

研究用試薬エコロジーナ®
陰イオン界面活性剤
LAS ELISA キット
(マイクロプレート)
使用説明書

前文

陰イオン界面活性剤直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)は、国内で年間約 15 万トン生産され¹⁾、水道水質基準で 0.2mg/L 以下に規制されている陰イオン界面活性剤の大部分を占めています。LAS の生分解性は比較的良好で人体への毒性もあまり高くありませんが、起泡性が高いため水道水質の管理上、監視の必要性が指摘されています。

環境水中の陰イオン界面活性剤測定法として、水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法(平成15年7月22日厚生労働省告示第261号、別表第24)では高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法が採用されていますが、この方法は抽出・濃縮操作を必要とします²⁾。

本品は、酵素免疫定量法(ELISA 法)により、環境水中の LAS を高感度かつ簡便に測定できるキットで、HPLC 法とも良好な相関が確認されています^{3)、4)}。

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 LAS を特異的に検出・測定できます。
2. 定量範囲は 0.02-1mg/L(ppm)と高感度です。
3. 試料水の前処理はろ過だけで簡便です^{注)}。
4. 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。
5. 有機溶媒の使用量を低減できます。
6. 測定試料の調製から定量まで 2.5 時間で完了します。
7. 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) 測定対象により固相抽出等のクリーンアップ・濃縮が必要な場合があります。

測定原理 (競合 ELISA 法)

1. 競合反応
LAS(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、LAS に発色用酵素(ペルオキシダーゼ)を結合させた試薬(抗原酵素複合体)をマイクロプレートに加え、競合反応させます。
2. 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。LAS 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 LAS 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 LAS 濃度を定量します。

キット構成内容

No.	品名	容量	数量	保存温度条件
①	抗LAS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	LAS標準原液(C12, 10mg/L 10%メタノール溶液)	4mL	1本	2~8°C
③	抗原酵素複合体粉末	7mL用	2本	2~8°C
④	抗原酵素複合体溶解液(白キャップ)	8mL	2本	2~8°C
⑤	6倍濃縮洗浄液	50mL	1本	2~8°C
⑥	発色基質溶液	250 μ L	1本	2~8°C
⑦	発色基質希釈液(赤シール)	15mL	1本	2~8°C
⑧	発色停止液(黒キャップ)	15mL	1本	2~8°C
⑨	混合用マイクロプレート	96 well	1枚	室温
⑩	プレートシール		1枚	
⑪	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: アトバンテック社製、品番 36481047, 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: ギ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))
- 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)(例: コーニングコースター社製、品番 2578)
- 8 メタノール(高純度品の使用をお勧めします。)

● 固相抽出による濃縮が必要なとき ●

1-8 は共通

- 9 固相カートリッジ(例: J. T. Baker SPE カラム C18、品番 562-20014、和光純薬工業(株) 取扱い 例: Sep-Pak PS-2 N20131 Waters 取扱い)
- 10 1M 酢酸緩衝液(pH5)
- 11 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 分程度放置して、室温に戻してください。
- 異なるキットの試薬を組み合わせず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適切な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(ろ過など)

濁りのない試料 メタノールを添加し、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、ろ紙上の残渣は試料量の 10%のメタノールで洗浄します。洗浄液をろ液に合わせて 10%(V/V)メタノール溶液とし、これを検液とします。

LAS が低濃度の試料 上水試験方法(2001)に準じ、溶出溶媒にメタノール、固相カラムを用いて濃縮し、検液とします。

【固相抽出の例】^(文献)

- ① 1M 酢酸緩衝液 (pH5) を用い、試料(ろ液)の pH を 5 に調整します。
- ② メタノールおよび蒸留水であらかじめコンディショニングした固相(C18)カートリッジに、1)で調製した試料を通水します。試料通水時は、器壁への吸着を避けるため、チュービングの使用は避け、注射筒等を使用することをおすすめします。
- ③ 蒸留水で洗浄後、メタノールにより溶出します。
- ④ 窒素パージ(窒素ガス吹き付け)等により溶媒を除去します。
- ⑤ メタノールに溶解後、蒸留水を加えて、最終メタノール濃度を 10%とします。

※本前処理は、APE ELISA キットおよびAE ELISA キットと併用可能です。

2. LAS標準液の調製

1)「②LAS標準原液」の 10 倍希釈

!! 重要 !!

「②LAS標準原液(10mg/L)」を 10%メタノールで 10 倍に希釈し、「1mg/L LAS標準液(10%メタノール溶液)」を調製します。

2) LAS 標準液の調製

10倍希釈した LAS 標準液と 10%メタノール溶液を用いて、LAS 標準液を調製します。

【調製例】

調製標準液	(mg/L)	1.0	0.1	0.02	0
10%メタノール	(μ L)	0	900	980	1000
<u>1mg/L LAS 標準液</u>	(μ L)	1000	100	20	0
調製液量	(μ L)	1000	1000	1000	1000

※10倍希釈を省略し、「②10mg/L LAS標準液」を直接10%メタノールで希釈すると、ブランク以外すべての標準液が10倍高濃度となるためLAS=0以外の吸光度が全て低くなります。標準液作成時には必ず10倍希釈を行ってください。

※1mg/L LAS標準液調製時は、LASの壁面への吸着を防止するため、必要な濃度への希釈は必ず段階とし、1)10%メタノール、2)「②10mg/L LAS標準液」の順で混合してください。

※各濃度の標準液を作成する場合は、必ず10%メタノール溶液を先に分注し、1mg/L LAS標準液を後から添加してください。添加順序を逆にすると、標準曲線を正確に作成できない場合があります。

※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皿をおすすめします。

※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。

※LAS標準液中のメタノールが揮散しますので、分取後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LAS標準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：布や紙に吸取り、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)」(8mL/本)のうち7mLを加えて溶解し、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本同時に使用する時は、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

「⑨混合用マイクロプレート」を用いて、抗原酵素複合体溶液 100 μ L/well に測定試料または各濃度の LAS 標準液(いずれもメタノール濃度:10%) 100 μ L/well を添加し、混合液を調製します。

※LASの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LAS標準液を後に分注してください。添加順序を逆にすると、標準曲線を正確に作成できない場合があります。

※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。

※LAS濃度0の場合は10%メタノールを用いてください。

5. 抗原抗体反応

室温に戻した「①抗 LAS モノクローナル抗体固相化マイクロプレート」に4. で調製した混合液を 100 μ L/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。

「⑩プレートシール」を表面に貼り、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数だけ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。未使用部分は凍結剤とともにチャック付き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。

※測定誤差の原因になりますので、分注する際は泡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の保時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。

※特に検体数が多い場合は、各検体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 μ L/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。

※3回目の洗浄液を満たした状態で、次の「発色試薬」を調製すると効率的です。

※測定誤差の原因になりますので、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になりますので、触れないように注意してください。

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

8. 発色試薬の調製

「⑥発色基質溶液」と「⑦発色基質希釈液(赤シール)」を1:100の割合で混合し、発色試薬を調製します(例:12mLの「⑦発色基質希釈液」に120 μ Lの「⑥発色基質溶液」をチップの先で混合しながら添加)。

※使用前(15分以内)に調製してください。

※発色基質希釈液を先に分注し、その後、発色基質溶液を混合してください。

※1回の測定に必要な量だけ分取し、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。

※希釈後の発色試薬は保存使用できません。

9. 発色反応

8. で調製した発色試薬を100 μ L/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、「⑧発色停止液(黒キャップ)」を100 μ L/well添加します。

※23°Cの保時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。

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

※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。

10. 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 LAS 濃度を算出します。検液中の LAS 濃度より、次式を用いて試料中の LAS 濃度を算出します。

$$\text{試料中の LAS 濃度}(\mu\text{g/L}) = \text{検液中の LAS 濃度}(\mu\text{g/L}) / 0.9 / \text{濃縮倍率}$$

(係数 0.9 は、添加した 10%(V/V)メタノール由来の補正係数)

- ※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。

■LAS 濃度算出方法■

方眼紙利用:

LAS 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。

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

標準液の LAS 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 LAS 濃度を算出します。

(測定例)

Standard OD or B/B0%

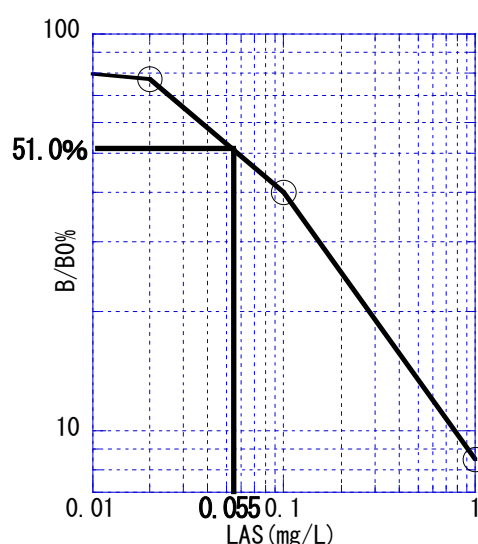
LAS(mg/L)	OD	B/B0%
0	1.312	100
0.02	1.010	77
0.1	0.525	40
1.0	0.105	8

方眼紙からの読み取り例

LAS (mg/L)	OD	B/B0%
0.055	(0.669)	51.0

Log-Log Graph Paper Calculation

LAS=0.055(mg/L) from B/B0%=51.0%



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 LAS 濃度を算出します。

データ処理ソフトウェアの例

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

測定サンプル数(例)

添付の「①抗LAS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があります。

例1)一括測定: LAS標準液として4系列(0, 0.02, 0.1, 1.0mg/L)を使用
 LAS標準液として4系列をn=2で使用すると、残りのwell数は88となりますので、44サンプル(n=2)を一度に測定することができます。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
B	0.02	0.02	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
C	0.1	0.1	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
D	1.0	1.0	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
E	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
F	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
G	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43
H	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36	S44	S44

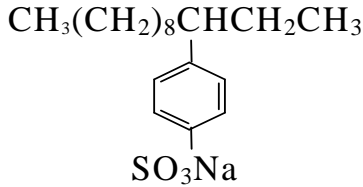
例2)二分割測定: LAS標準液として4系列を使用 (n=2)

一回当たりの検体数が20以下の場合、二分割での測定が可能です (n=2)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	S5	S5	S13	S13	0	0	S5	S5	S13	S13
B	0.02	0.02	S6	S6	S14	S14	0.02	0.02	S6	S6	S14	S14
C	0.1	0.1	S7	S7	S15	S15	0.1	0.1	S7	S7	S15	S15
D	1.0	1.0	S8	S8	S16	S16	1.0	1.0	S8	S8	S16	S16
E	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S1	S1	S9	S9	S17	S17
F	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S2	S2	S10	S10	S18	S18
G	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S3	S3	S11	S11	S19	S19
H	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S4	S4	S12	S12	S20	S20

LAS の構造と抗体の交差反応性

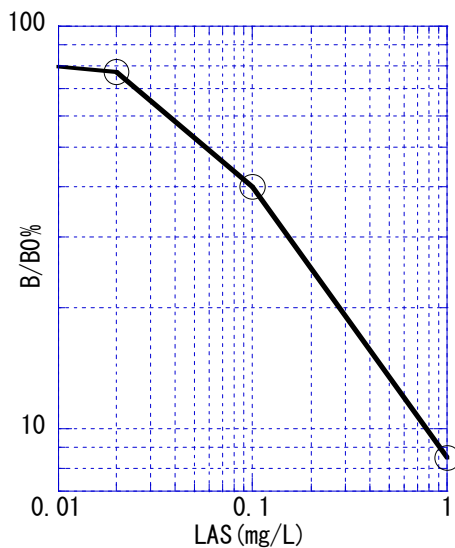
標準品:ドデシルベンゼンスルホン酸



化合物	交差反応性(%)
直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS C12)	100
ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)	1.0
ミリスチン酸ナトリウム(C14)	0.3
ラウリン酸ナトリウム(C12)	0.1
トリパンプルー	0.1
スルホフェニル吉草酸	<0.1
スルホコハク酸ラウリル-2-ナトリウム	<0.1
ベンゼンスルホン酸	<0.1
フェノール	<0.1
トルエン	<0.1
キシレン	<0.1
ノニルフェノールエトキシレート(EO = 10)	<0.1
ポリオキシエチレンソルビタンラウリン酸エステル(EO = 20)	<0.1
パルミチン酸ナトリウム(C16)	<0.1
ステアリン酸ナトリウム(C18)	<0.1

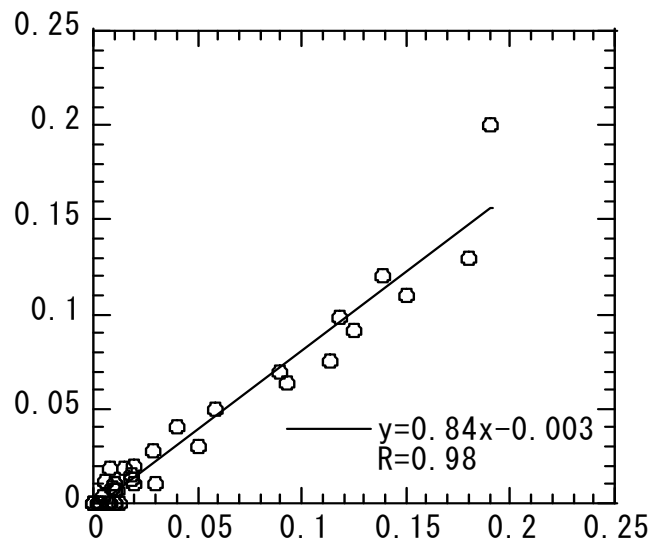
抗 LAS モノクローナル抗体は、他の界面活性剤には交差反応せず、LAS に対する高い特異性を有しています。

LAS 標準曲線



定量範囲は 0.02~1mg/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。

HPLC との比較



【参考文献】

- 1) 界面活性剤等統計年報、日本界面活性剤工業会 (2001)
- 2) 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法(平成15年7月22日厚生労働省告示第261号、別表第24)
- 3) 郷田泰弘ら: 第48回全国水道研究発表会講演集 (1997)
- 4) Fujita et al, Environ. Sci. Technol. **32** (8), 1143-1146 (1998)
- 5) 小林綾子ら: 「界面活性剤用 ELISA の開発」第52回全国水道研究発表会講演集578-579(2001)

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。