

マイクロプレートシール性能評価試験  
ーコンタミ防止ー

株式会社 バイオクロマト



PinPoint Solution  
bio chromato

URL : <http://www.bicr.co.jp>  
お問い合わせ : [info@bicr.co.jp](mailto:info@bicr.co.jp)

# 要約

4種類のプレートシールのウェル間のコンタミ防止レベルを24時間振盪（1000rpm）で、評価したところABCフィルム以外のプレートシールは、ウェル間のコンタミネーションを防止していることが明らかになった。

## 1. 目的

研究開発現場で実際に使用されている市販のマイクロプレートシールについて、コンタミ防止レベルを評価した。

## 2. 方法

下記の4種類の市販マイクロプレートシールについて、コンタミ防止レベルを評価した。

- ・RAPID EPS（略称：EPS）
- ・ABCフィルム（略称：ABC）
- ・市販有機溶媒耐性アルミシール（略称：ALM）
- ・市販有機溶媒耐性樹脂製シール（略称：TAT）

## 3. コンタミ防止レベルの評価

混合すると発色するI液、II液を市松模様状に分注したマイクロプレートにマイクロプレートシールを貼付したものを、40℃で24時間振盪（1000rpm）インキュベートした。振盪インキュベーション前後の吸光度変化を測定し、コンタミ防止レベルを評価した。

I液：Fe<sup>2+</sup>溶液

硫酸第一鉄アンモニウム六水和物 18.0g  
アスコルビン酸 2.0g  
純水 100ml

II液：フェナントロリン溶液

1,10-フェナントロリン一水和物 2.0g  
酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.6) 100ml

酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.6)













酢酸ナトリウム 13.6g  
氷酢酸でpH調整し、純水で100mlに定容

隣り合ったウェル間でコンタミネーションが生じてI液とII液の混合が起きると、Fe<sup>2+</sup>イオンとフェナントロリンが酸性条件下で赤色の錯体が形成される。その錯体形成を540nmにおける吸光度変化で検出した。

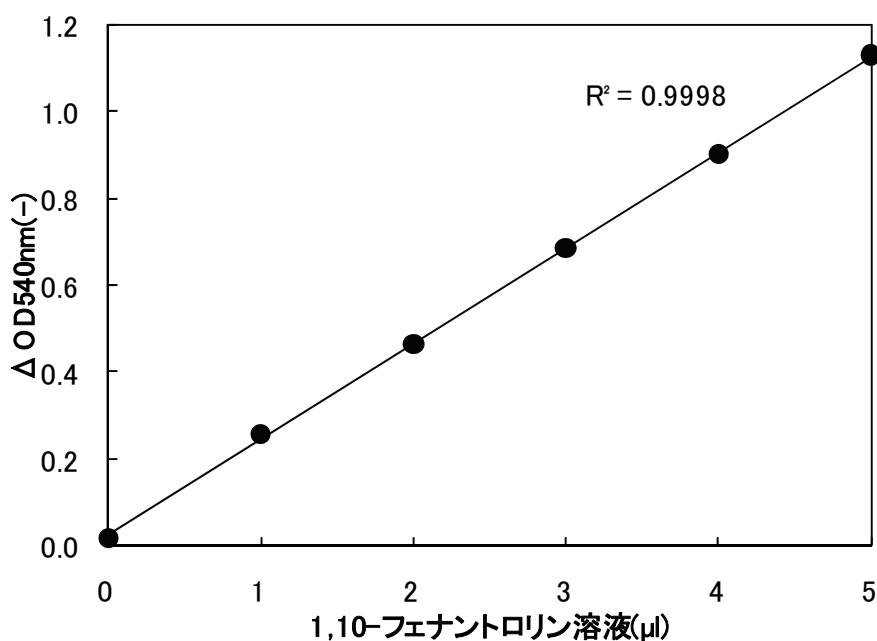
マイクロプレートは、96ウェルアッセイプレート（3881-096、材質：PS、平底、ウェル容量：0.35ml）を用いた。下図の通り、各ウェルに300μlずつ各溶液を分注した。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液
B	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液
C	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液
D	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液
E	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液
F	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液
G	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液
H	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液	II液	I液

コンタミネーションが生じた時の色の変化を下表に示す。

	I液：Fe <sup>2+</sup> 溶液 添加量	II液：フェナントロリン溶液 添加量
	300μl	0μl
	0μl	300μl
	300μl	1μl
	1μl	300μl
	300μl	2μl
	2μl	300μl
	300μl	3μl
	3μl	300μl
	300μl	4μl
	4μl	300μl
	300μl	5μl
	5μl	300μl

I液のウェルにII液を添加した時の吸光度OD 540 nmの変化は下図のようになった。



1μl 足らずのII液がI液のウェルにコンタミしただけでOD 540 nmは0.2上昇することが見て取れる。II液のウェルにI液がコンタミする場合は、I液、II液のモル濃度の比から、約0.1μlのI液がII液のウェルにコンタミするとOD 540 nmが0.2上昇することが分かった。

これらのことから、振盪インキュベート前後の吸光度変化(ΔOD 540 nm)が0.2以上だった時をコンタミが起きたと判定することにした。

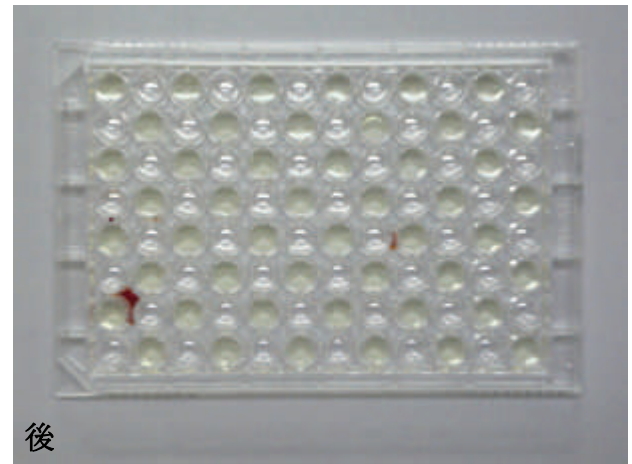
## 4. 結果

### コンタミ防止レベルの評価

40℃で24時間振盪（1000rpm）インキュベートした。振盪インキュベート前後の吸光度変化（ $\Delta OD_{540nm}$ ）の表および画像（左：振盪前、右：振盪後）を下に示す。

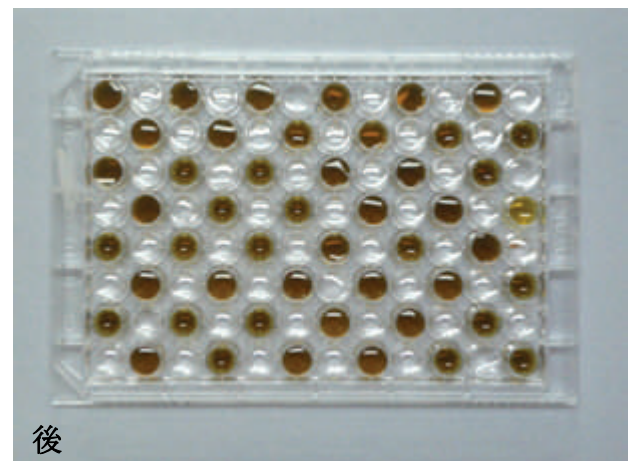
**RAPIDEPS**：インキュベーション前後の吸光度の差（ $OD_{540nm}$ ）

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.016	0.009	0.012	0.016	0.011	0.007	0.010	0.007	0.008	0.003	0.008	0.010
B	0.010	0.015	0.017	0.009	0.010	0.013	0.010	0.012	0.014	0.009	0.009	0.011
C	0.016	0.011	0.016	0.009	0.017	0.013	0.009	0.011	0.012	0.006	0.010	0.004
D	0.009	0.014	0.008	0.008	0.011	0.013	0.013	0.016	0.007	0.008	0.000	0.013
E	0.011	0.010	0.015	0.017	0.010	0.010	0.015	0.009	0.015	0.004	0.010	0.003
F	0.014	0.013	0.014	0.011	0.015	0.011	0.012	0.011	0.012	0.011	0.008	0.017
G	0.010	0.014	0.009	0.011	0.015	0.015	0.017	0.017	0.009	0.010	0.011	0.006
H	0.015	0.008	0.013	0.013	0.008	0.012	0.006	0.009	0.001	0.011	0.001	0.011



**ABC**：インキュベーション前後の吸光度の差（ $OD_{540nm}$ ）

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.618	0.005	0.592	-0.001	0.580	0.001	0.637	0.002	0.595	0.002	0.580	0.006
B	0.013	0.599	0.012	0.619	0.016	0.686	0.012	0.659	0.009	0.670	0.012	0.656
C	0.721	0.013	0.696	0.002	0.697	0.004	0.656	0.000	0.709	-0.001	0.690	0.015
D	0.010	0.685	0.012	0.715	0.011	0.694	0.008	0.655	0.009	0.720	0.011	0.313
E	0.709	0.009	0.626	-0.001	0.685	0.009	0.679	0.005	0.659	0.002	0.682	0.013
F	0.013	0.641	0.008	0.563	0.016	0.666	0.014	0.639	0.011	0.593	0.009	0.654
G	0.699	0.007	0.689	0.004	0.726	0.006	0.547	0.005	0.632	0.004	0.674	0.006
H	0.006	0.626	0.006	0.724	0.008	0.596	0.016	0.579	0.004	0.684	0.007	0.670



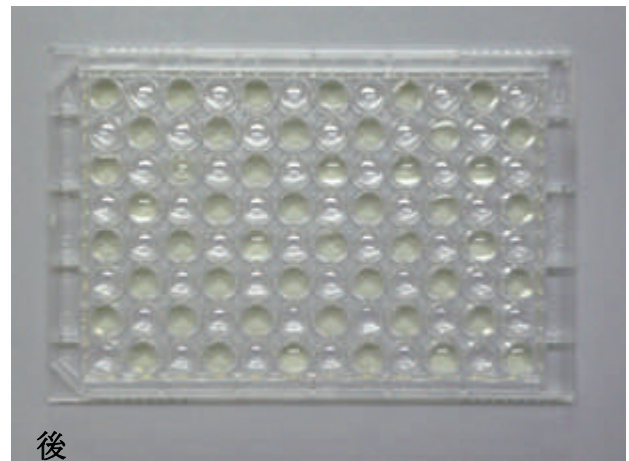
市販有機溶媒耐性アルミシール：インキュベーション前後の吸光度の差 (OD 540 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.014	-0.001	0.014	0.005	0.014	0.002	0.017	0.000	0.008	0.007	0.014	0.001
B	0.007	0.003	0.006	0.014	0.002	0.003	0.001	0.007	0.000	0.000	0.011	0.005
C	0.014	0.004	0.017	0.008	0.014	0.001	0.008	-0.001	0.009	-0.002	0.014	0.008
D	0.010	0.010	0.004	0.011	0.001	0.012	0.000	0.005	0.008	0.017	0.012	0.011
E	0.000	0.006	-0.001	0.005	0.008	0.002	0.008	-0.001	0.000	0.001	0.000	0.013
F	0.005	0.009	0.009	0.009	0.005	0.016	0.003	0.013	0.002	0.008	0.009	0.013
G	0.009	0.011	0.009	0.008	0.012	0.005	0.014	0.001	0.012	0.005	0.006	0.012
H	0.014	0.011	0.003	0.009	0.002	0.014	0.003	0.009	-0.001	-0.001	0.011	-0.001



市販有機溶媒耐性樹脂製シール (TAT)：インキュベーション前後の吸光度の差 (OD 540 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.011	0.004	0.013	0.013	0.004	0.002	0.016	0.000	0.001	-0.001	0.002	0.013
B	0.017	0.004	0.013	0.006	0.011	0.003	0.008	0.008	0.003	0.014	0.008	0.008
C	0.013	0.008	0.005	0.010	0.012	0.003	0.015	-0.002	0.010	0.000	0.006	0.000
D	0.015	0.007	0.012	0.002	0.004	0.003	0.005	0.006	0.000	0.011	-0.002	0.004
E	0.002	0.012	0.015	0.009	0.004	0.005	0.012	0.001	0.005	0.001	-0.001	0.000
F	0.011	0.010	0.015	0.002	0.009	0.011	0.006	0.009	0.002	0.008	0.004	0.005
G	0.002	0.008	0.011	0.004	0.008	0.006	0.016	0.005	0.017	0.006	0.000	0.003
H	0.010	0.003	0.012	0.014	0.006	0.004	0.000	0.017	0.001	0.017	0.004	0.011

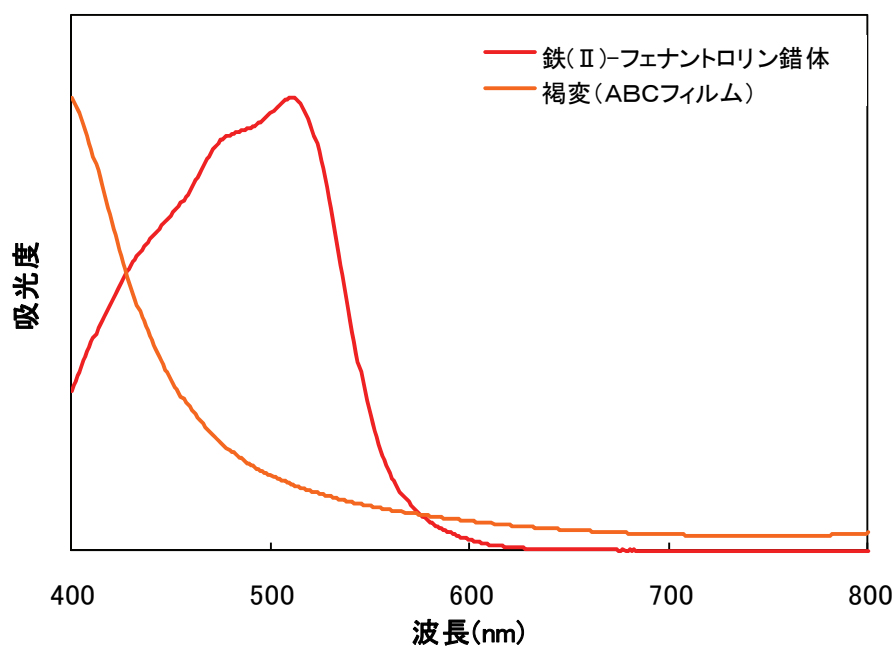


## 5. 考察・性能評価

ABCフィルム以外では、ウェルの様子に変化はほとんど見られなかったため、コンタミは起きていないと判定した。OD 540 nmが0.01程度上昇しているウェルもあったが、2液の混合による赤色の発色は目視で確認できず、インキュベート時にウェル底面が汚れたことなどによる吸光度変化と考えられた。

ウェル内へのコンタミは見られなかったが、RAPID EPSでは添付画像のとおりウェル外壁で赤く発色する様子が見られた。これは、フィルム剥ぎ取り時にフィルムに付着したI液およびII液がウェル外壁に垂れ落ちて混合し赤く発色したものである。

ABCフィルムでは、I液のウェルについて褐変が見られ、 $\Delta$ OD 540 nmが0.6程度上昇した。しかし、褐変した液の可視吸光スペクトルを測定したところ、下図の通り鉄(II)-フェナントロリン錯体の可視吸光スペクトルとは特徴を異にしていたので、この変色はコンタミによるものではないと考えられる。褐変の原因は不明であるが、ABCフィルムは分注器のチップ先を差し込めるようフィルムにスリットが入っていて密閉されたフィルムではないことから、I液の酸化が進んだことによる変色だと推測された。



鉄(II)-フェナントロリン錯体および  
ABCフィルムの褐変した液の可視吸光スペクトル

コンタミが起きていなくても吸光度が上昇してしまうことがあったため、今回の性能評価方法に対して次に示す改善策が考えられる。

- ① 鉄(II)-フェナントロリン錯体は吸収を持たない650 nm以上の波長での吸光度から、OD 540 nmを補正する。
- ② 酸化などによる変色が起きない発色反応系を用いる。