

ジャガイモ Y ウィルス N 系統 測定試薬

製品番号：309401

PVY-N ELISA ホクドー

試薬構成

96 ウェルプレート 1 枚分

(2~8℃保存)

構 成 品	包 装	数 量	備 考
抗体固相プレート (Anti PVY IgG 固相プレート)	96 ウェル/プレート	1 プレート	乾燥プレート
酵素標識抗体原液 (ALP 標識 Anti PVY IgG)	0.3mL	1 本	100 倍濃縮液
濃縮磨砕液 (リン酸緩衝液、Tween20)	100mL	1 本	5 倍濃縮液
反応用緩衝液 (PBS、BSA、Tween20)	26mL	1 本	
濃縮洗浄液 (リン酸緩衝液、Tween20)	100 mL	2 本	5 倍濃縮液
酵素基質液 (PNPP 溶液)	26 mL	1 本	
反応停止液 (2mol/L NaOH)	13 mL	1 本	
陽性コントロール	1mL	2 本	
陰性コントロール	1mL	2 本	
プレートシール		2 枚	

*0.1%アジ化ナトリウム含有：酵素標識抗体原液、濃縮磨砕液、反応用緩衝液、濃縮洗浄液、陽性、陰性コントロール

操 作 法

■準備するもの

- ・精製水・マイクロプレートリーダー (主波長 405 nm 付近) ・遠心機 (3000rpm, 4℃が可能なもの)
- ・マイクロピペット (可変式 200, 1000 μL) ・マイクロプレートプレートウォッシャー・リザーバー
- ・マルチチャンネルマイクロピペット (50-200 μL) ・ディスプレイチューブ (1.5mL、15mL) ・ペーパータオル

■試薬の調製

1. 酵素標識抗体液の調製：必要ウェル数に応じて酵素標識抗体原液を反応用緩衝液を用いて、100 倍希釈し使用する。
例：6 列 48 ウェル = 120 μL + 11.88mL (反応用緩衝液)
2. 磨砕液の調製：濃縮磨砕液 100 mL に精製水 400 mL を加えて 5 倍希釈し磨砕液とする。
3. 洗浄液の調製：濃縮洗浄液 100mL に精製水 400mL を加えて 5 倍希釈し洗浄液とする。

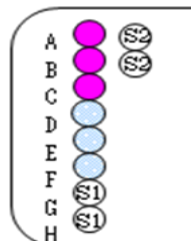
■測定方法 **注意：各試薬は、室温に戻してから使用して下さい。**

1. 測定サンプル作製

- 1) サンプル各 1g を量り取り、乳鉢内で細かくはさみで裁断。
- 2) 希釈した磨砕液を 5mL 添加し乳鉢で磨砕。
- 3) 磨砕した液を 15mL 遠心チューブに移す。
- 4) さらに乳鉢に磨砕液 5mL を添加し洗い、洗浄液も同じチューブに移す。
- 5) 3000rpm 10min 4℃遠心し上清を取り、10 倍希釈サンプルとする。

2. 一次反応

- 1) 抗体固相プレート必要数をアルミ袋より取り出す。(コントロールは 3 重測定を推奨。)
- 2) コントロール及びサンプルをマイクロピペットを用いてそれぞれ 200 μL ずつウェルに添加する。



参考) プレート配置例

測定毎に

陽性コントロール (●) を 3 重測定、

陰性コントロール (●) を 3 重測定、

その下から測定したいサンプル (S1~) を添加する (2 重測定以上を推奨)。

- 3) プレートシールを貼り、室温で1時間反応させる。
3. 洗浄 プレートウォッシャーを用いて洗浄液でプレートの各ウェルを5回洗浄する。
4. 二次反応
 - 1) ウェルに残った洗浄液を完全に除去した後（ペーパータオルの上で軽くたたく）、必要量を希釈した酵素標識抗体液をリザーバーに移し、マイクロピペットで200 μ Lずつ添加する。
 - 2) プレートシールを貼り、室温で1時間反応させる。
5. 洗浄 3.と同様にウェルを洗浄する。
6. 酵素反応
 - 1) ウェルに残った洗浄液を完全に除去した後、必要量の酵素基質液をリザーバーに移し、マイクロピペットで200 μ Lずつ添加する。
 - 2) 室温で20分間反応させる。
※酵素標識抗体液を入れたリザーバーと発色液を入れるリザーバーは、必ず別のものを使用して下さい。
※一度リザーバーへ移した酵素基質液は試薬ボトルへ戻さないで下さい。
7. 反応停止 反応終了後、リザーバーに移した反応停止液をマイクロピペットで50 μ Lずつ添加し軽く混和する。
8. 吸光度測定 マイクロプレートリーダーで、波長405nmの吸光度を測定する。
※吸光度測定は反応停止後すみやかに測定して下さい。
9. 結果の判定
陰性コントロールの吸光度が0.2以下、陽性コントロールの吸光度が1.0以上であることを確認しサンプルの吸光度から判定する。

操作上の注意

1. 使用前に取扱説明書をよくお読みいただき、十分な理解の上で測定を行ってください。
2. 洗浄後は速やかに酵素標識抗体液または、酵素基質液を添加してください。

使用上の注意

1. 保存及び使用中は、試薬に直射日光を当てないで下さい。
2. 反応温度、反応時間は厳守して下さい。
3. キットの構成は、室温（20～30℃）に戻してから使用して下さい。
4. 洗浄が適当でない場合、結果にばらつきが生じることがありますので十分洗浄を行って下さい。
5. ウェル間のコンタミネーションを防ぐため、液の泡立ちや、周囲への付着が起こらないようにして下さい。
6. 抗体固相マイクロプレート開封後はアルミ袋のチャックを確実に閉めて保存して下さい。
7. サンプル、試薬への微生物の混入や試薬間のコンタミネーションを避けて下さい。
8. 酵素基質液は金属イオンにより酸化されやすいのでディスポーザブルの新しい器具を使用し、試薬ボトルからリザーバーへ酵素基質液を移す際にもディスポーザブルのピペットを使用して下さい。また、一度リザーバーへ移した発色液は試薬ボトルへ戻さないで下さい。
9. 試薬類は眼、皮膚などに付着しないよう注意して取り扱って下さい。万が一、付着した際は大量の水で洗い流し専門医を受診して下さい。

貯 法

2～8℃保存。

製造元

使用期限

製造後6ヶ月（外箱、ラベルに記載）

Hokudo 株式会社 **ホクドー**

〒063-0849 札幌市西区八軒9条西10丁目4番28号

TEL. 011-641-7507 FAX. 011-644-9209



Reagent for Measuring Potato Virus Y-N Strain

Product No. 309401

PVY-N ELISA HOKUDO*Hokudo***Reagent configuration**

96-well plate x 1

(Stored at 2-8°C)

Components	Packaging	Quantity	Remarks
Antibody solid-phase plate (Anti-PVY IgG solid-phase plate)	96 wells/plate	1	Dry plate
Enzyme-labeled antibody stock solution (ALP-labeled Anti-PVY IgG)	0.3 mL	1	100-fold concentrated solution
Concentrated homogenate solution (Phosphate buffer, Tween20)	100 mL	1	5-fold concentrated solution
Reaction buffer (PBS, BSA, Tween20)	26 mL	1	
Concentrated washing solution (Phosphate buffer, Tween20)	100 mL	2	5-fold concentrated solution
Enzyme substrate solution (PNPP solution)	26 mL	1	
Reaction stop solution (2 mol/L NaOH)	13 mL	1	
Positive control	1 mL	2	
Negative control	1 mL	2	
Plate seal		2	

*Containing 0.1% sodium azide: enzyme-labeled antibody stock solution, concentrated homogenate solution, reaction buffer, concentrated washing solution, positive/negative control

Operating method

■ Materials to be prepared

- Purified water, microplate reader (Dominant wavelength: around 405 nm), centrifuge (Capable of operating at 3000 rpm and 4°C)
- Micropipette (Variable type 200, 1000 µL) • microplate washer/reservoir
- Multichannel micropipettes (50-200 µL), disposable tubes (1.5 mL, 15 mL), paper towels

■ Preparation of reagents

1. Preparation of enzyme-labeled antibody solution: Dilute the enzyme-labeled antibody stock solution 100-fold using the reaction buffer, according to the required number of wells.
Example: 6 rows, 48 wells = 120 µL + 11.88 mL (Reaction buffer)
2. Preparation of the homogenate solution: To 100 mL of the concentrated homogenate solution, add 400 mL of purified water to obtain a 5-fold dilution.
3. Preparation of the washing solution: To 100 mL of the concentrated homogenate, add 400 mL of purified water to obtain a 5-fold dilution.

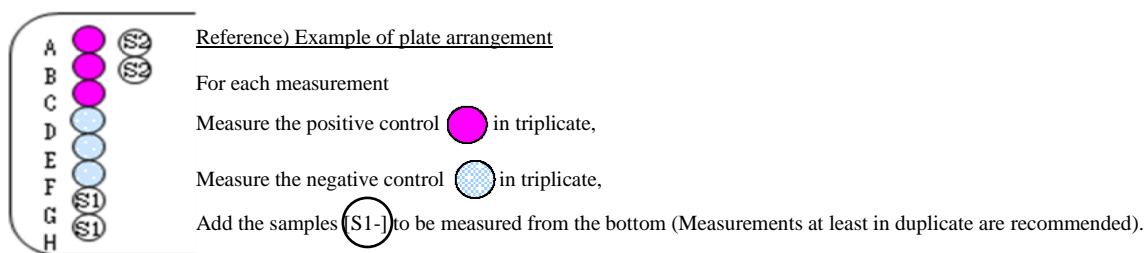
■ Measurement method **Caution: Allow each reagent to stand at room temperature before use.**

1. Preparation of samples for measurements

- 1) Weigh 1 g of each sample and cut into small pieces, with scissors in a mortar.
- 2) Add 5 mL of the diluted homogenate solution and mill it in a mortar.
- 3) Transfer the milled solution to a 15 mL centrifuge tube.
- 4) Afterwards, add 5 mL of the homogenate solution to the mortar and wash, and transfer the resulting washing solution to the same tube.
- 5) Centrifuge the mixture at 3000 rpm for 10 minutes at 4°C, and collect the supernatant for use as the 10-fold diluted sample.

2. Primary reaction

- 1) Remove the necessary number of antibody solid-phase plates from their aluminum bags. (Measurements in triplicate are recommended for the control.)
- 2) Add 200 µL each of the control and sample to wells using a micropipette.



- 3) Attach a plate seal, and allow it to react at room temperature for 1 hour.
3. Wash each well of the plate 5 times with washing solution, using the washing plate washer.
4. Secondary reaction
 - 1) After completely removing any washing solution that remains in the wells (by gently tapping the wells on a paper towel), transfer the necessary amount of the diluted enzyme-labeled antibody solution to the reservoir, and add 200 μ L of the solution to each well with a micropipette.
 - 2) Attach a plate seal, and allow it to react at room temperature for 1 hour.
5. Wash the wells in the same manner as described in 3. Cleaning.
6. Enzymatic reaction
 - 1) After completely removing any washing solution that remains in the wells, transfer the necessary amount of the enzyme substrate solution to the reservoir, and add 200 μ L of the solution to each well with a micropipette.
 - 2) Allow it to react at room temperature for 20 minutes.
 - *Be sure to use separate reservoirs for the enzyme substrate solution and the enzyme-labeled antibody solution.
 - *Do not return the enzyme substrate solution to the reagent bottle, once it has been transferred to the reservoir.
7. Stopping reaction After the stopping the reaction, add 50 μ L of the reaction stop solution transferred to the reservoir to each well using a micropipette, and mix gently.
8. Measure the absorbance Measure the absorbance at 405 nm using a microplate reader for absorbance measurement.
 - *Measure the absorbance immediately after stopping the reaction.
9. Evaluation of the results

Evaluate the absorbance of each sample by confirming that the absorbance of the negative control is not more than 0.2, and that of the positive control is not less than 1.0.

Precautions for operation

1. Read the instruction manual carefully before use, and make sure to understand the contents fully prior to making measurements.
2. Add the enzyme-labeled antibody solution or enzyme substrate solution promptly after washing.

Precautions for use

1. Do not expose the reagents to direct sunlight during storage and use.
2. Please strictly observe the specified reaction temperature and reaction time.
3. Allow the kit components to stand at room temperature (20-30°C) before use.
4. Wash the components well, as improper washing may result in variations in measurement results.
5. To prevent contamination between wells, take care to avoid foaming or adhering of the solutions to surrounding areas.
6. After unpacking the antibody solid-phase microplate, securely close the aluminum bag for storage.
7. Avoid microbial contamination of the samples and reagents, as well as contamination between reagents.
8. Since the enzyme substrate solution is easily oxidized by metal ions, always use new disposable tools, and use a disposable pipette when transferring the enzyme substrate solution from the reagent bottle to the reservoir. Do not return the enzyme substrate solution to the reagent bottle, once it has been transferred to the reservoir.
9. Handle the reagents with care, to prevent them from coming into contact with eyes, skin, etc. In case of contact with a reagent, wash the reagent off with copious water, and consult a specialist.

Storage

Store at 2-8°C.

Manufacturer

Expiration date

6 months after manufacture (indicated on the outer box and label)

Hokudo Co., Ltd.

10-4-28, 9 Jo-nishi, Hachiken, Nishi-Ku
Sapporo-shi, 063-0849
TEL.011-641-7507 FAX.011-644-9209