酵素法による 下痢性貝毒 簡易検査キット

DSP *Fast Assay*

96 反応 ：3251PR0110

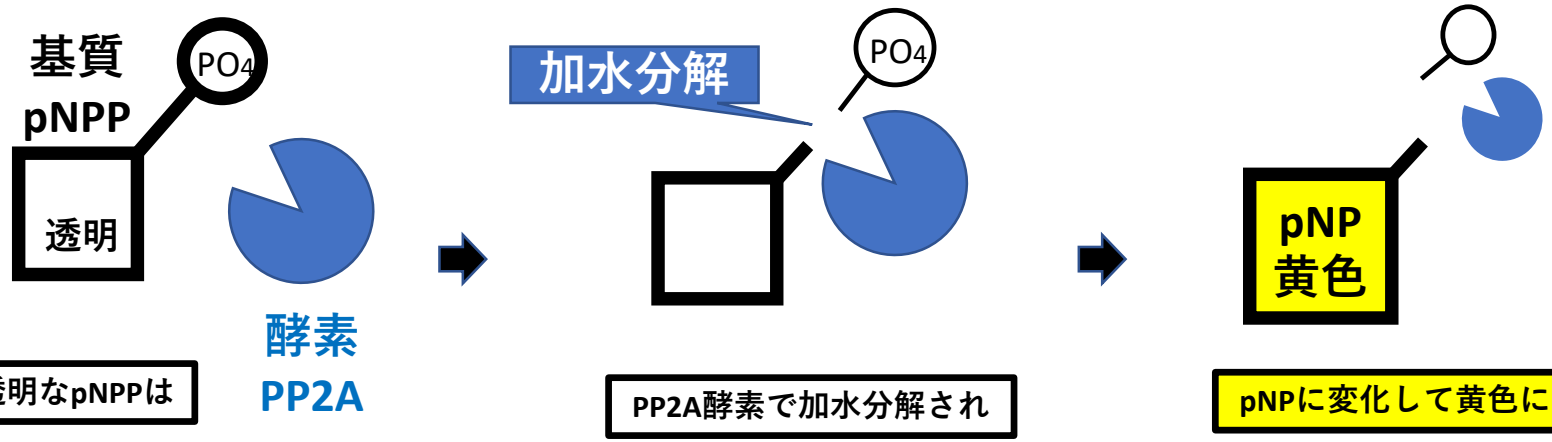
株式会社プラクティカル

仕組みと操作概略

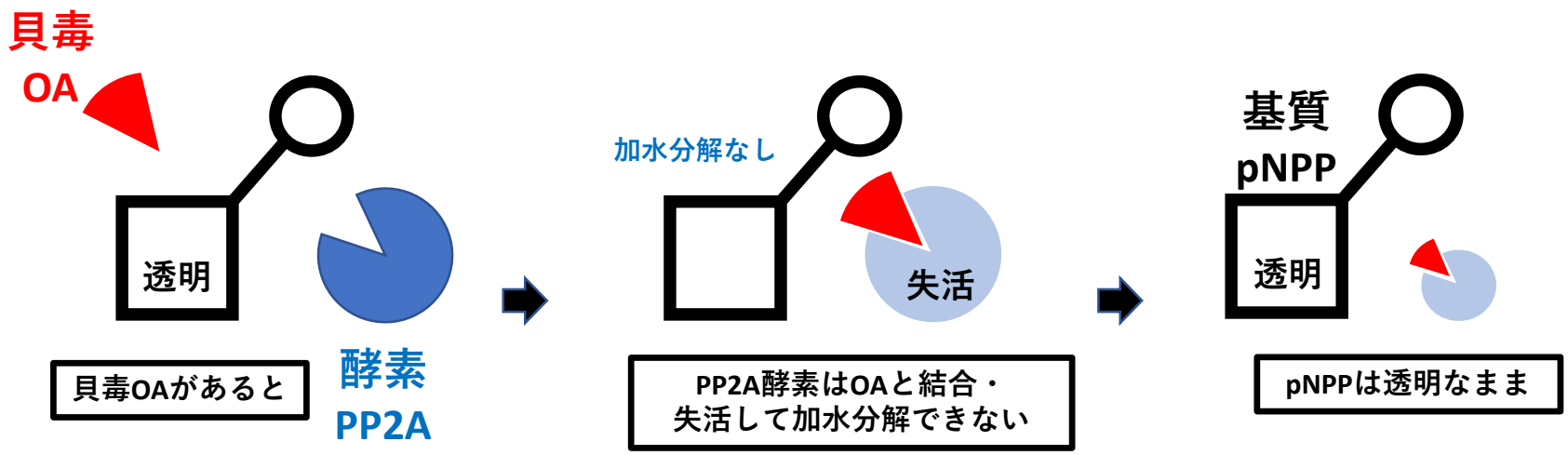
rev.200401

アッセイ原理

試料中に貝毒OAが無い場合

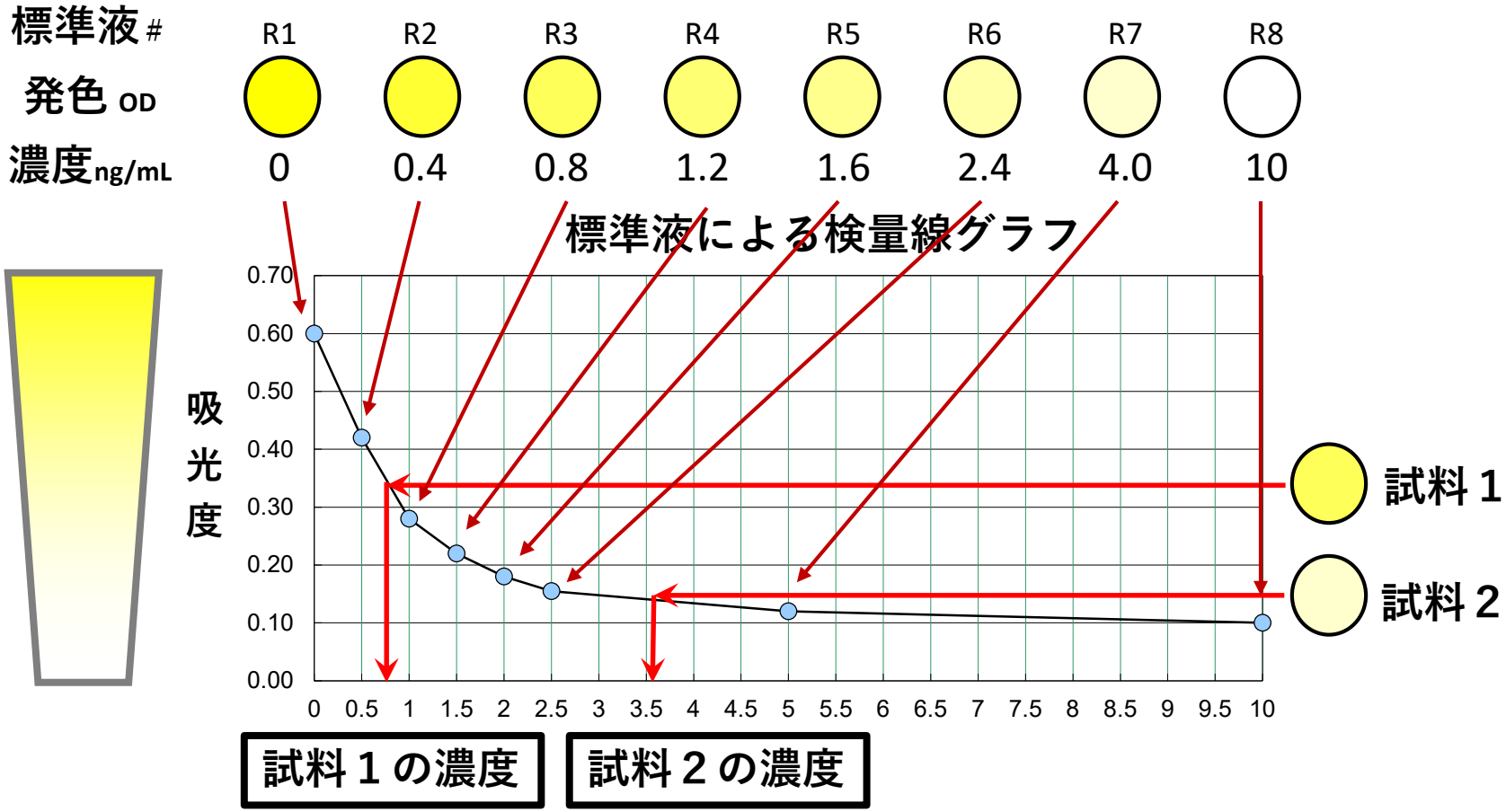


試料中に貝毒OAが有る場合



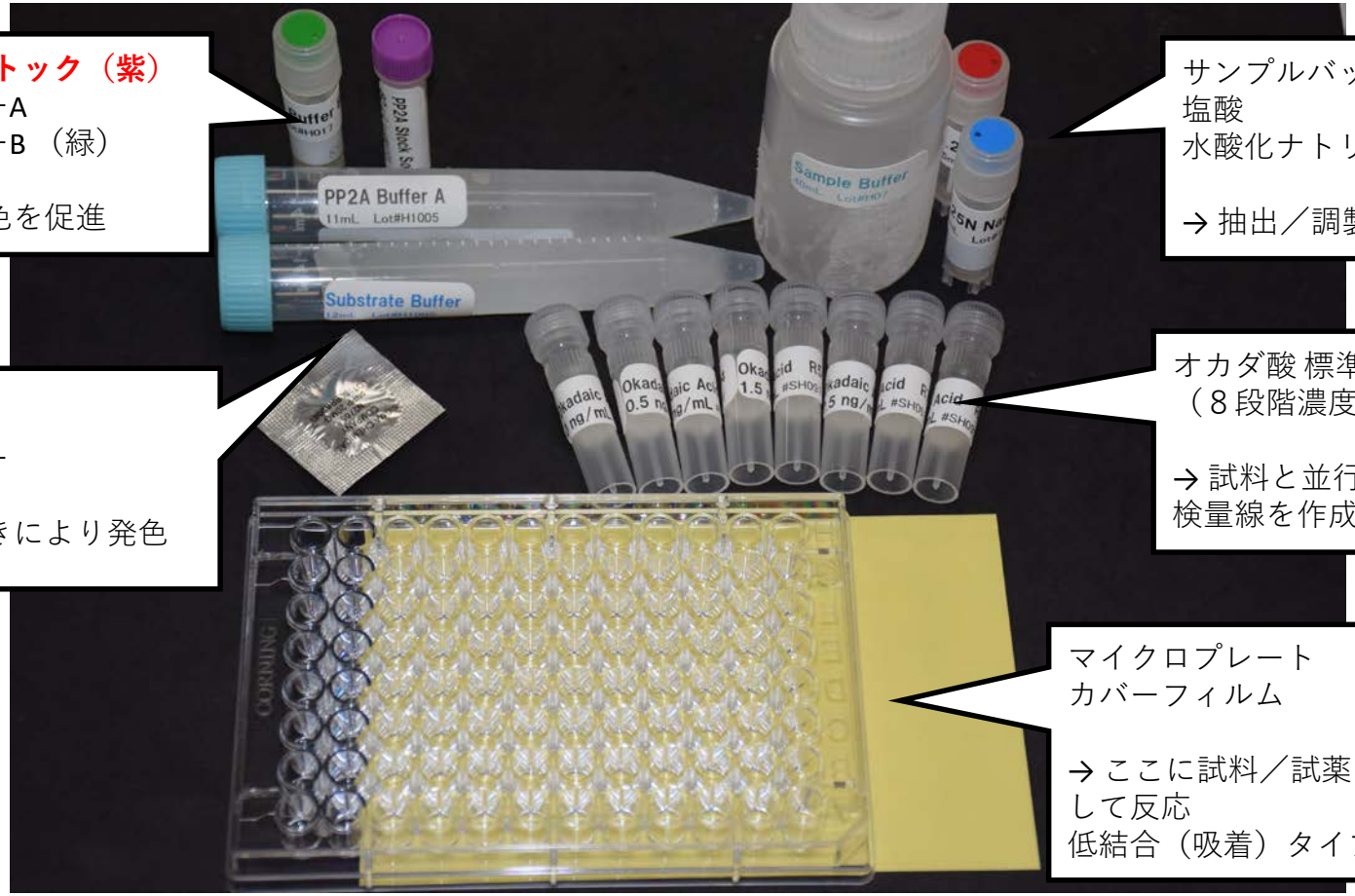
定量の仕組み

貝毒OAの濃度によって発色の程度（吸光度）が異なります。
段階的な濃度のOA標準液を同時に測定し、検量線グラフを描きます。



試料の発色（吸光度）を同時に測定し、検量線グラフにあてはめて濃度を換算します。

キット内容



PP2A 酵素 ストック（紫）
同 バッファーA
同 バッファーB （緑）

→ 基質の発色を促進

サンプルバッファー
塩酸
水酸化ナトリウム

→ 抽出／調製に利用

基質（錠剤）
同 バッファー

→ 酵素の働きにより発色

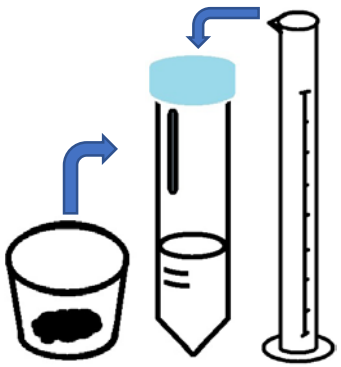
オカダ酸 標準溶液
（８段階濃度）

→ 試料と並行測定し、
検量線を作成

マイクロプレート
カバーフィルム

→ ここに試料／試薬を滴下
して反応
低結合（吸着）タイプ

試料の前処理

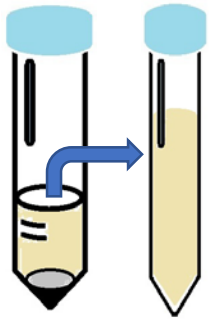


均質化 中腸腺 2g
90%ﾒﾀﾉｰﾙ 18mL

振とう
1分間

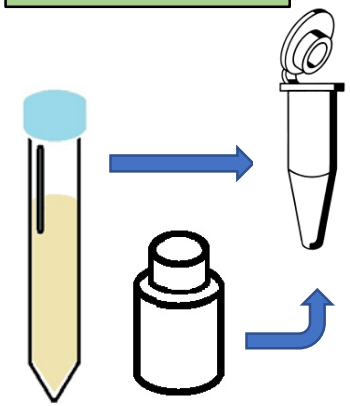
遠心分離
2,500xG 10分

抽出液



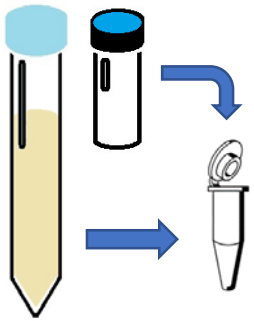
上清＝抽出液
冷凍保存

Free OA 試料液
OA,DTX1,DTX2



試料バッファー950μL
抽出液 50μL

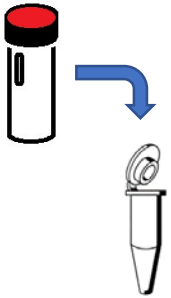
Total OA 試料液
Free OA + DTX3



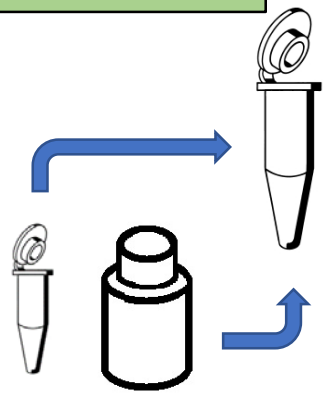
抽出液 500μL
NaOH 100μL

加熱
80℃ 40分

放冷後
スピンダウン

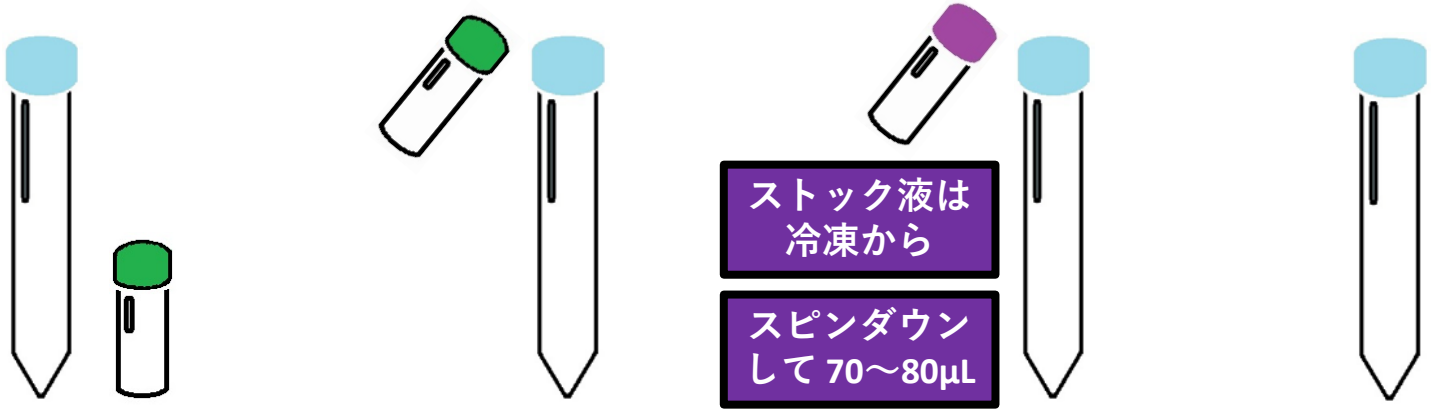


中和
HCl 100μL



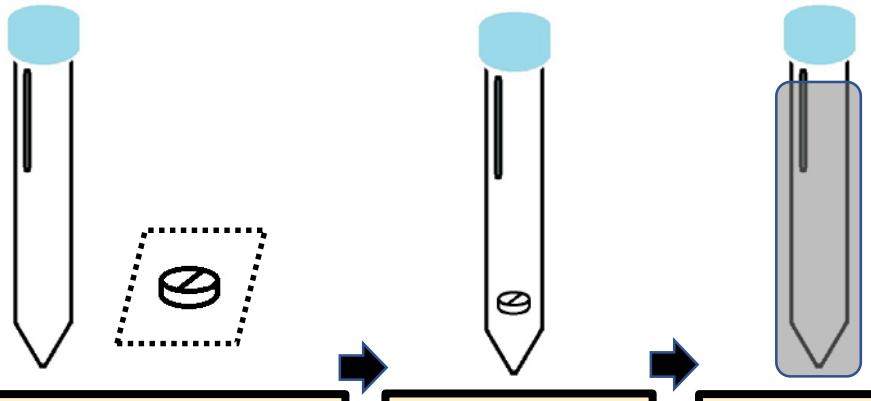
試料バッファー950μL
加水分解中和液 50μL

試薬の準備ー酵素液



PP2A酵素用 A＆B
バッファーを解凍 → やさしく
混合 → やさしく
混合 → PP2A酵素液
冷蔵で２時間以内

試薬の準備ー基質液

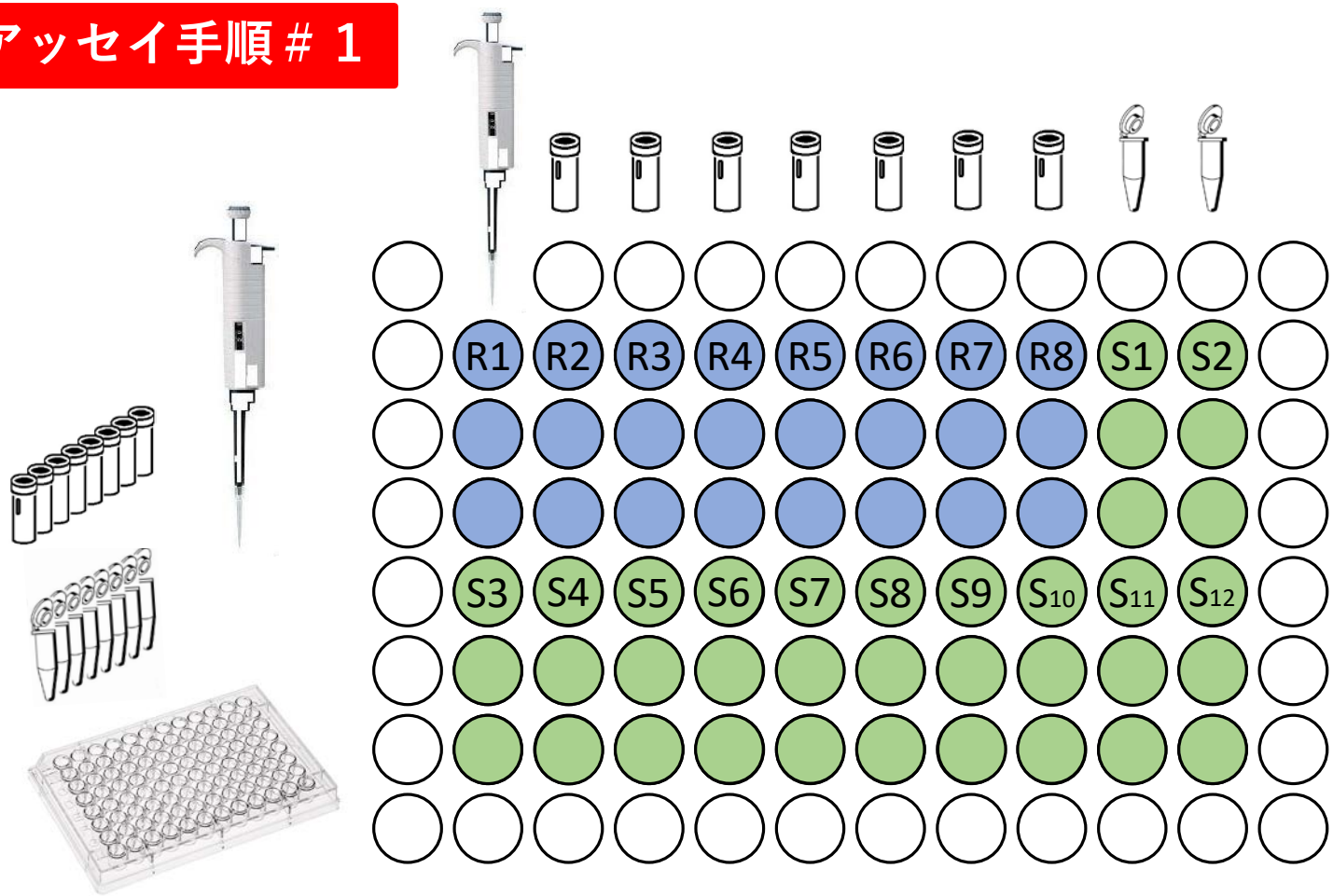


pNPP基質タブと
基質用バッファーを解凍 → ボルテックス
溶解混合 → pNPP基質液
遮光・冷蔵

試薬の準備ー標準液

標準液セット
解凍

アッセイ手順＃１

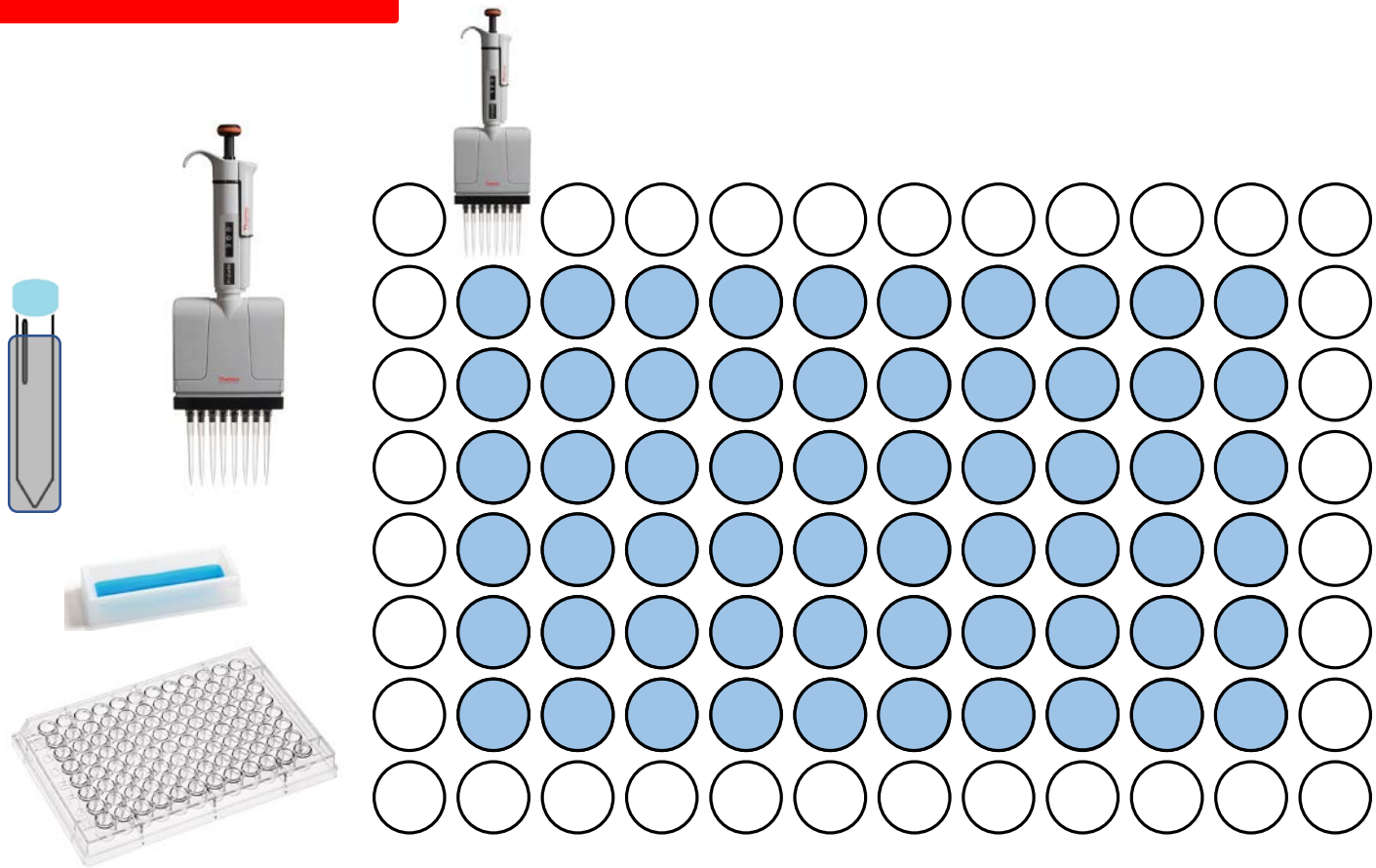


OA標準液 R1～R8（50μL）を順番に滴下します（３ウェル推奨）

試料液 S1～Sn （50μL）を順番に滴下します（２～３ウェル推奨）

チップは標準・試料の種類ごとに、付け替えてください。
より精密に測定するには、最端列を使用しない事を推奨。

アッセイ手順＃２

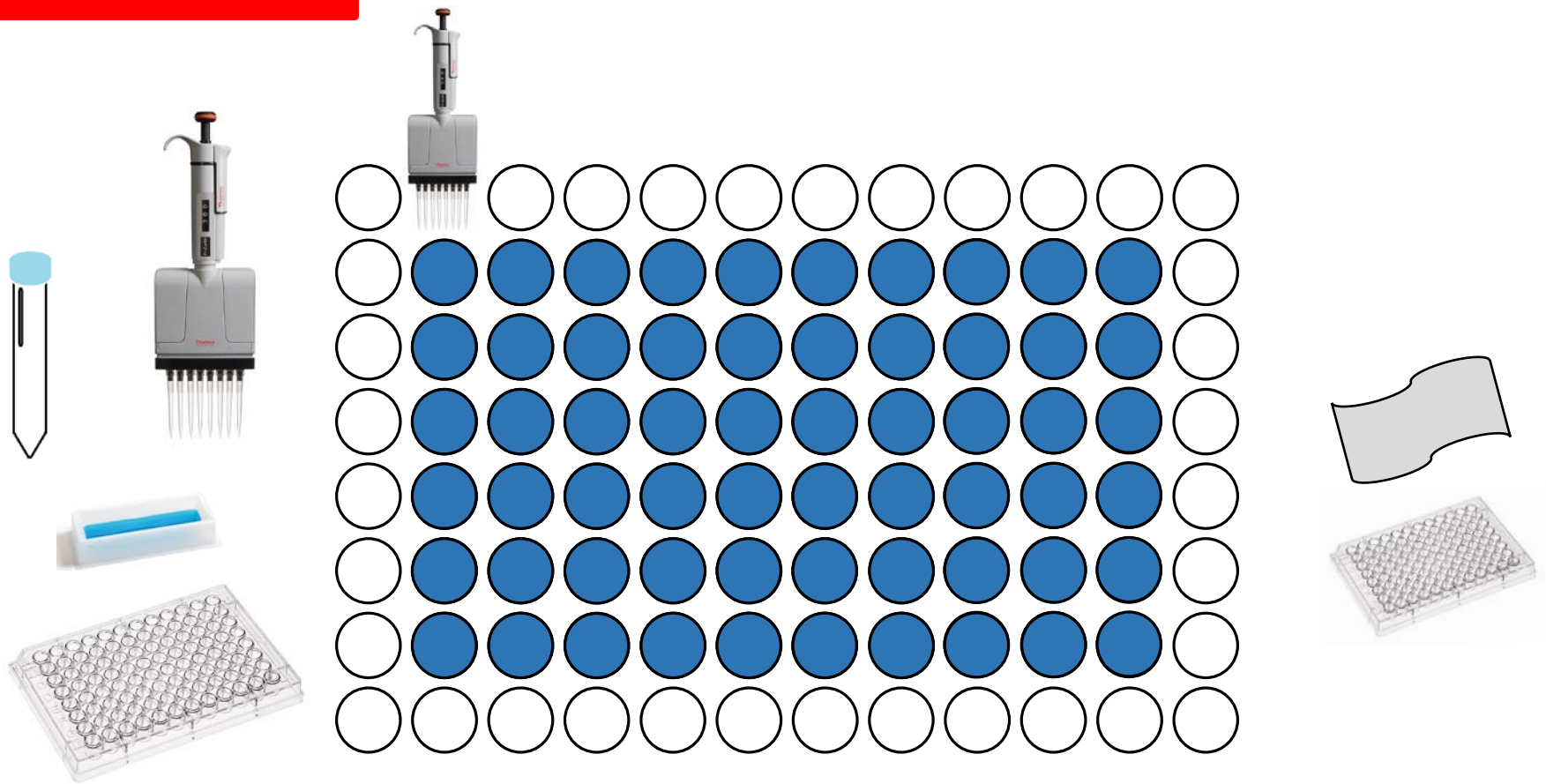


基質液（Substrate）（100μL）をすべてに滴下します

時間差をなくすために、マルチチャネルピペットを用います

プレートを水平方向に回すようにして、軽く混合します。

アッセイ手順＃３

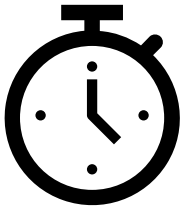


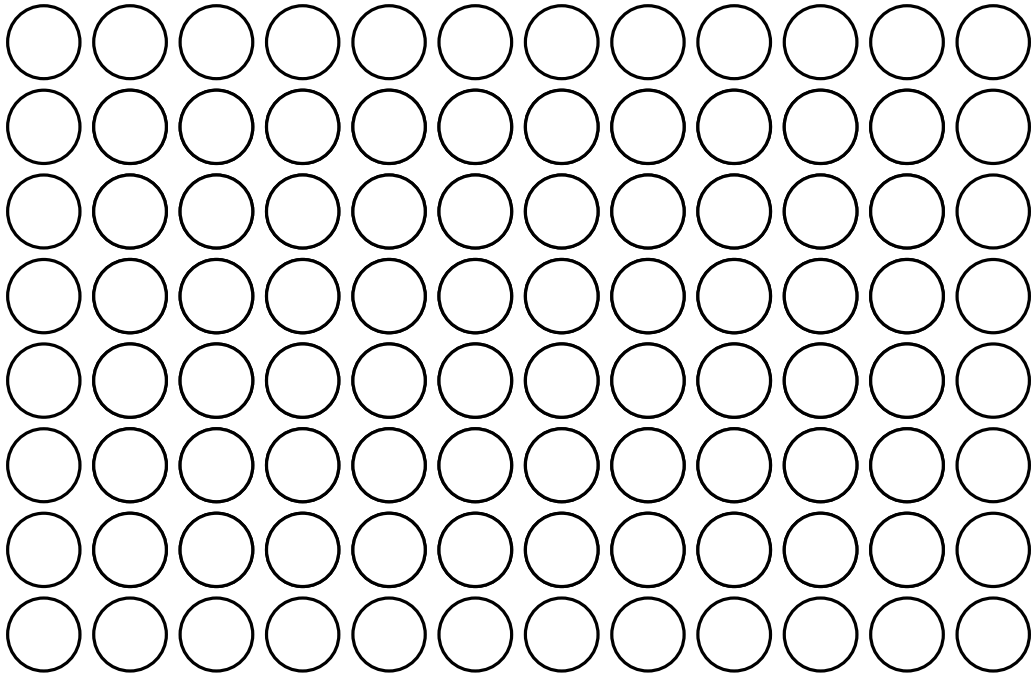
酵素液（PP2A）（100μL）をすべてに滴下します

時間差をなくすために、マルチチャネルピペットを用います

プレートにフィルムをかぶせてから、１分間水平方向に回しながら混合します。（プレートミキサー推奨）

アッセイ手順＃４





プレートを３６℃で３５～４０分間インキュベート

終了後、フィルムをはがし、吸光度（405nm(副492nm)）を測定

アッセイ手順＃5

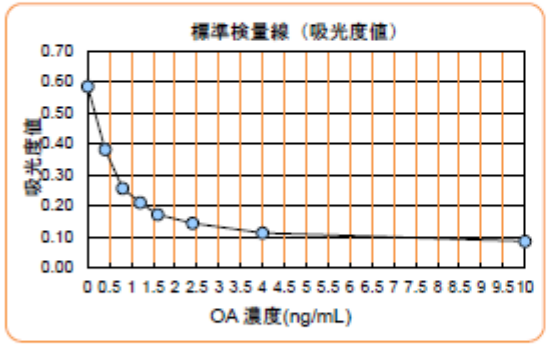
DSP *Rapid* Kit

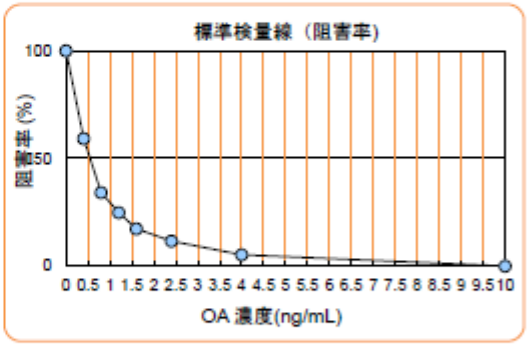
下痢性貝毒簡易検査キット

Kit ロット	試験日	設定温度	恒温時間	試験室	備考1
	時刻	同実測温度		担当者	備考2

吸光度値：主405nm 副492nm

OA 標準液 (ng/mL)	R1 0	R2 0.4	R3 0.8	R4 1.2	R5 1.6	R6 2.4	R7 4.0	R8 10.0
ウェル1	0.584	0.387	0.255	0.210	0.173	0.148	0.111	0.086
ウェル2	0.588	0.381	0.256	0.213	0.172	0.141	0.114	0.088
ウェル3	0.586	0.380	0.261	0.211	0.175	0.146	0.115	0.087
平均	0.586	0.383	0.257	0.211	0.173	0.145	0.113	0.087
相対標準偏差(rsd%)	0.3%	1.0%	1.2%	0.7%	0.9%	2.5%	1.8%	1.1%
阻害率 (%)	100.0	59.3	34.1	24.9	17.3	11.6	5.3	0.0
標準偏差	0.002	0.004	0.003	0.002	0.002	0.004	0.002	0.001



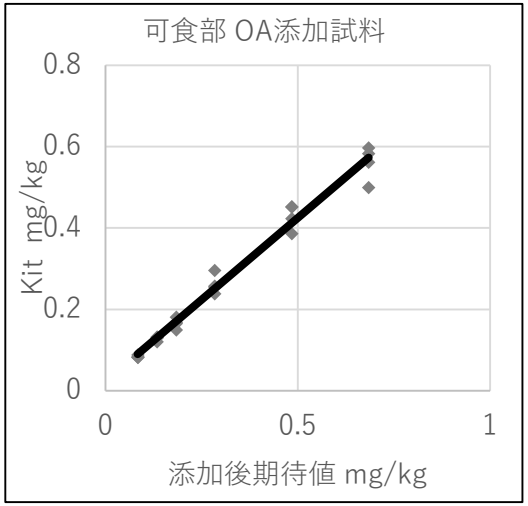


試料名	加水分解の有無 ＊2	ウェル1 吸光度値	ウェル2 吸光度値	ウェル3 吸光度値	平均	相対標準偏差(rsd%)	試料中濃度 (μg/g) ＊1
1		0.610	0.600	0.598	0.6027	1.1	<LOQ
2		0.420	0.418	0.420	0.4193	0.3	<LOQ
3		0.290	0.296	0.288	0.2913	1.4	0.14
4		0.280	0.272	0.279	0.2770	1.6	0.15
5		0.154	0.155	0.158	0.1557	1.3	0.42
6		0.125	0.135	0.121	0.1270	5.7	0.66
7		0.120	0.121	0.120	0.1203	0.5	0.73
8		0.117	0.119	0.119	0.1183	1.0	0.75
9		0.118	0.125	0.118	0.1203	3.4	0.73

吸光度データをＰＣの専用シートで解析して、濃度換算

測定範囲と試験例

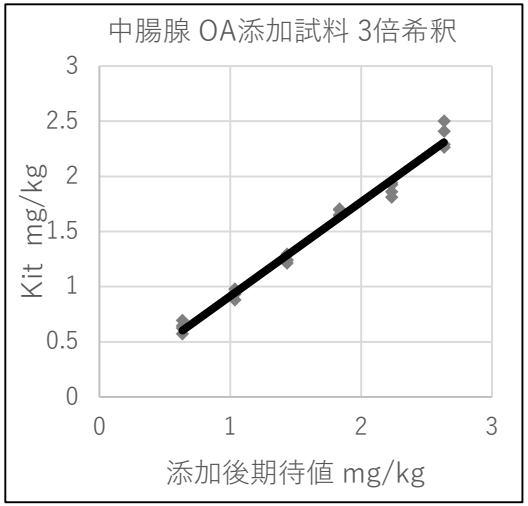
OA 標準液	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
OA標準液の濃度 (ng/ml)	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.4	4.0	10.0
所定の前処理において相当する試料中濃度（たとえば可食部試料の試験）								
Total OA濃度 (mg/kg) （x280）	0	0.11	0.22	0.34	0.45	0.67	1.12	2.80
上記を中腸線中の濃度とし、かつ中腸腺の可食部における割合を10%と仮定した場合の可食部中濃度								
Total OA濃度 (mg/kg) （÷10%）	0	0.01	0.02	0.03	0.05	0.07	0.11	0.28



中腸腺を試料とした場合、可食部中0.16mg/kgの規制値は、検量線で標準液のR7とR8の間に相当します。
従って規制値付近での測定を正確に行うには、検体抽出液を追希釈して、検量線の中間域で試験してください。
例えば、検体抽出液を3倍希釈した後、所定のアッセイを行うと、次のような濃度関係になります。

OA 標準液	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
OA標準液の濃度 (ng/ml)	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.4	4.0	10.0
抽出液を3倍希釈した後、所定の前処理において相当する試料中濃度								
Total OA濃度 (mg/kg) （x840）	0	0.34	0.67	1.01	1.34	2.02	3.36	8.40
上記を中腸線中の濃度とし、かつ中腸腺の可食部における割合を10%と仮定した場合の可食部中濃度								
Total OA濃度 (mg/kg) （÷10%）	0	0.03	0.07	0.10	0.13	0.20	0.34	0.84

この場合可食部中0.16mg/kgの規制値は、検量線標準液のR5とR6の間に相当します。



抽出液を適宜希釈することで、目的の範囲で定量できます