

FUJIFILM**Wako**

Code No. 296-80901

for Skin Sensitisation Test ADRA Kit

【Introduction】

ADRA (Amino acid Derivative Reactivity Assay) is in chemico test method, which is an alternative (non-animal) method, for predicting skin sensitization potential of chemicals, using *N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (hereinafter referred to as NAC) and α -*N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine (hereinafter referred to as NAL). This reagent kit enables simple implementation of the ADRA.

【Reagent supplied】

This kit contains reagents to implement the ADRA for two 96-well plates.

Components	Amount
NAC (297-80931)	for 10mL × 2 vials
NAL (294-80941)	for 10mL × 2 vials
NAC Buffer (pH 8.0) (premixed) (293-80911)	for 300mL × 2 vials
NAL Buffer (pH 10.2) (premixed) (290-80921)	for 300mL × 2 vials
0.01mol/L EDTA Solution (291-80951)	1mL × 2 vials

【Reagents required other than the kit】

- 1) Trifluoroacetic Acid (TFA) (Wako Special Grade 204-02743)
- 2) Acetonitrile (for HPLC 019-08631)
- 3) Distilled water or higher-grade water*
*Use water with low metal content for the ADRA.
- 4) Acetone** (Guaranteed Reagent 016-00346)
- 5) Dimethyl Sulfoxide (DMSO)** (Guaranteed Reagent 043-07216)
**Not to be used if the test chemical dissolves in water or acetonitrile.
- 6) Phenylacetaldehyde (CAS No. 122-78-1)

【Necessary apparatus】

- 1) Electronic balance –with a displayed precision of 0.1 mg
- 2) Micropipette – Three micropipettes capable of distribution of 2-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L
- 3) 12 channel pipette – capable of distribution of 50-150 μ L
- 4) HPLC system – equipped with a light-shielding auto-sampler for a 96-well plate capable of liquid feeding at 0.3 mL/min
- 5) UV detector-photodiode array (PDA) detector or absorbance detector (281 nm)
- 6) HPLC column
- 7) pH meter – with precision of ± 0.01 pH, equipped with a buffer solution for calibration
- 8) Incubator – capable of a temperature of 25°C
- 9) 96-well plate
- 10) 500 mL plastic bottle
- 11) Test tube mixer
- 12) Plate seal*
*Use the seal having high sealability and solvent-resistant performance.
- 13) Plate shaker

—1/16—

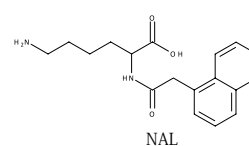
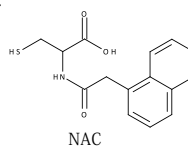
14) Plate centrifuge

※ All the containers and instrument (except for components of HPLC) used in this test must be disposable products made of Polypropylene or Polyethylene. If contaminated by metal ion, dimerization of the NAC occurs and the assay cannot be performed correctly.

【Principle】

This method assays the presence of skin sensitization by reacting the test chemicals with NAC and NAL for 24 hours at 25°C, then determining the concentration of residual NAC and NAL in the reaction liquid.

NAC and NAL are compounds consisting of a naphthalene ring at a detection area and cysteine or lysine at the nucleophilic area. The relative concentration of NAC and NAL after the 24-hour reaction is determined by UV detection at 281 nm under the conditions of gradient elution in HPLC.

**【Pre-work: Solubility Assessment of Test Chemicals】**

Prior to performing the ADRA, the solubility of the test chemical must be evaluated.

The following 4 solvents are suitable for the solubility evaluation and the priority for the selection of the solvent is as follows.

1. Water*, 2. Acetonitrile, 3. Acetone, 4. DMSO**

*In case of acid anhydride, due to its hydrolysis reaction, water cannot be selected as a solvent.

**DMSO is only used for the 20 mM solution preparation.

Procedure for Solubility Assessment

- 1) Calculate the quantity of the test chemical necessary to prepare 5 mL of 20 mM solution of the test chemical. Use the formula below to determine the amount.

【Preparation of 20 mM solution (5 mL)】

$$\text{Quantity of the test chemical (mg)} = \text{Molecular weight} \times \frac{100}{\text{purity (\%)}} \times \frac{20\text{mM}}{1000} \times 5\text{mL}$$

• If there is no information on the purity of the test chemical, assume that it is 100%.

• If the determined quantity is less than 10 mg, weigh more than 10 mg.

- 2) Weigh the quantity of the test chemical directly in a 10–15 mL centrifuge tube, and record the actual weighed value.

- 3) Calculate the necessary amount of the solvent from the weighed value using the following formula, then prepare the solution.

【Formula to determine the solvent amount for preparation of 20 mM solution】

$$\text{Solvent amount (mL)} = \text{Amount of weighted test chemical (mg)} \times \frac{\text{Purity (\%)}}{\text{Molecular weight}} \times 0.5$$

- 4) If the test chemical is difficult to dissolve, perform ultrasonication for 5 minutes.

- 5) Check visually whether the test chemical is soluble or not.

※ If the test chemical at concentration of 20 mM does not dissolve in all the solvent, perform the solubility check at concentration of

—2/16—

1 mM with water, acetonitrile and acetone. DMSO is only used as solvent for the chemical at concentration of 20mM, as it needs to be diluted with acetonitrile for the reaction test.

【Formula to determine the quantity of the test chemical to prepare 100 mL of 1 mM solution】

$$\text{Quantity of the test chemical (mg)} = \text{Molecular weight} \times \frac{100}{\text{purity (\%)}} \times \frac{1\text{mM}}{1000} \times 100\text{mL}$$

If the test chemical is an aqueous solution, use water as a test solvent, and determine the necessary amount of the test chemical and water using the formula below. If the specific gravity is not available, assume it as 1.

【Formula to determine necessary amount for preparation of 5 mL of 20 mM solution of test chemical】

$$\frac{\text{Molecular weight}}{\text{Concentration (w/v\%)}} \times \frac{10}{\text{Specific gravity}} = \text{Amount of test chemical (\mu L)}$$

$$5\text{ mL} - \frac{\text{Amount of test chemical (\mu L)}}{1000} = \text{Solvent amount (mL)}$$

※ In case of preparing 1 mM solution, dilute 20 mM solution by 20 times.

【Preparation of reagents】

1. Preparation of test chemical solution

Prepare the test chemical solution immediately before the reaction process.

- Prepare the test chemical solution at concentration of 20 mM or 1 mM, using the solvent selected in "Solubility Assessment of Test Chemicals". For preparation of the test chemical solution, refer to the preparation method described in "Procedure for Solubility Assessment".
- In case of 20 mM test chemical solution, when using a solvent other than DMSO, prepare the concentration to be 1 mM by diluting with same solvent by 20 times. When using DMSO as a solvent, dilute with acetonitrile by 20 times to prepare the concentration to be 1 mM.

※ If sediment or cloudiness is observed, stop the experiment at that point and perform the Solubility Assessment of Test Chemical again.

2. Preparation of buffer

- ① Preparation method of 100 mM NAC Buffer (pH 8.0)
 - 1) Measure 300 mL of water.
 - 2) Transfer the content of the NAC Buffer (pH 8.0) premixed into a 500 mL plastic bottle.
 - 3) Take 30 mL from the measured water, and rinse the container of the NAC Buffer (pH 8.0) premixed with it, then pour into the 500 mL plastic bottle.
 - 4) Add 270 mL of the remaining water into the 500 mL plastic bottle, and dissolve the premix.
 - 5) After the premix is dissolved, add 10 μL of 0.01 mol/L EDTA solution.
 - 6) Transfer some of the prepared buffer to another container and check its pH. Ensure that the pH is within the range of 7.9-8.1.

② Preparation method of 100 mM NAL Buffer (pH 10.2)

- 1) Measure 300 mL of water.
- 2) Transfer the content of the NAL Buffer (pH 10.2) premixed into a 500 mL plastic bottle.
- 3) Take 30 mL from the measured water, and rinse the container of the NAL Buffer (pH 10.2) premixed with this, then pour into the 500 mL plastic bottle.
- 4) Add 270 mL of the remaining water into the 500 mL plastic bottle, and dissolve the premix.
- 5) Transfer some of the prepared buffer to another container and check its pH. Ensure that the pH is within 10.1-10.3.
※ If storing the prepared buffer, store it in the refrigerator and use within 3 days after preparation.

3. Preparation of Positive Control Solution

Prepare 1 mM Phenylacetaldehyde (Molecular weight = 120.15) acetonitrile solution as positive control.

• Preparation procedure

- 1) Using the following formula, calculate the quantity of the positive control necessary to prepare 5 mL of 20 mM positive control solution.

$$\text{Molecular weight} \times \frac{10}{\text{purity (\%)}} = \text{Quantity of Phenylacetaldehyde (mg)}$$

- 2) Weigh the quantity of Phenylacetaldehyde directly in a 10-15 mL centrifuge tube.
- 3) Calculate the necessary amount of the solvent based on the actual weighted value, using the following formula.

$$\text{Weighed value of Phenylacetaldehyde (mg)} \times \frac{\text{Purity (\%)}}{\text{Molecule weight}} \times 0.5 = \text{Solvent amount (mL)}$$

- 4) Dissolve the weighted Phenylacetaldehyde in the determined amount of acetonitrile. (concentration: 20 mM)
- 5) Dilute it with acetonitrile by 20 times in an appropriate container* such as 1.4 mL sample track. (concentration: 1 mM)
*96-well deep well plate can also be used instead of sample track.

4. Preparation of NAC solution and NAL solution

Prepare the NAC solution and NAL solution immediately before the reaction process.

- 1) Preparation of NAC solution
Take 10 mL of the NAC Buffer (pH 8.0) and directly add to the container of NAC, then dissolve (concentration: 6.667 μM).
※ Do not perform ultrasonication and intense stirring as it can cause oxidization of NAC.
- 2) Preparation of NAL solution
Take 10 mL of the NAL Buffer (pH 10.2) and directly add to the container of NAL, then dissolve (concentration: 6.667 μM).

5. Preparation of stop solution

Add 1 mL of TFA to 40 mL of water. (concentration: 2.5% (v/v))

【Reaction process】

The following operations are performed in a 96-well plate.

1. Implementation of stability test (0 hour)
A stability test (0 hour) should be implemented to ensure the stability of NAC and NAL.

Refer to the plate layout and dispense the reagents as shown below.

	ST (0)
NAC Solution / NAL Solution	150 μ L
Acetonitrile	50 μ L
Stop Solution (2.5% (v/v) TFA Solution)	50 μ L

After dispensing the reagents, seal the plate with a plate seal, and mix it on a plate shaker. After being centrifuged, implement HPLC analysis immediately.

※ Check the ADRA-specialized webpage for the conditions of HPLC analysis and analysis method for obtained data. The URL is shown on the last page of this manual.

2. Dispensation of reagents

① Refer to the plate layout and dispense the reagents to the corresponding wells as shown below.

(The plate layout which can be used for a 96-well plate is available on the ADRA-specialized webpage.)

	Sample	RC-A	RC-B	RC-C	CC	PC	ST(24)
NAC Solution / NAL Solution	150 μ L	150 μ L	150 μ L	150 μ L	—	150 μ L	150 μ L
NAC Buffer (pH 8.0)/ NAL Buffer (pH 10.2)	—	—	—	—	150 μ L	—	—
Acetonitrile	—	50 μ L	50 μ L	—	—	—	50 μ L
Solvent for dissolving test chemical	—	—	—	50 μ L	—	—	—
Test chemical solution	50 μ L	—	—	—	50 μ L	—	—
Phenylacetaldehyde solution	—	—	—	—	—	50 μ L	—

After the dispensation is complete, seal the plate with a plate seal, and mix it on a plate shaker.

Following spinning down in a centrifuge, incubate it under the light-shielding condition for 24 hours (\pm 1 hour) at 25 $^{\circ}$ C (\pm 1 $^{\circ}$ C).

② Reaction stop

After the 24-hour reaction, add 50 μ L of the stop solution to each well. The stop solution should be added within 30 minutes after the reaction is finished.

Following the adding of the stop solution, seal the plate with a plate seal, and stir it on a plate shaker.

*If precipitation is observed in the reaction liquid after the stirring, centrifuge the plate at a low speed (100-400 g) to gather the deposit at the bottom. If it is possible to collect more than 100 μ L of the supernatant, transfer only the supernatant to another plate for measurement.

③ Preparation of dilution series of standard solution

1) Preparation of diluted buffer

Take 900 μ L each from the NAC Buffer (pH 8.0) and NAL Buffer (pH 10.2), and dispense each to another sample track. Add 60 μ L of water, 6 μ L of TFA and 234 μ L of acetonitrile to each. (hereinafter referred to as Diluted NAC Buffer, Diluted NAL Buffer)

2) Preparation of NAC and NAL standard solution

Take 300 μ L each from the prepared NAC solution and NAL solution, and dispense each to another sample track. Add 20 μ L of water, 2 μ L of TFA and 78 μ L of acetonitrile to each.

(hereinafter referred to as NAC standard solution, NAL standard solution)

3) Next, prepare the dilution series as follows.

	Std.1	Std.2	Std.3	Std.4	Std.5	Std.6	Std.7
Diluted NAC Buffer/ Diluted NAL Buffer	—	150 μ L	150 μ L	150 μ L	150 μ L	150 μ L	150 μ L
NAC/NAL Standard Solution	150 μ L	150 μ L	—	—	—	—	—
Dilution series operation ①	—	—	Std.2 at 150 μ L	—	—	—	—
Dilution series operation ②	—	—	—	Std.3 at 150 μ L	—	—	—
Dilution series operation ③	—	—	—	—	Std.4 at 150 μ L	—	—
Dilution series operation ④	—	—	—	—	—	Std.5 at 150 μ L	—
Final concentration	5.0 μ M	2.5 μ M	1.25 μ M	0.625 μ M	0.313 μ M	0.156 μ M	0

【Assay and data analysis】

After the reaction is completed, perform an analysis with HPLC.

Details of the conditions of analysis and method of analysis are available at the specialized webpage below.

ADRA kit specialized webpage

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/download/adra/kit/index.html>

【Caution】

<Caution for measurement>

- Store the reagents in the specified conditions and do not use expired items.
- Use the kit as soon as possible after opening.
- Do not use the container and accessories in this kit for any other purposes.

<Caution for disposal>

- In case of disposal, follow the applicable effluent standards and dispose in a proper manner.

【Storage and expiration date】

- Storage: Keep in the refrigerator and away from the light (do not freeze).
- Expiration date: See the product label.

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-311-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

皮膚感作性評価用 ADRA キット

【はじめに】

ADRA (Amino acid Derivative Reactivity Assay) は *N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (以下 NAC) と α -*N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine (以下 NAL) を用いた、化学物質の皮膚感作性評価試験の動物実験代替試験法です。本キットは ADRA 試験を簡便に実施できる試薬キットです。

【キット内容】

本キットには 96 well プレート 2 枚分の試験を実施できる試薬を梱包しています。

試薬名	容量	梱包数
NAC (297-80931)	10 mL 用	2 本
NAL (294-80941)	10 mL 用	2 本
NAC Buffer (pH 8.0) プレミックス (293-80911)	300 mL 用	2 本
NAL Buffer (pH 10.2) プレミックス (290-80921)	300 mL 用	2 本
0.01 mol/L EDTA 溶液 (291-80951)	1 mL	2 本

【本キット以外に必要な試薬類】

- トリフルオロ酢酸 (TFA) (和光特級 204-02743)
- アセトニトリル (高速液体クロマトグラフ用 015-08633)
- 蒸留水またはそれ以上のグレードの水*
*試験では金属含有量が少ない水をご使用下さい。
- アセトン** (試薬特級 016-00346)
- ジメチルスルホキシド (DMSO)** (試薬特級 043-07216)
**被験物質が水またはアセトニトリルに溶解する場合は使用しません。
- Phenylacetaldehyde (CAS No. 122-78-1)

【使用する器具類】

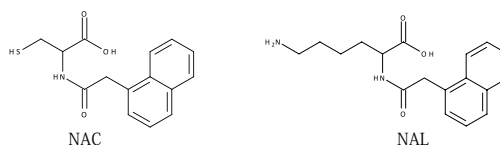
- 電子天秤…0.1 mg まで表示されるもの
- マイクロピペット…2 ~ 10 μ L、10 ~ 100 μ L、100 ~ 1000 μ L を分取できる 3 本を使用
- 12 連ピペット…50 ~ 150 μ L 分取可能なもの
- HPLC システム…流速 0.3 mL/min で送液可能な 96 well 用遮光オートサンプラー付き
- UV 検出器…フォトダイオードアレイ検出器 (PDA 検出器) または吸光度検出器 (281 nm)
- HPLC カラム
- pH 計… ± 0.01 pH 単位まで読むことが可能なもの。校正用緩衝液付きであること
- インキュベーター…25°C 設定が可能なもの
- 96 well プレート
- 500 mL ポリボトル
- 試験管ミキサー
- プレートシール*
*密封性、耐溶剤性の高いものをご使用下さい。
- プレートシェイカー
- プレート遠心機

※ ADRA に使用する容器や器具類 (HPLC 構成部品を除く) はすべて PP または PE 製のディスポーザブル品を使用して下さい。金属イオンが混入すると NAC が二量体化し、評価を正しく行うことができません。

【原理】

本法は被験物質と NAC、NAL を 25°C で 24 時間反応させ、反応液中に残存する NAC と NAL それぞれの濃度を定量し皮膚感作性の有無を評価します。

NAC と NAL は検出部位のナフタレン環と求核部位のシステインまたはリシンからなる物質です。24 時間反応後の NAC と NAL の相対的濃度は HPLC のグラジエントの溶出条件下、281 nm の UV 検出で定量します。



【予備試験：被験物質の溶解性評価】

ADRA を行う前に必ず被験物質の溶解性を評価し、目視で白濁や沈殿が確認されない溶媒を選定して下さい。

溶解性評価に使用可能な溶媒は以下の 4 種類です。優先順位は、付与されている番号の通りです。

①水*、②アセトニトリル、③アセトン、④DMSO**

* 酸無水物は加水分解するため溶媒として水は選択できません。

**DMSO は 20 mM 溶液調製用のみ使用します。

溶解性評価手順

- 被験物質 20 mM 溶液を 5 mL 調製するために必要な被験物質の目量を計算します。以下の式を使って算出して下さい。

【20 mM 溶液を 5 mL 調製する際の被験物質目量算出式】

$$\text{被験物質の目量 (mg)} = \text{分子量} \times \frac{100}{\text{純度 (\%)}} \times \frac{20\text{mM}}{1000} \times 5\text{mL}$$

- 被験物質の純度情報が無い場合は、純度 100% と仮定して下さい。
 - 算出した目量が 10 mg 未満となった場合は 10 mg を目量とし、10 mg 以上秤量して下さい。
- 10 ~ 15 mL 容量の遠沈管等に直接被験物質を目量秤量し、実際の秤量値を記録して下さい。
 - 以下の式を使って秤量値から必要な溶媒量を計算し、溶液を調製して下さい。

【20 mM 溶液を調製する際の溶媒量算出式】

$$\text{溶媒量 (mL)} = \text{秤量した被験物質 (mg)} \times \frac{\text{純度 (\%)}}{\text{分子量}} \times 0.5$$

- 溶けにくい場合、超音波処理 (5 分間) を行って下さい。
- 目視で白濁、沈殿の有無を確認して下さい。

※ 20 mM 量の被験物質がすべての溶媒に溶解しなかった場合は、1 mM 量の溶解性確認を水、アセトニトリル、アセトンで行って下さい。DMSO は反応試験時にアセトニトリルで希釈する必要があるため、20 mM 量の溶媒としてのみ使用します。

【1 mM 溶液を 100 mL 調製する際の被験物質目量算出式】

$$\text{被験物質の目量 (mg)} = \text{分子量} \times \frac{100}{\text{純度 (\%)}} \times \frac{1\text{mM}}{1000} \times 100\text{mL}$$

被験物質が水溶液の場合は試験溶媒を水とし、次の計算式を用いて必要な被験物質量と水の量を算出します。比重がわからない場合は1と仮定して下さい。

【20 mM 被験物質溶液 5 mL 調製量算出式】

$$\frac{\text{分子量}}{\text{濃度 (w/v\%)}} \times \frac{10}{\text{比重}} = \text{被験物質量 (\mu L)}$$

$$5 \text{ mL} - \frac{\text{被験物質量 (\mu L)}}{1000} = \text{溶媒量 (mL)}$$

※ 1 mM 溶液を調製する際は 20 mM 溶液を 20 倍希釈します。

【試薬類の調製】

1. 被験物質溶液の調製

被験物質溶液は反応工程直前に調製して下さい。

- ・「予備試験：被験物質の溶解性評価」で選定した溶媒を用いて 20 mM または 1 mM の被験物質溶液を調製して下さい。被験物質溶液の調製は「溶解性評価手順」の調製方法を参照して下さい。
- ・20 mM の被験物質溶液においては DMSO 以外の溶媒の場合、同じ溶媒を用いて 20 倍希釈し、1 mM に調製して下さい。DMSO 溶媒の場合はアセトニトリルを用いて 20 倍希釈し、1 mM に調製して下さい。

※沈殿や白濁が発生した場合はここで実験を中止し、再度、溶解性試験を実施して下さい。

2. Buffer の調製

① 100 mM NAC Buffer (pH 8.0) 調製方法

- 1) 水 300 mL を計量します。
- 2) NAC Buffer (pH 8.0) プレミックスの中身を 500 mL ポリボトルに移します。
- 3) 計量した水から 30 mL 取り、NAC Buffer (pH 8.0) プレミックスの容器を洗いこみ、500 mL ポリボトルに入れます。
- 4) 残りの水 270 mL を 500 mL ポリボトルに加え、プレミックスを溶解します。
- 5) プレミックスが溶解した後、0.01 mol/L EDTA 溶液を 10 μ L 添加します。
- 6) 調製した Buffer の一部を別の容器に移し、pH を確認します。その時、pH は 7.9 ~ 8.1 の範囲内であることを確認します。

② 100 mM NAL Buffer (pH 10.2) 調製方法

- 1) 水 300 mL を計量します。
- 2) NAL Buffer (pH 10.2) プレミックスの中身を 500 mL ポリボトルに移します。
- 3) 計量した水から 30 mL 取り、NAL Buffer (pH 10.2) プレミックスの容器を洗いこみ、500 mL ポリボトルに入れます。
- 4) 残りの水 270 mL を 500 mL ポリボトルに加え、プレミックスを溶解します。
- 5) 調製した Buffer の一部を別の容器に移し、pH を確認します。その時、pH は 10.1 ~ 10.3 の範囲内であることを確認します。
※調製した Buffer を保管する場合は冷蔵保管とし、調製後 3 日以内に使用して下さい。

3. 陽性対照物質溶液の調製

陽性対照物質として 1 mM Phenylacetaldehyde (分子量 = 120.15) アセトニトリル溶液を調製して下さい。

・調製手順

- 1) 以下の式を用い、20 mM 陽性対照溶液を 5 mL 調製するのに必要な陽性対照物質の目量を計算します。

$$\text{分子量} \times \frac{10}{\text{純度 (\%)}} = \text{Phenylacetaldehyde 目量 (mg)}$$

- 2) 10 ~ 15 mL 容量の遠沈管に直接、目量の Phenylacetaldehyde を秤量して下さい。
- 3) 秤量した実測値に基づき以下の式から必要な溶媒量を計算します。

$$\text{Phenylacetaldehyde 秤量値 (mg)} \times \frac{\text{純度 (\%)}}{\text{分子量}} \times 0.5 = \text{溶媒量 (mL)}$$

- 4) 秤量した Phenylacetaldehyde を算出した量のアセトニトリルに溶解します。(濃度：20 mM)
- 5) 1.4 mL サンプルトラック等の適切な容器 * 内でアセトニトリルを用いて 20 倍希釈します。(濃度：1 mM)
* サンプルトラックの代わりに 96well ディープウェルプレートなども使用可能です。

4. NAC 溶液、NAL 溶液調製

NAC 溶液、NAL 溶液は反応工程の直前に調製して下さい。

1) NAC 溶液の調製

NAC Buffer (pH 8.0) を 10 mL 取り、NAC の容器に直接加え溶解します。(濃度：6.667 μ M)

※超音波処理や激しい攪拌は NAC が酸化する原因となりますので、行わないで下さい。

2) NAL 溶液の調製

NAL Buffer (pH 10.2) を 10 mL 取り、NAL の容器に直接加え溶解します。(濃度：6.667 μ M)

5. 反応停止液の調製

水 40 mL にトリフルオロ酢酸 (TFA) 1 mL を加えます。(濃度：2.5% (v/v))

【反応工程】

以下の作業は 96 well プレート上で操作を行います。

1. 安定性確認試験の実施 (0 時間)

NAC、NAL の安定性を確認するため、安定性確認試験 (0 時間) を行います。

プレート配置図を参照し、下記通り試薬を分注します。

	ST (0)
NAC 溶液 / NAL 溶液	150 μ L
アセトニトリル	50 μ L
反応停止液 (2.5% (v/v) TFA 水溶液)	50 μ L

試薬の分注後、プレートシールで密封し、プレートシェイカーで攪拌します。遠心機でスピンドアウンした後、ただちに HPLC 分析を実施して下さい。

※ HPLC 分析条件、得られたデータの解析方法は ADRA 専用 WEB ページを確認下さい。URL は本説明書の最終ページに記載しております。

2. 試薬分注

- ① プレート配置図を参照し、対応する well に下記の通り試薬を分注して下さい。

(ADRA 専用 WEB ページに 96well プレートを重ねて使えるプレート配置図があります。ご利用下さい。)

	Sample	RC-A	RC-B	RC-C	CC	PC	ST(24)
NAC 溶液 /NAL 溶液	150 μ L	150 μ L	150 μ L	150 μ L	—	150 μ L	150 μ L
NAC Buffer (pH 8.0) / NAL Buffer (pH 10.2)	—	—	—	—	150 μ L	—	—
アセトニトリル	—	50 μ L	50 μ L	—	—	—	50 μ L
被験物質溶解溶媒	—	—	—	50 μ L	—	—	—
被験物質溶液	50 μ L	—	—	—	50 μ L	—	—
Phenylacetaldehyde 溶液	—	—	—	—	—	50 μ L	—

分注が完了したら、プレートシールで密封し、プレートシェイカーで攪拌します。遠心機でスピンドアウンした後、25℃ (± 1℃) で 24 時間 (± 1 時間) 遮光状態でインキュベートして下さい。

②反応停止

24 時間の反応完了後、各 Well に反応停止液を 50 μ L 添加して下さい。
反応停止液は反応終了後 30 分以内に添加して下さい。

反応停止液を添加した後、プレートをプレートシールで密封し、プレートシェイカーで攪拌して下さい。

※攪拌後の反応液に析出等が見られた場合は、プレートを低速 (100 ~ 400 g) で遠心し、析出物を底に集めてください。上清を 100 μ L 以上回収できる場合は上清のみ別のプレートに移し、測定に用いて下さい。

③希釈系列の調製

1) 希釈 Buffer の調製

NAC Buffer (pH 8.0) /NAL Buffer (pH 10.2) からそれぞれ 900 μ L とり、それぞれを別のサンプルトラックに分注します。それぞれに水 60 μ L、TFA 6 μ L、アセトニトリル 234 μ L 加えます。

→希釈 NAC Buffer、希釈 NAL Buffer

2) NAC/NAL 標準液の調製

調製済みの NAC 溶液、NAL 溶液からそれぞれ 300 μ L とり、それぞれを別のサンプルトラックに分注します。それぞれに水 20 μ L、TFA 2 μ L、アセトニトリル 78 μ L 加えます。

→ NAC 標準液、NAL 標準液

3) 続いて下記の通り希釈系列を調製して下さい。

	Std.1	Std.2	Std.3	Std.4	Std.5	Std.6	Std.7
希釈 NAC Buffer/ 希釈 NAL Buffer	—	150 μ L	150 μ L	150 μ L	150 μ L	150 μ L	150 μ L
NAC/NAL 標準液	150 μ L	150 μ L	—	—	—	—	—
希釈系列作業①	—	—	Std.2 at 150 μ L	—	—	—	—
希釈系列作業②	—	—	—	Std.3 at 150 μ L	—	—	—
希釈系列作業③	—	—	—	—	Std.4 at 150 μ L	—	—
希釈系列作業④	—	—	—	—	—	Std.5 at 150 μ L	—
最終濃度	5.0 μ M	2.5 μ M	1.25 μ M	0.625 μ M	0.313 μ M	0.156 μ M	0

【分析・データ解析】

反応完了後、HPLC によって分析を実施します。

分析条件の詳細、データの解析方法につきましては、下記の専用 WEB ページに掲載していますので、参照下さい。

ADRA キット 専用 WEB ページ

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/download/adraakit/index.html>

【使用上又は取扱い上の注意】

〈測定に際しての注意〉

- ・試薬は指定された条件で保管し、使用期限の過ぎたものは使用しないで下さい。
- ・開封後はなるべく早く使用して下さい。
- ・本品中の容器、付属品は他の目的に転用しないで下さい。

〈廃棄に関する注意〉

- ・廃棄に際しては排水基準に基づいて適切に処理して下さい。

【貯法・有効期限】

- ・貯法：冷蔵・遮光保存 (凍結不可)
- ・有効期限：製品ラベルに記載

【包装単位】

(コード番号)	(品名)	(包装)
296-80901	ADRA キット	1 キット

製造発売元

富士フィルム 和光純薬株式会社
大阪府中央区道修町三丁目1番2号
Tel : 06-6203-3741

1809KA1