



## 仮性狂犬病/オーエスキー病

### PRV-gB 抗体検出用 ELISA キット使用説明書

対象製品：SNV-10-7262-02 SNV-10-7262-10 SVANOVIR® PRV-gB 抗体検出用 ELISA

#### 原理

PRV-gB 抗体検出 ELISA Kit は血清もしくは血漿中の PRV-gB 特異的抗体を検出するための ELISA キットです。マイクロタイタープレートのウェル上には糖たんぱく gB を呈した不活化 PRV 株由来の抗原がコートしてあります。gB に対する抗体の有無の検出は HRP 標識した gB 特異的なモノクローナル抗体を使用しています。テストサンプル中に PRV-gB に対する抗体が含まれていない場合（非感染もしくは非ワクチン接種ブタ由来）、gB 抗原はフリーの状態に残り、続けて HRP 標識抗体が結合します。基質溶液を加えることで色の変化が起こります。一方、gB に対する抗体が血清中に存在している場合（感染もしくはワクチン接種ブタ由来）、これらの抗体が gB 抗原に結合します。結果として HRP 標識抗体の結合を阻害することになり、標識抗体は洗浄操作により取り除かれます。基質を加えても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。

感染動物と gE 除去ワクチン接種動物の識別のためには SVANOVIR PRV-gE 抗体検出 ELISA をご利用ください。

#### 製品構成

- 非感染性PRV抗原をコートしたマイクロタイタープレート（10 plates kit）もしくはストリップ(2 plates kit)
- 凍結乾燥した HRP 標識マウス抗PRV-gBモノクローナル抗体
- PBS-Tween Solution 20 x concentrate (125mL)
- Substrate Solution (100mL)– (tetramethylbenzidine in substrate buffer containing H2O2) –暗所保存
- Stop Solution (50mL) – Contains sulphuric acid –腐食性につき取り扱い注意
- Positive Control Serum A (4.5ml)–0.05% merthiolate.
- Negative Control Serum B(4.5ml) – 0.05% merthiolate.

#### 必要な器具試薬

1. 精密ピペット（5 to 200  $\mu$ 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100  $\mu$  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PRV-gB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(インキュベーション時間は60分とオーバーナイトの二通りの方法があります)

1. 全ての試薬を室温に戻します。

### 60分間インキュベーション

- 100  $\mu$  LのPositive Control Serum (A)とNegative Control Serum (B)をPRV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)
- 100  $\mu$  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)
- プレートにシールをし、37℃で1時間インキュベートします

### オーバーナイトインキュベーション

- 25  $\mu$  Lのサンプル希釈バッファーを全てのウェルに加えます
- ステップ2とステップ3の操作を行います
- プレートにシールをし、室温で一晩 (12-18時間) インキュベートします
- 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。
- 100  $\mu$  LのHRP conjugateをそれぞれのウェルに加えよく混ぜ、37℃で30分間インキュベートします
- ステップ8と同じウォッシュ操作を繰り返します。
- 100  $\mu$  LのSubstrate Solutionをそれぞれのウェルに加えて室温で15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。
- 50  $\mu$  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11でSubstrate Solutionを加えた順番と同じにしてください。
- 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

- 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。
- それぞれのサンプルと陽性コントロールについてOD<sub>p</sub>を以下の式に従い計算します

OD<sub>p</sub> = サンプルもしくはPCの平均OD値/NCの平均OD値 x 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値がお互いに25%以上違っていないこと

ネガティブコントロールのOD値：0.9-1.4

ポジティブコントロールのODp：<30

#### 結果の判定基準

	短時間インキュベーション ODp	長時間インキュベーション ODp
ネガティブ (感染もしくはオーエスキー に対するワクチン接種がされていない)	>60	>55
疑わしい (要再テスト)	50-60	46-55
ポジティブ(感染もしくはオーエスキー に対するワクチン接種がされている)	<50	<45

感染動物と gE 除去ワクチン接種動物の識別のためには SVANOVIR PRV-gE 抗体検出 ELISA をご利用ください。

#### 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°C) 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まうしないでください
- 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

SNV-10-7262-02 (2plate kit) の試薬は少なくとも10回に分けて試験するのに十分な量があります。また、ストリップのシールが剥がれても冷蔵で4週間まで保存が可能です。

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](mailto:techservice@veritastk.co.jp)