

4. アッセイシステムの内容

このアッセイシステムには、以下に示すものが含まれています。

注意：全ての試薬類は、室温に戻してからご使用ください。使用後は速やかに2~8℃にて保存してください。

No.	品名	容量
①	Antibody coated microtiter plate 抗 PCB #118 抗体固相化マイクロタイタープレート。アッセイに必要な数のストリップ (8 wells/strip) を取り出して使用してください。残りのストリップは添付の plate seal で密封し、袋内に戻して2~8℃にて保存してください。開封後は30日以内に使用してください。	96 well, 12 strip
②	PCB 118 standard 3,3',4'-trichloro-4-methoxybiphenyl, 1,000 ng/mL (PCB #118 換算値) DMSO 溶液。使用前に室温にて完全に融解させ、DMSO で希釈して使用します。希釈系列の調整法は溶液の調整の項目 (p.4) を参照してください。	300 μ L
③	HRP conjugate dilution buffer そのまま使用します。	7mL
④	Competitor-HRP conjugate concentrate HRP 標識競合体原液。使用前に HRP dilution buffer で希釈して使用します。希釈法は溶液の調整の項目 (p.5) を参照してください。	70 μ L
⑤	Wash buffer concentrate 10 倍濃縮洗浄原液。蒸留水あるいは脱イオン水にて希釈して使用します。希釈法は溶液の調整の項目 (p.5) を参照してください。	30mL
⑥	TMB substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine。そのまま使用します。	22mL
⑦	Stop solution 1 N 硫酸。そのまま使用します。	7mL
⑧	Plate seal 必要に応じて、適宜切り取って使用します。	2 枚

5. キット使用上の注意

- ・ PCB は化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法) により第一種特定化学物質に指定されており、その取り扱いには厳しい規制が設けられています。本キットを用いた測定は、PCB 取り扱い可能な設備内で実施してください。
- ・ 関連法規に則り、測定の際に生じる廃液、廃棄物等は厳重な管理をしてください。
- ・ 本製品は、試験研究用に製造されたものです。人、動物の診断目的での使用は絶対にしないでください。また、人体への投与は絶対にしないでください。
- ・ 実験中は適切な保護服を常に着用し、試薬が皮膚や目等に直接触れたり体内に入ることのないよう注意深く取り扱ってください。万一、そのようなことが起きた場合には直ちに大量の水で洗浄するなどし、医師の指示を受けてください。
- ・ 使用する前にラベル表示(品名)を確認してください。
- ・ 試薬取り扱いの際は、新しいチップ・ピペット等を利用してください。
- ・ サンプル、試薬類は分注する前によく攪拌してください。また溶液類には蛋白質、活性剤が含まれているものもありますので、激しい攪拌による過剰な泡化は避けてください。
- ・ 全操作を通じて、プレートの底面や各ウェルの上部には触れないようにしてください。プレート底面の汚れやコンタミネーションにより測定誤差の原因になります。

- ・ スタンダードおよびサンプルは必ず 2 重以上で測定してください。
- ・ アッセイ毎に検量線を作成してください。
- ・ 試薬類のプレートへの分注は、20 分以内で行ってください。
- ・ 洗浄操作は特に重要ですので、必ず完全に、かつ各ウェルとも同じ様に洗浄してください。プレートウォッシャーを使用する際は、使用前にノズルの動きをチェックしてから始めてください。御使用になるプレートウォッシャーの機種によっては、洗浄が不十分になることもありますので、その時は洗浄回数を増やしてください。
- ・ 異なったロットのキット間での試薬の使い回しはしないでください。
- ・ 試薬を加える順番、インキュベーション時間は方法の欄に書かれている内容に従ってください。

6. アッセイ方法

アッセイを始める前に必ずお読みください。

注意 1：操作は全て PCB 取り扱い可能な設備内にて行い、測定の際に生じる廃液、廃棄物等は関連法規に則り厳重な管理をしてください。

注意 2：キットに含まれる全ての試薬を室温に戻してからアッセイを始めてください。特に、TMB substrate は必ず室温に戻してから使用してください。

(1) 必要な器具および試薬

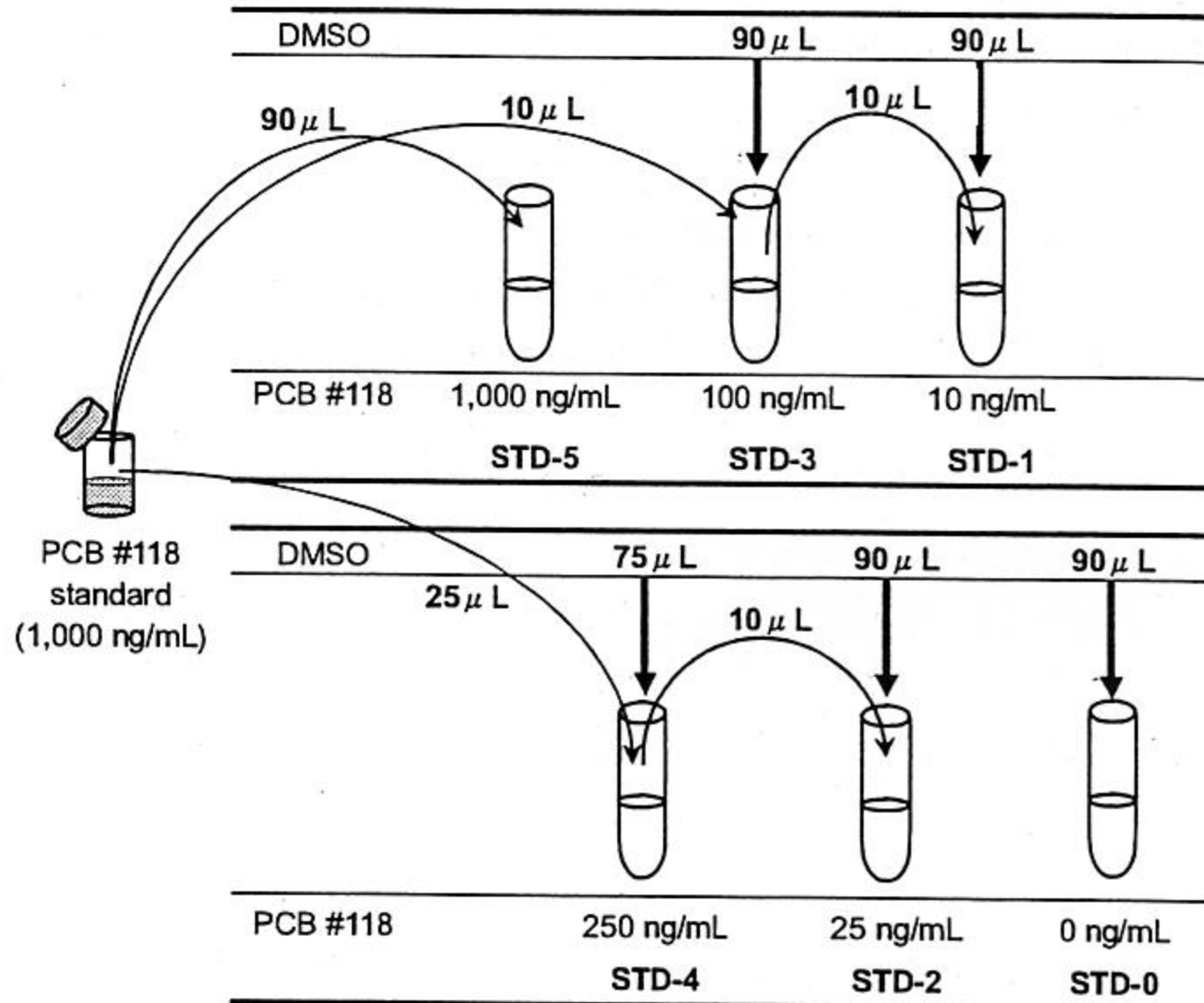
- ・ マイクロピペットおよびチップ (10~100 μ L、100~500 μ L)
- ・ ガラス試験管 (標準液・試料希釈、及び標準液・試料と HRP 標識競合体の混合用)
- ・ メスシリンダー (300mL)
- ・ 蒸留水あるいは脱イオン水
- ・ マイクロプレート用振とう器
- ・ プレートウォッシャー
- ・ ジメチルスルホキシド (DMSO, 生化学用)
- ・ 450nm で測定可能なプレートリーダー

(2) 標準液の調整

注意：標準液調整は、全てガラス製の試験管にて行ってください。プラスチック製の容器で長時間放置した場合、溶液中の PCB が容器壁面に吸着し、測定結果に影響を与える可能性があります。

- ① PCB #118 standard を室温で完全に融解し、試験管ミキサー等で攪拌します。
- ② PCB #118 standard を DMSO で希釈し、1,000 ng/mL, 250 ng/mL, 100 ng/mL, 25 ng/mL, 10 ng/mL, 0ng/mL の希釈系列を調整します。次頁の例は、2 重測定を行った場合、測定 2 回分に相当します。
- ③ 調整した標準液は、試験管ミキサー等で十分攪拌しておきます。
- ④ 調整した標準液の希釈系列を再利用する場合は、蓋付のガラスバイアルに移し、密閉して 2~8°C にて保存してください。その場合、30 日以内にご使用ください。

標準液調整例(2重測定で2回測定分)



(3) HRP 標識競合体溶液の調整

注意：溶液を攪拌する際は、激しく攪拌しすぎて泡化しないよう注意してください。

HRP conjugate dilution buffer 6mLに Competitor-HRP conjugate concentrate を 60 µL 添加し、試験管ミキサー等で軽く攪拌してください。プレートのスプリットを分割使用する場合は、使用量に応じて各試薬量を調整してください（例：4スプリットを使用する場合、2mLの HRP conjugate dilution buffer に 20 µL の Competitor-HRP conjugate concentrate を添加）。

(4) 混合液(標準液と HRP 標識競合体溶液)の調整

注意：混合液の調整は、標準液の調整同様、全てガラス製の試験管を用いてください。

- ① (2)にて調整した標準液または測定試料と(3)にて調整した HRP 標識競合体溶液とを 1:3 の割合で混合し、試験管ミキサー等でよく攪拌します（2重測定の場合は、それぞれ、30 µL と 90 µL を混合）。
- ② 混合液を調整後は、なるべく速やかにプレートへの分注を行ってください。混合後 2 時間までは測定値に影響を与えないことを確認していますが、長時間放置しておくと測定結果に影響を与える可能性があります。

(5) Wash buffer の調整

- ① Wash buffer concentrate (10 倍濃縮洗浄原液) の全量を 300mL のメスシリンダーに移し、蒸留水あるいは脱イオン水を加えて最終容量を 300ml に調製してください。
- ② メスシリンダーにパラフィルム等で蓋をし、転倒混和等でよく攪拌してください。
- ③ 調製後は 2~8°C で保存し、30 日以内にご使用ください。

(6) 測定操作手順

- ① 標準品および測定しようとしているサンプル数に十分な strip (8wells/strip) を用意します。各測定は2重以上で行ってください。
- ② (4)にて調整した標準液と HRP 標識競合体溶液との混合液をそれぞれのウェルに 50 μ l ずつ加えます。
- ③ 同様に、(4)にて調整した測定試料と HRP 標識競合体溶液との混合液をそれぞれのウェルに 50 μ l ずつ加えます。
- ④ プレートをシールで覆い、プレート振とう器を用いて、サンプル溶液が飛散してシールにつかない程度に緩やかに振とうしながら、室温 (20~28 $^{\circ}$ C) で 30 分反応させます。
- ⑤ 反応後、プレートウォッシャーを用いて、(5)にて調整した Wash buffer で 3 回洗浄してください。
- ⑥ 最後の洗浄操作後は、裏返したプレートをきれいな紙タオル等に軽く叩きつけるようにして、残っている液を完全に取り除きます。
- ⑦ 全てのウェルに 50 μ L の TMB substrate を加えます。
- ⑧ 室温(20~28 $^{\circ}$ C)で正確に 20 分間静置します。振とうしないでください。サンプル数が多い場合は、各サンプルの反応時間が一定になるようにご注意ください。
- ⑨ 全てのウェルに 50 μ L の Stop solution を加えます。
- ⑩ 10 分以内に 450nm の吸光度を測定します。

7. 測定値の算出法

標準曲線を元に、試料中の PCB 濃度を算出します。

注意 1 : 標準曲線は、測定ごとに作成してください。

注意 2 : 定量範囲を越えた高濃度の試料は、DMSO にて適宜希釈して再度測定しなおしてください。その場合、10~20 倍の段階希釈液 (例 : x 10, x 100, x 1,000 等) で行うことにより、定量範囲内に収まります。

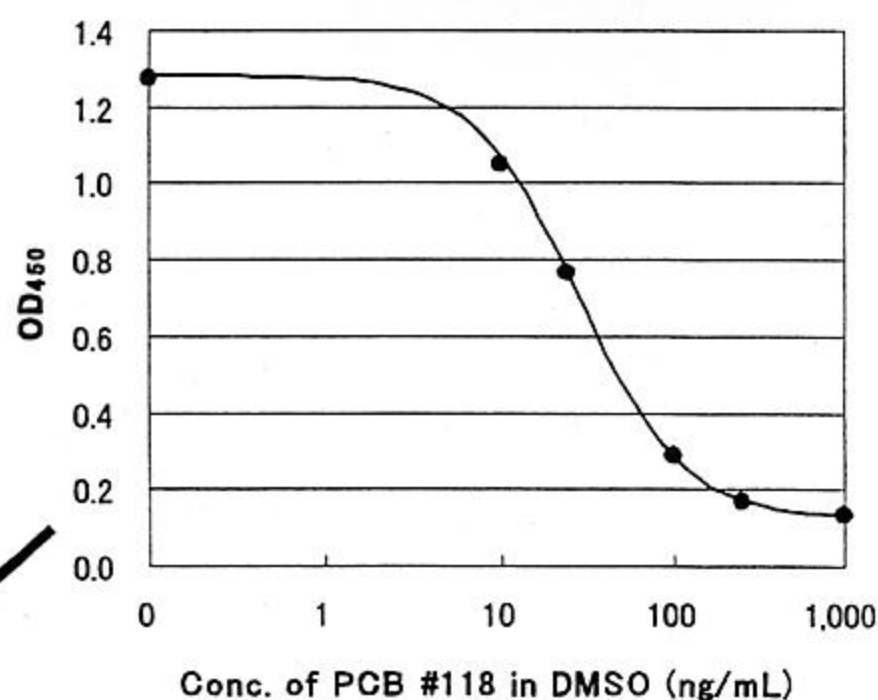
(1) 算出例

- ① 標準曲線を 4 parameter logistic model にて回帰した例を示します。

Four parameter logistic model

$$Y = \left(\frac{A - D}{1 + \left(\frac{X}{C} \right)^B} \right) + D$$

X : サンプル中 (DMSO 溶液) の PCB 濃度
Y : サンプルの吸光度 (OD₄₅₀)
A : Zero standard (0ng/mL) における吸光度
B : 変曲点における曲線の傾き
C : 50%阻害の起こる PCB 濃度
D : PCB 飽和濃度における吸光度



$$Y = \left(\frac{1.29 - 0.128}{1 + \left(\frac{X}{28.1} \right)^{1.46}} \right) + 0.128$$

* SOFTmax (Molecular Devices Corp.) にて解析

- ② サンプルの測定値を回帰式に代入して得られる濃度に、希釈倍率、濃縮倍率を掛け合わせるにより、試料中の PCB 濃度を算出します。

<算出例>

- ・ 20g の試料から PCB を抽出し前処理後、100 μ L の DMSO に置換。