので25mLのPBST20 x 溶液を475mLの蒸留水で希釈しよく攪拌します。ボトルの底に結晶化した沈殿物がないことを確認してください。もし沈殿物が見られるようでしたら温めてよく攪拌してください。

HRP Conjugate抗PPV抗体溶液: HRP Conjugate に11.5mLのPBS-Tween Bufferを加えます。1分間静地してその後よく混ぜてください。残った溶液は-20℃で保存可能です。凍結融解は3回まで可能です

操作手順

1. 全ての試薬を室温に戻します。
2. プレートを3回PBSTでウォッシュします。それぞれのウォッシュ操作ではウェルをバッファーで満たし、プレートを空にします。たたいて全ての残っている溶液を除去します。
3. 90 μ LのPBSTをサンプルとコントロールで使用するそれぞれのウェルに加えます
4. 10 μ LのPositive Control Serum (A)とNegative Control Serum (B)をPPV抗原コートされた対応するウェルに加えます（ウェルは確認目的のため2つずつ使用することを推奨します）
5. 10 μ Lのサンプル血清を対応するウェルに加えます（1サンプルにつき2ウェル使用することを推奨します）。
6. 100 μ LのHRP conjugateをそれぞれのウェルに加えよく混ぜます
7. 室温で30分間インキュベートします
8. ステップ2と同じウォッシュ操作を繰り返します。
9. 100 μ LのSubstrate Solutionをそれぞれのウェルに加えて室温で10分間インキュベートします。時間は最初のウェルに試薬を加えた時点から測ります。
10. 50 μ LのStop Solutionをそれぞれのウェルに加えてよく混ぜ、反応を停止させます。Stop Solutionを加える順番はステップ12でSubstrate Solutionを加えた順番と同じにしてください。
11. コントロールとサンプルのOD値（450nm）をマイクロプレートフォトメーターで測定します。（反応を停止してから15分以内にODの測定を行ってください）

結果の解釈

1. 平均OD値をコントロールとサンプルについてそれぞれ計算します。
2. コントロールのPI (Percent Inhibition)値の算出

$$PI = 100 - \left(\frac{\text{サンプルもしくはPCの平均OD値} - \text{NCの平均OD値}}{\text{NCの平均OD値}} \right) \times 100$$

試験コントロールの基準

コントロールが以下の基準を満たしていることを確認してください

ネガティブコントロールのOD値：>0.6

ポジティブコントロールのOD値：<0.3

結果の判定基準

% Inhibition (PI値)	
ネガティブ	<50
ポジティブ	50-80
強いポジティブ	>80

*まれに高レベルのPRCV抗体を持った血清がプロゾーン現象によりブロッキングELISAの結果がネガティブになることがあります。このような血清の場合、希釈率を高める(例 1/250, 1/500)ことによりポジティブとなります。

**プロゾーン現象もしくは試験操作中のエラーのいずれかによる無効な試験

注意事項

- 説明書をよく読んで試験を行ってください
- キットは冷蔵(2-8℃)で保存してください
- 全ての試薬は使用前に室温に戻してください
- 他のテストキットと試薬を混ぜてしないようにしてください
- 試薬のコンタミネーションを起こさないように気をつけてください
- 有効期限の切れたキットを使用しないでください
- サンプル毎にピペットチップは変えてください
- テストごとにコントロールを含めてください
- 試薬の調整には蒸留水をお使いください

株式会社ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門2-7-14 八洲ビル

TEL 03-3593-3211 FAX 03-3593-3216

E-mail techservice@veritastk.co.jp