

FASTKIT エライザ Ver. III ごま

取扱説明書

※本製品をご使用になる前に必ずお読みください。

開発の経緯及び特徴

食物アレルギーを誘発する可能性が高いとされた卵・乳・小麦・そば・落花生・えび・かには、食品衛生法により特定原材料として定められており、これらを含む食品には表示が義務付けられています¹⁾。ごまについては、平成25年9月20日付け消食表第257号消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品に関する表示について」で特定原材料に準ずるものとして表示が推奨されています²⁾。ごまは様々な食品に含まれているため、ごま由来タンパク質の含有量の確認、および原材料由来のキャリアオーバーや製造工程でのコンタミネーションなど予期せぬ混入の有無を確認することが重要となります。

本製品は、食品中に含まれるごま由来の複数のタンパク質を、原材料から加工食品まで幅広く測定できます。

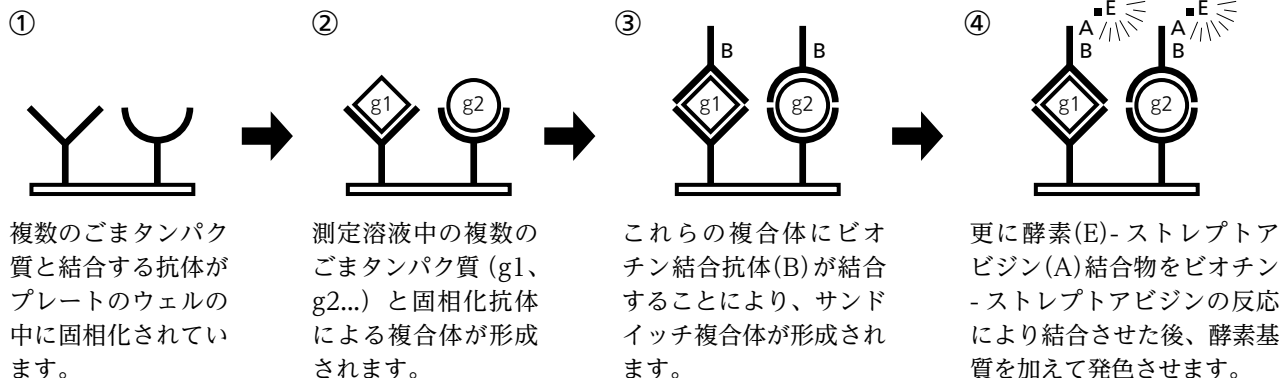
目的・性能

- ・食品中に含まれるごまタンパク質の測定
- ・溶液中の標準ごまタンパク質を0.78～50ng/mLの範囲で測定可能

キットの内容

- | | |
|--|-------------------------------|
| ① 抗体固相化プレート(カバー付き)
..... 96ウェル(8ウェル×12列)×1枚 | ⑥ 発色剤 12mL×1本 |
| ② 標準溶液(50ng/mL) 1.8mL×1本 | ⑦ 反応停止液(0.5N硫酸) 12mL×1本 |
| ③ 希釈用緩衝液 100mL×1本 | ⑧ 濃縮洗浄液(10倍濃縮) 100mL×1本 |
| ④ ビオチン結合抗体 150μL×1本 | ⑨ 抽出用試薬①(20倍濃縮) 50mL×1本 |
| ⑤ 酵素(ペルオキシダーゼ)-ストレプトアビジン結合物
..... 150μL×1本 | ⑩ 抽出用試薬②(20倍濃縮) 50mL×1本 |
| | ⑪ 抽出用試薬③(20倍濃縮) 50mL×1本 |
| | ⑫ 取扱説明書 1部 |

測定原理



必要な機器

試薬の調製

- ・メスシリンダー、ビーカー、マイクロピペット、チップ 等

測定溶液の調製

- ・粉碎機(フードカッター)、秤、50mL容量プラスチック製遠沈管(キャップ付)、振とう機、遠心分離機(3,000×g以上、室温での遠心分離可能なものを推奨)、ろ紙、漏斗 等

測定操作およびデータ解析

- ・マイクロピペット、チップ、試験管もしくはマイクロチューブ、吸収紙(ペーパータオル)、マイクロプレートリーダー(波長450nmおよび600～650nmのフィルターがセットされたもの)、解析ソフト(4係数Logistic解析が可能なもの) 等

注1) 器具類を介したコンタミネーションが生じる可能性があるため、可能な限りディスポーザブルの器具もしくは専有化した器具を使用してください。洗浄して使用する場合には、アルカリ洗剤を用いて確実にタンパク質を除去してください。

試薬の調製

そのまま使用する試薬

- ・希釈用緩衝液：室温（20～25℃）に戻して使用してください。
- ・発色剤：必要量を遮光容器に分注し、室温（20～25℃）に戻して使用してください。
- ・反応停止液：室温（20～25℃）に戻して使用してください。

調製して使用する試薬

- ・検体抽出液：抽出用試薬①、抽出用試薬②、抽出用試薬③および精製水を1:1:1:17の割合で混合し、よく攪拌した後使用してください。
- ・標準品希釈液：検体抽出液を希釈用緩衝液にて、20倍に希釈してください。
- ・標準溶液：下記の希釈例を参考に、標準品希釈液を用いて希釈してください。

検体抽出液調製例：24検体分調製する場合

抽出用試薬①（20倍濃縮）	：25mL
抽出用試薬②（20倍濃縮）	：25mL
抽出用試薬③（20倍濃縮）	：25mL
精製水	：425mL
合計	：500mL

標準溶液の希釈例

標準品濃度（ng/mL）	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0
標準溶液添加量（μL）	800	400	400	400	400	400	400	0
標準品希釈液添加量（μL）	0	400	400	400	400	400	400	400

- ・濃縮洗浄液：精製水にて10倍希釈して使用してください。
- ・ビオチン結合抗体：あらかじめ室温に戻した希釈用緩衝液を用いて100倍希釈し、15分以内に使用してください。
- ・酵素-ストレプトアビジン結合物：あらかじめ室温に戻した希釈用緩衝液を用いて100倍希釈し、15分以内に使用してください。

使用する希釈液および希釈対象

希釈対象	標準溶液	抽出後の上清もしくはろ液	ビオチン結合抗体	酵素-ストレプトアビジン結合物
希釈用緩衝液		○	○	○
標準品希釈液	○			

注1) 標準溶液、ビオチン結合抗体、および酵素-ストレプトアビジン結合物は使用直前まで冷蔵保存し、使用後は直ちに冷蔵保存してください。

注2) ロット番号の異なる試薬を混合、もしくは差し替えて使用しないでください。

注3) ラベルに測定項目が記載されている試薬（抗体固相化プレート、標準溶液、ビオチン結合抗体、酵素-ストレプトアビジン結合物）は他の測定項目に使用しないでください。ただし、測定項目の記載がない試薬は全ての測定項目でご使用いただけます。

注4) 抽出用試薬②・③は保管・流通時に沈殿を生じますが、性能上問題ありません。湯煎等で加温融解して使用してください。

抽出操作（一般的な食品における操作例）

- 1) 被検食品（検体）を一包装単位毎に粉砕機などにより均一な状態に粉砕したものを調製試料とします。
- 2) 調製試料1gをプラスチック製遠沈管に量りとり、検体抽出液19mLを加えよく混合し、固形分を均等に分散します（注1）。
- 3) 振とう機に遠沈管を横にして置き、室温で一晩（12時間以上）振とうしたものを抽出試料とします（注2）（注3）。
- 4) 抽出試料を3,000×g、室温で20分間遠心分離し、分離された上清を回収、もしくは沈渣が得られない場合にはろ過を行ってください（注4）。
- 5) 回収した上清もしくはろ液を希釈用緩衝液で20倍希釈したものを測定溶液とします。

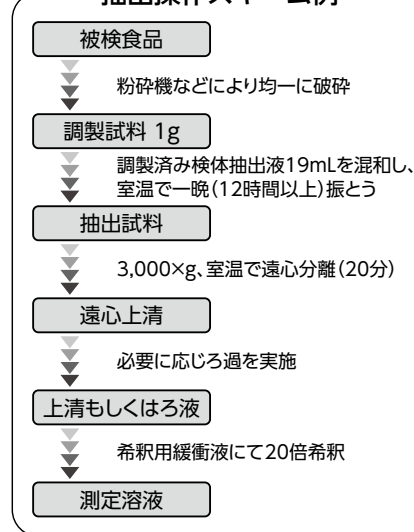
注1) 調製試料を分散させる際には、あまり泡立たせないよう注意しながらボルテックスミキサーなどを用いて十分に分散させてください。

注2) 振とう回数は1分間に90～110往復程度、振とう幅は3cm程度として、振とうにより液が遠沈管の両端に打ち付けられるように調整してください。また、液面に沿って付着する調製試料を分散させるため、時々遠沈管の上下を入れ替えるなどの操作をしてください。

注3) 抽出試料のpHを確認し、必要であれば、中性付近（pH6.0～8.0）となるように調整してください。

注4) 回収する上清の量はなるべく一定とし、可能であれば油層を除去してください。また、正確な結果を得るためにろ過を行うことを推奨します。

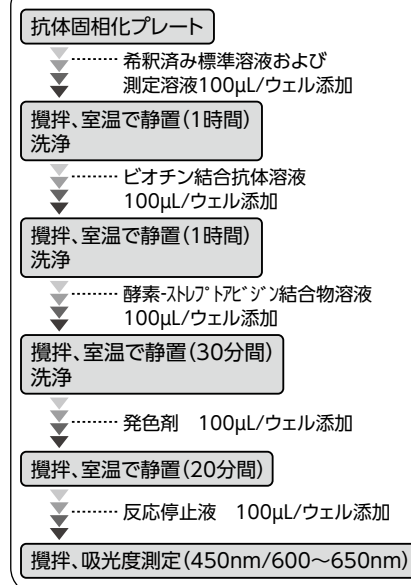
抽出操作スキーム例



測定操作

- 1) 抗体固相化プレートをアルミパウチ袋に入れたまま室温に戻し、使用直前にアルミパウチ袋から取り出してください（注1）。
- 2) 各ウェルに希釈した標準溶液および測定溶液 100 μ L を加えてください（注2）。
- 3) 軽く攪拌した後、室温（20～25 $^{\circ}$ C）で、1時間静置して反応させてください。
- 4) 反応終了後、標準溶液および測定溶液を捨て、各ウェルにあらかじめ希釈した洗浄液 250 μ L を加え、これを捨てる操作を5回繰り返してください（注3）。
- 5) 各ウェルに調製したビオチン結合抗体溶液 100 μ L を加えてください。
- 6) 軽く攪拌した後、室温（20～25 $^{\circ}$ C）で、1時間静置して反応させてください。
- 7) 反応終了後、ビオチン結合抗体溶液を捨て、手順4)と同様に洗浄してください。
- 8) 各ウェルに調製した酵素-ストレプトアビジン結合物溶液 100 μ L を加えてください。
- 9) 軽く攪拌した後、室温（20～25 $^{\circ}$ C）で、30分間静置して反応させてください。
- 10) 反応終了後、酵素-ストレプトアビジン結合物溶液を捨て、手順4)と同様に洗浄してください。
- 11) 各ウェルにあらかじめ室温に戻した発色剤 100 μ L を加えてください。
- 12) 軽く攪拌した後、室温（20～25 $^{\circ}$ C）で、20分間静置して発色させてください。データの再現性を高めるため、遮光条件下での発色を推奨します。
- 13) 各ウェルにあらかじめ室温に戻した反応停止液 100 μ L を加え、軽く攪拌して発色を停止してください（注4）。
- 14) 攪拌後、プレートリーダーにて主波長 450nm、副波長 600～650nm の吸光度を測定してください。

測定操作スキーム例



- 注1) プレートを分割して使用する場合は、使用しないストリップを必ず乾燥剤入りのアルミパウチ袋に戻し、冷蔵保存してください。
- 注2) 標準溶液および測定溶液の測定には各3ウェルずつ使用することを推奨します。また、標準溶液による標準曲線は測定毎に必ず作成してください。
- 注3) 正確な測定を行うために洗浄操作は非常に重要です。プレートを逆さにしてペーパータオルなどの上で数回強く叩きつけるなどの水切りを行いウェルに残った液と気泡を完全に除去した後、速やかに次の試薬を加えてください。
- 注4) 反応停止液は、0.5N 硫酸を使用しています。取り扱いの際には十分注意してください。

データ解析

- 1) 標準溶液を測定して得られた吸光度から4係数 Logistic 解析（4-パラメーター解析）を用いて標準曲線グラフを作成します（注1）。
- 2) 作成した標準曲線から、測定溶液中のごまタンパク質濃度（ng/mL）を読み取ります。
- 3) 読み取ったごまタンパク質濃度に抽出操作時の希釈倍率（400倍）を乗じて食品中のごまタンパク質濃度を算出します。

注1) 4-係数 Logistic 解析以外の解析方法により、標準曲線グラフを作成したとき、測定結果が異なる場合があります。

性能（単一試験室内バリデーション）

試料ならびに実施手順

通知（消食表第286号消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」）に準じて単一試験室内バリデーションを実施した。試料は豚肉団子、わかめスープ、ちりめんじゃこ、魚肉ソーセージ等を作製した。各試料には、ごま粉末をタンパク濃度が10 μ g/gとなるように添加した。試料毎に複数の抽出を行い、複数の分析者によって測定を行った。得られた結果から平均値（回収率）、日内再現性、日間再現性及び分析者間再現性を求めた。

バリデーション結果

平均値（回収率）、分析者間再現性、日内再現性及び日間再現性は、いずれも回収率：50%以上150%以下、精度：25%以下であった。

偽陽性・偽陰性

- 1) 特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに）との交差反応性は認められません。
- 2) 当社での試験の結果、偽陽性、偽陰性を示す食品が確認されています。詳細については、日本ハム(株)中央研究所ホームページにて公開している「偽陽性・偽陰性を示す食品一覧」をご参照ください。
- 3) 非常に高濃度のタンパク質存在下では、非特異的な反応が起こる可能性があります。この場合、適当な濃度に希釈して測定を行ってください。ただし、20 倍に希釈済みの測定溶液を更に希釈する際には、必ず標準品希釈液を使用してください。

使用上または取り扱い上の注意

一般的な注意事項

- 1) この取扱説明書をよく読み、記載された操作方法に従って使用してください。
- 2) 使用期限の過ぎたキットおよび構成部品は使用しないでください。使用期限は、外箱および各構成部品ラベルに記載されています。
- 3) 本キットは食品中のごまタンパク質を測定するための試薬であり、食物アレルギー発症の有無を診断する試薬ではありません。本キットによる測定結果とアレルギー症状の発症との相関性については確認されていません。
- 4) ごまタンパク質の有無については本キットの結果だけでなく、原材料や製造記録の確認等、他の方法と併せて総合的に判断してください。
- 5) 本キットによる測定に使用する機械・器具類の使用法等については、それぞれの製造元もしくは販売元にご確認ください。
- 6) 本取扱説明書は検査担当者のガイドラインとして作成されています。各検査手順や各々の食品におけるアプリケーションの妥当性については自ら検証してください。
- 7) 本キットにより得られた結果の判断および利用は、お客様の責任の下実施してください。また、その結果生じた損害および損失については、当社は責任を負いかねることをご了承ください。
- 8) 商品の仕様については、予告なく変更になる場合があります。

危険防止上の注意事項

- 1) 本キットの試薬類が、皮膚、粘膜、衣類等に付着しないよう注意してください。
- 2) 誤って試薬が目や口に入った場合には、直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、医師の手当てを受けてください。

保存方法・使用期限

- 1) 保存方法：冷蔵（2～8℃）、遮光にて保存してください（凍結厳禁）。
- 2) 使用期限：製造日より6ヶ月。外箱および各構成部品ラベルに記載されています。

参考文献

- 1) 消食表第 286 号消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」
- 2) 消食表第 257 号消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品に関する表示について」

〔販売元および問い合わせ先〕

外箱側面に記載

〔製造元〕

日本ハム株式会社 中央研究所
〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原3-3
電話：029(847)7825 / FAX：029(848)1256
URL：http://www.rdc.nipponham.co.jp