

研究用試薬エコロジーナ®アルキルフェノール(AP)
ELISA キット
(マイクロプレート)
使用説明書

前文

アルキルフェノールは界面活性剤の原料やプラスチック製品の酸化防止剤として広範囲に利用されており、国内で年間約2万5千トン(ノニルフェノール+オクチルフェノール)が生産されています¹⁾。

近年、ノニルフェノールおよびオクチルフェノールは魚類への内分泌攪乱作用を通じ生態系に影響を及ぼす可能性がある¹⁾と報告されています。また、アルキルフェノールは海水、河川水や下水放流水中에서도検出されており^{2)、3)}、環境中での挙動が注目されています。

現在、「下水試験方法(追補暫定版)ー内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編ー」(2002年版)⁴⁾には、試料中のアルキルフェノール測定法としてGC/MS法が記載されています。しかし、GC/MS法には抽出、クリーンアップなどの煩雑な操作が含まれるほか、分析に高価な機器が必要となります。

本品は、酵素免疫定量法により試料中のアルキルフェノールを高感度かつ簡便に測定できるキットです⁵⁾。



キットの特長

1. モノクローナル抗体を使用しているため、製造ロット間で抗体性能にばらつきがなく、環境水中のノニルフェノールおよびオクチルフェノールを特異的に検出できます。
2. 定量範囲は 5-500 $\mu\text{g/L}$ (ppb)と高感度で、固相抽出によりさらに低濃度の試料も測定できます。
3. 測定値の CV(変動係数)は 10%以下で、ばらつきが少なく、高精度です。
4. 有機溶媒の使用量を低減できます。
5. 測定試料の調製から定量まで 2.5 時間で完了します^{注)}。
6. 簡単な操作で多検体を同時に処理できるため、経済的です。

注) 試料の前処理時間は含みません。

測定原理 (競合 ELISA 法)

1. 抗原抗体反応(競合反応)

アルキルフェノール(AP)(抗原)と特異的に結合するたんぱく質(抗体)が、マイクロプレート内面に塗布(固相化)されています。

前処理した試料水と、AP に発色用酵素(ペルオキシダーゼ)を結合させた抗原酵素複合体(酵素標識抗原)をマイクロプレートに加え、競合反応させます。

2. 酵素反応(発色反応)

競合反応後、洗浄により未反応物を除去し、発色基質(過酸化水素、TMB)を加えます。抗体に結合した抗原酵素複合体の発色用酵素のはたらきで発色基質が着色します。AP 濃度が高い試料では、抗原酵素複合体の抗体への結合量が少ないため、着色が弱くなり、吸光度が低くなります。

3. 濃度の定量

450nm での吸光度(着色の度合い)とノニルフェノール(NP)濃度との関係から標準曲線を作成します。これを用いて、試料中の AP 濃度(ノニルフェノール換算値)を定量します。

キット構成内容

No.	品名	容量	数量	保存条件
①	抗APモノクローナル抗体固相化マイクロプレート	96 well	1枚	2~8°C
②	NP標準原液 0 μ g /L (10%DMSO+20%メタノール溶液)	1.5mL	1本	2~8°C
	NP標準原液 50 μ g /L (10%DMSO+20%メタノール溶液)			
	NP標準原液 200 μ g /L (10%DMSO+20%メタノール溶液)			
	NP標準原液 1000 μ g /L (10%DMSO+20%メタノール溶液)			
	NP標準原液 5000 μ g /L (10%DMSO+20%メタノール溶液)			
③	抗原酵素複合体粉末		2本	2~8°C
④	抗原酵素複合体溶解液(白キャップ)	7mL	2本	2~8°C
⑤	6倍濃縮洗浄液	50mL	1本	2~8°C
⑥	発色液(褐色ビン)	15mL	1本	2~8°C
⑦	発色停止液(黒キャップ)	15mL	1本	2~8°C
⑧	混合用マイクロプレート	96 well	1枚	室温
⑨	プレートシール		1枚	
⑩	使用説明書		1部	

＜キットの他に必要な試薬・器材＞

器材例は推奨品であり、弊社で使用可否を確認しておりますが、これらに限定するものではありません。

● 固相抽出による濃縮が必要でないとき ●

- 1 ディスポーザブル培養試験管(例: 岩城硝子社製、品番 9831-1207)
※壁面への吸着を防ぐため、試験管は必ずディスポーザブル品を使用してください。
- 2 ガラス繊維フィルター(例: アドバンテック社製、品番 36481047, GS-25 ϕ 47mm)およびろ過に必要な器具
- 3 マイクロピペット(20-200 μ L, 200-1000 μ L)(例: キルソンピペットマン P-200, P-1000)
- 4 マルチチャンネルピペット(50-300 μ L) (例: フィンピペットデジタルマルチチャンネル 8 チャンネル)
- 5 プレートリーダー(測定波長 450nm) (例: TECAN サンライズリモート 和光純薬工業(株)取扱い)
- 6 ストップウォッチ(時計)
- 7 ストリップイジェクター(あると便利です)(コーニングコースター社製、品番 2578)
- 8 メタノール(高純度品を推奨します)
- 9 DMSO(高純度品を推奨します)

● 固相抽出による濃縮が必要なとき ●

- 1-9 は共通
- 10 固相カートリッジ(例: ABS ELUT-NEXUS 200mg/6ml 品番 5010-40084 ジーエルサイエンス(株)取扱い)
 - 11 ジクロロメタン(高純度品を推奨します)
 - 12 固相抽出用器具一式(VAC ELUTE、真空ポンプ、ガラス遠沈管、濃縮装置など)

測定時の一般的注意

- 本キットは、使用前に 30 分程度放置し、室温に戻してからご使用ください。
- 異なるキットの試薬を組み合わせて使用しないでください。
- 試薬は凍結を避けて 2~8℃で冷蔵保存し、使用期限の過ぎたものは使用しないでください。
- 試薬調製時・測定操作時は、試薬が直接皮膚や目に触れないよう、眼鏡や手術用ゴム手袋などの保護具を使用してください。
- 精度管理のため、繰り返し測定 ($n \geq 2$) を推奨します。

測定法

1. 試料前処理例

濁りのない試料 : DMSO とメタノールを添加し、1%(V/V)DMSO + 10%(V/V)メタノール溶液とし、これを検液とします。

濁りのある試料 : ガラス繊維ろ紙上でろ過し、ろ紙上の残渣は 1%DMSO+10%メタノール溶液で洗浄します。洗浄液をろ液に合わせて 1%DMSO + 10%メタノール溶液とし、これを検液とします。

AP が低濃度の試料 : 試料中の AP 濃度がキットの定量下限 (5ppb) 以下の場合、固相抽出等による濃縮後、1%DMSO + 10%メタノール溶液とし、これを検液とします。

【濃縮方法の概略】⁶⁾

- ① ジクロロメタン 10mL、メタノール 5mL および蒸留水 5mL であらかじめコンディショニングした固相カートリッジ (ABS ELUT-NEXUS) に、流速 10mL/min 以下で試料を通水します。
- ② 蒸留水 5mL および蒸留水:メタノール混合物 (50:50) 5mL で洗浄後、固相カートリッジを吸引し、十分に乾燥します (45 分程度)。
- ③ ジクロロメタン 6mL により溶出します。(流速 3~5mL/min)
- ④ 窒素パージ (窒素ガス吹き付け) により溶媒を除去します。
- ⑤ 1%DMSO + 10%メタノール溶液に再溶解し、これを検液とします。

※ジクロロメタンは、ヒトに対する発がん性が指摘されています (NTP:GROUP b, IARC:GROUP 2B)。「ジクロロメタンによる健康被害を防止するための指針」(厚生労働省 平成 14 年 1 月 21 日公示) に従い適切な措置を講じた上でご使用ください。

※窒素パージは 30℃以下で行ってください。

2. ノニルフェノール (NP) 標準液の調製

!! 重要 !!

1) 希釈用メタノール溶液の調製

メタノール 0.8mL に蒸留水 8.2mL を加え、希釈用メタノール溶液を調製します。

2) 「②NP 標準原液」10 倍希釈液の調製

1) で調製した希釈用メタノール溶液を用いて、『②NP 標準原液 (10%DMSO + 20%メタノール溶液)』(各 0, 50, 200, 1000, 5000 μ g/L) を、10 倍に希釈します (例: 希釈用メタノール溶液 1800 μ L に各 NP 標準原液 200 μ L を添加)。

※10 倍希釈を省略し、「②NP標準原液」を直接測定すると、吸光度が全て低くなります。標準液調製時は必ず 10 倍希釈を行ってください。

※標準液は必ず使用時に調製してください。保存使用はできません。

※希釈容器はディスポーザブル培養試験管をおすすめします。

※NP標準液調製時は、NPの壁面への吸着を防止するため、1) 希釈用メタノール溶液、2) 「②NP標準原液」の順で混合してください。

※標準液調製時はボルテックスミキサー等の使用は避け、試験管を強く振らないでください。発泡を避けるため、マイクロピペットを利用し、液中で吸入・排出を2~3回ゆっくりと繰り返して混合してください。

※NP 標準原液中のメタノールおよびDMSO が揮散しますので、分取後は速やかにフタを固く閉め、冷蔵保存してください。

※使用しなかったNP 標準原液および標準液は回収し、水系に直接棄棄しないでください (例: 布や紙で吸い取り、焼却処理)。

3. 「抗原酵素複合体溶液」の調製

「③抗原酵素複合体粉末」(1本)に、「④抗原酵素複合体溶解液(白キャップ)」を全量 (7mL) 加えて溶解し、抗原酵素複合体溶液を調製します。

※抗原酵素複合体溶液は冷蔵保存し、溶解後2週間以内に使用してください。

※マイクロピペットを利用し、液中で吸入・排出を2~3回繰り返して混合してください。

※抗原酵素複合体溶液を2本同時を使用する時は、あらかじめ混合してから使用してください。1本 (7mL) で約 50well 分の測定ができます。

4. 「混合液」の調製

「⑧混合用マイクロプレート」を用い、抗原酵素複合体溶液 100 μ L/well と測定試料または2. で調製した各濃度の NP 標準液(いずれも 1%DMSO + 10%メタノール溶液) 100 μ L/well を混合します。

※壁面への吸着を防止するため、抗原酵素複合体溶液を先に、測定試料またはNP標準液を後に分注してください。

※マイクロピペットあるいはマルチチャンネルピペットを利用し、液中で吸入・排出を2~3回繰り返して混合してください。また、泡立ちやすいので、分注の際は気泡が入らないようゆっくりと操作してください。

※NP 濃度0の場合は1%DMSO 10%メタノールを用いてください。

※精度管理のため、NP 濃度0の標準液をできるだけ多く測定するようおすすめします。

5. 抗原抗体反応(競合反応)

室温に戻した「①抗APモノクローナル抗体固相化プレート」に4.で調製した混合液を 100

$\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注し、液面が水平になるように端を軽くたたきます。「⑨プレートシール」を貼り、室温(18~25°C)で 60 分間反応させます。

※マイクロプレートは、必要なwell 数が使用することができるように、8well ずつのスプリットタイプになっています。未使用部分は乾燥剤とともにチャック付ラミネート袋に戻し、密封後、冷蔵保存しておけば次回も使用することができます(使用済みのwell を未使用の抗体プレートと一緒に保管しないでください)。

※測定誤差の原因となりますので、分注する際にお湯が入らないように注意してください。

※異物混入および蒸発防止のため、反応中はプレートシールでマイクロプレート上面を覆ってください。

※反応中はマイクロプレートを静置してください。

※23°Cの保持が可能な恒温槽を所有している場合は、恒温槽の使用をおすすめします。

※特に検本数が多い場合は、各検本の抗原抗体反応時間が一定になるように注意してください。

6. 「洗浄液」の調製

抗原抗体反応時間中に、「⑤ 6倍濃縮洗浄液」と蒸留水を 1:5 の割合で混合し、洗浄液を調製します(例 :20mL の「⑤ 6倍濃縮洗浄液」に 100mL の蒸留水を添加)。

※分割使用の場合は、1 回の測定に必要な量だけ分取して使用してください。1well あたり約 1.2mL (1プレートあたり約 120mL) を調製の目安としてください。

※一旦希釈した洗浄液は冷蔵保存し、希釈後1ヶ月以内に使用してください。

7. 未反応物の除去

プレートシールを取り、反応液を捨て、洗浄液 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ を用いて well 内を 3 回洗浄します。3 回目の洗浄液を捨てた後は、裏返したマイクロプレートをペーパータオル等の上で軽くたたいて(タッピング)、洗浄液を完全に除去します。

※測定誤差の原因となりますので、3 回目の洗浄後はwell の底に洗浄液が残っていないことを確認してください。

※プレート裏面の汚れは吸光度の測定誤差の原因となりますので、触れないように注意してください。

※反応液は回収し、AP を水系に直接廃棄しないでください(例: 布や紙へ吸い取り、焼却処理)。

8. 発色反応

「⑥発色液(褐色ビン)」を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、プレートシールを再び表面に貼って、室温(18~25°C)で 30 分間反応させた後、「⑦発色停止液(黒キャップ)」を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加します。

※23°Cの保持が可能な恒温槽を所有している場合は、恒温槽の使用をおすすめします。

※特に検本数が多い場合は、各検本の発色反応時間が一定になるように注意してください。

※分割使用の場合は、1 回の測定に必要な量だけ分取して使用してください。8well あたり約 1mL (1プレートあたり約 12mL) を調製の目安としてください。残りは速やかにフタを固く閉め、冷蔵保存してください。

※発色試薬を加えると青色に、発色停止液を加えると黄色に呈色します。

9. 比色および濃度計算

プレートリーダーを用い、波長 450nm で吸光度(OD)を測定します。

方眼紙もしくはパソコンを利用し、検液中の AP 濃度を算出します。検液中の AP 濃度より、次式を用いて試料中の AP 濃度(ノニルフェノール換算値)を算出します。

$$\text{試料中の AP 濃度 } (\mu\text{g}/\text{L}) = \text{検液中の AP 濃度 } (\mu\text{g}/\text{L}) / 0.89 / \text{濃縮倍率}$$

(係数 0.89 は、添加した 10%(V/V)メタノール+1%(V/V)DMSO 由来の補正係数)

※発色反応停止後 15 分以内に測定してください。

※標準曲線は測定ごとに作成してください。

※マイクロプレートの裏面には触れないよう注意してください。

※測定は定量範囲内 (5-500 $\mu\text{g/L}$) とし、500 $\mu\text{g/L}$ を越える高濃度の試料は 1%DMSO +10%メタノール溶液で希釈した後、再測定してください。

■AP 濃度算出方法■

方眼紙利用:

NP 0 $\mu\text{g/L}$ の時の OD を 100%として、各濃度での阻害率(B/B0%)を次式により算出します。

$$\text{阻害率 (B/B0\%)} = \frac{\text{(サンプルまたは標準液のOD)}}{\text{(NP 0 } \mu\text{g/Lの時のOD)}}$$

標準液の NP 濃度 ($\mu\text{g/L}$) と OD または B/B0% を両対数方眼紙 (または片対数方眼紙) にプロットして検量線を作成し、得られた検量線より検液中の AP 濃度 (ノニルフェノール換算値) を算出します。

(測定例)

Standard OD or B/B0%

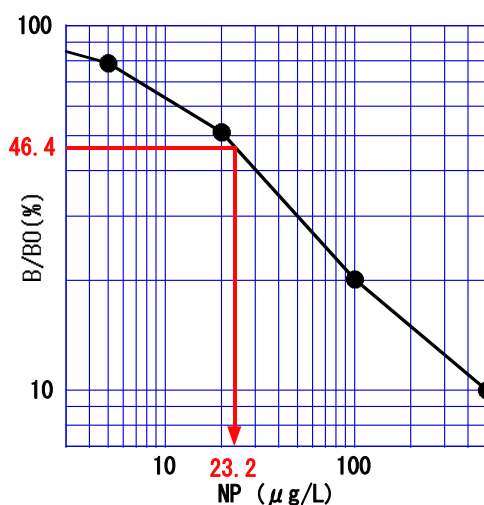
NP($\mu\text{g/L}$)	OD	B/B0%
0	1.313	100
5	1.037	79.0
20	0.670	51.0
100	0.264	20.1
500	0.131	10.0

方眼紙からの読み取り例

NP($\mu\text{g/L}$)	OD	B/B0%
23.2	(0.609)	46.4

Log-Log Graph Paper Calculation

NP=23.2($\mu\text{g/L}$) from B/B0%=46.4%



パソコン利用:

データ処理ソフトウェアを用いて 4-parameter logistic fitting 後、回帰式より検液中の AP 濃度 (ノニルフェノール換算値) を算出します。

<データ処理ソフトウェアの例>

“デルタソフト(DeltaSoft)” : BioMetallics, Inc., Princeton, NJ (<http://www.microplate.com>)

測定サンプル数（例）

添付の「①抗APモノクローナル抗体固相化マイクロプレート」には96のwellがあり、一列(8well)ずつ12列に分割できます。

例1)一括測定: NP標準液として5系列(0, 5, 20, 100, 500 $\mu\text{g/L}$)を使用

NP標準液として5系列をn=2で使用すると、残りのwell数は86となりますので、43サンプルを一度に測定することができます(【レイアウト例 1】参照)。

【レイアウト例 1】

検液は分割しやすいように縦方向に分注してください(A1~E2は標準液に使用)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	S04	S04	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
B	5	5	S05	S05	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
C	20	20	S06	S06	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
D	100	100	S07	S07	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
E	500	500	S08	S08	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
F	S01	S01	S09	S09	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
G	S02	S02	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
H	S03	S03	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43

例2)二分割測定: NP標準液として5系列を使用(n=2)

一回あたりの検体数が19個(n=2)までなら、二分割の測定が可能です(【レイアウト例 2】参照)。

【レイアウト例 2】

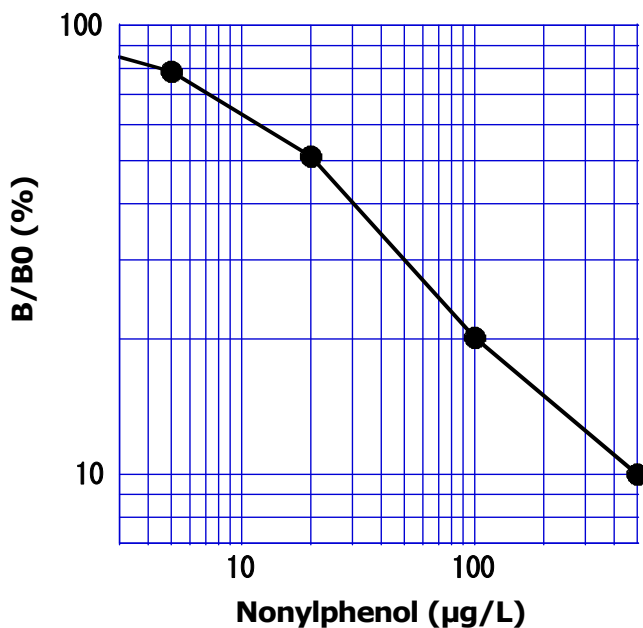
検液は分割しやすいように縦方向に分注してください(A1~E2、A7~E8は標準液に使用)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	S04	S04	S12	S12	0	0	S04	S04	S12	S12
B	5	5	S05	S05	S13	S13	5	5	S05	S05	S13	S13
C	20	20	S06	S06	S14	S14	20	20	S06	S06	S14	S14
D	100	100	S07	S07	S15	S15	100	100	S07	S07	S15	S15
E	500	500	S08	S08	S16	S16	500	500	S08	S08	S16	S16
F	S01	S01	S09	S09	S17	S17	S01	S01	S09	S09	S17	S17
G	S02	S02	S10	S10	S18	S18	S02	S02	S10	S10	S18	S18
H	S03	S03	S11	S11	S19	S19	S03	S03	S11	S11	S19	S19

抗 AP 抗体の交差反応性

Compounds	Cross Reactivity (%)
Nonylphenol (NP)	100
Octylphenol (OP)	96
Nonylphenol Ethoxylate (NPnEO)	
NP1EO	1.2
NP2EO	2.1
NPnEO (n≐5)	3.2
NPnEO (n≐7.5)	4.5
NPnEO (n≐10)	4.9
Octylphenol Ethoxylate (OPnEO)	
OPnEO (n≐10)	2.9
Nonylphenoxy Acetic Acid (NPnEC)	
NP1EC	0.5
NP2EC	1.5
NP3EC	3.8
Anionic Surfactants	
Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS)	<0.1
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	<0.1
Alkylether Sulfate (AES)	<0.1
Sodium Laurate (SOAP)	<0.1

標準曲線 (例)



定量範囲は 5~500 $\mu\text{g/L}$ と高感度で、定量範囲内濃度の試料はろ過だけで測定することができます。定量下限値以下の試料は、固相抽出による濃縮を併用することで測定可能です。測定値の CV (変動係数) は 10% 以下で、ばらつきが少なく、高精度です。

参考文献

- 1) 環境省 (2001, 2002) 内分泌攪乱化学物質問題検討会資料
- 2) 東ら(2003) 水環境中におけるノニルフェノール化合物の動態、第12回環境化学討論会、講演要旨集、pp112
- 3) 芹沢ら(2003) 東京湾における nonylphenol, octylphenol および bisphenol A の分布、環境ホルモン学会第6回研究発表会、要旨集、pp193
- 4) 日本下水道協会(2002)「下水試験方法(追補暫定版)ー内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編ー」(2002年版)、5 試験方法各論 5-13 ノニルフェノールエトキシレート
- 5) 廣部ら(2003) アルキルフェノールのみを定量可能な ELISA の開発、環境ホルモン学会第6回研究発表会、要旨集、pp69
- 6) 白石寛明ら 国立環境研究所特別研究報告(SR-46), (2002)

Memo

- ・本キットは研究用試薬であり、疾病の診断またはその補助として使用することはできません
- ・使用説明書は予告なく変更する場合があります。