

コード番号 R3104(160122-161219)

## RIDAスクリーン・ストレプトマイシン取扱説明書

(r-Biopharm社製)

(抄訳版:必ず原文をご確認ください。万一、本書が原文と異なる場合は原文を正とします。なお、仕様・価格は予告なく変更される場合があります。)

RIDAスクリーン・ストレプトマイシンは牛乳や粉ミルク、ハチミツ、肉類、肝臓、腎臓、エビ、リンゴジュース中のストレプトマイシンの検出・定量分析のための競合酵素免疫測定法です。酵素免疫測定法に必要なすべての試薬が試験キットに収められています(96回の測定分、標準分析を含む)。定量にはマイクロプレートリーダーが必要です。

試料の調製方法: 牛乳:希釈  
粉ミルク:溶解→希釈  
ハチミツ:抽出→ C18カラムによる精製→  
乾燥→ バッファーに再溶解  
肉、肝臓、腎臓、エビ:ホモジナイズ→ 抽出→ 希釈  
リンゴジュース:遠心分離→ 希釈

所要時間: 試料の調製(10試料の場合)  
牛乳 約5分  
粉ミルク 約30分  
ハチミツ 約1.5時間  
肉、肝臓、腎臓、エビ 約45分  
リンゴジュース 約5分  
キット操作: 45分(インキュベーション時間)

検出限界: 牛乳 約 5 $\mu$ g/L (ppb)  
ミルク(粉ミルクを溶解) 約 3 $\mu$ g/L (ppb)  
ハチミツ 約 2 $\mu$ g/kg (ppb)  
牛肉、豚肉 約22 $\mu$ g/kg (ppb)  
家禽 約28 $\mu$ g/kg (ppb)  
肝臓 約23 $\mu$ g/kg (ppb)  
腎臓 約18 $\mu$ g/kg (ppb)  
エビ 約20 $\mu$ g/kg (ppb)  
リンゴジュース 約 4 $\mu$ g/L (ppb)

回収率: 牛乳 約 110%  
ミルク(粉ミルクを溶解) 約 107%

ハチミツ	約 87%
牛肉、豚肉	約 89%
家禽	約 95%
肝臓	約 90%
腎臓	約 81%
エビ	約 76%
リンゴジュース	約 93%

本キットの特異性は、それぞれの物質をバッファー系で交差反応を測定して求められました。実際の試料では、特異性はマトリクス効果によりバッファー系とは異なる場合がありますので、交差反応物質を測定される前に、それぞれの試料マトリクスでその物質の検出限界と回収率を確認しておく必要があります。この試験では、目的物質と交差反応物質との区別はできません。

交差反応性:	ストレプトマイシン	100%
	ジヒドロストレプトマイシン	69%
	ゲンタマイシン、ネオマイシン、 スペクチノマイシン、カナマイシン	< 1%

ELISA測定に際して、その品質を向上させるため”Good ELISA Practice (GEP) Manual”を参考にしております。r-Biopharm社のELISAキットを使用してELISA測定を行う際の最小限必要な条件が列記してあります。このELISA実践マニュアルについては、アツマックス㈱にお問い合わせください。

### 関連製品

RIDA ストレプトマイシン スパイク溶液(R3199)

### 1. 用途

RIDAスクリーン・ストレプトマイシンは牛乳や粉ミルク、ハチミツ、肉類、肝臓、腎臓、エビ、リンゴジュース中のストレプトマイシンの検出・定量分析のための競合酵素免疫測定法です。

### 2. 概説

ストレプトマイシンは乳腺炎の治療に $\beta$ ラクタム系抗生物質に次いでよく使用されます。休薬期間が守られていなかったり正しく使用されていなかったりすると、食品への残留が起ります。高濃度の場合、内耳神経毒性や腎毒性などの影響があります。食品中など、人が低濃度のストレプトマイシンに慢性的にさらされた場合、アレルギー症状を起こしたり、腸内フローラを壊したり、病原性細菌の薬剤耐性を引き起こします。消費者の健康リスクや製造上の問題回避のためにストレプトマイシンを高感度かつ簡単に検出する方法が必要です。EUでは乳肉への残留基準値が定められ、肉・肝臓で500 $\mu$ g/kg (ppb)、腎臓で1000 $\mu$ g/kg (ppb)、牛乳で200 $\mu$ g/kg (ppb)です。ハチミツについては、EURLでは最小検出性能 $\alpha$ =40 $\mu$ g/kg (ppb)の測定システムでの残留許容濃度ゼロ(zero-tolerance)を定めています。

### 3. 試験の原理

この試験は抗原抗体反応を利用しています。マイクロタイターストリップのウェルには抗ストレプト

マイシン抗体に対し特異的に結合する捕捉抗体をコーティングしてあり、すでにその補足抗体に結合した抗ストレプトマイシン抗体で機能化されています。ストレプトマイシン標準液または試料液、ストレプトマイシン酵素複合体を添加すると、フリーのストレプトマイシンとストレプトマイシン酵素複合体が抗ストレプトマイシン抗体の結合部位をめぐって競合します。同時に抗ストレプトマイシン抗体はウェルに固定された抗体により捕捉され固定化されます。次に未結合の酵素複合体や夾雑物を洗浄して除いた後、酵素基質液(過酸化尿素)と色素原液(テトラメチルベンジジン)をウェルに滴下インキュベートすると、ウェルにストレプトマイシン酵素複合体が固定化されていればその酵素の働きによって青色を発色します。反応停止液を添加すると色が青から黄色に変わります。450 nmの吸光度を測定します。吸光度は試料中のストレプトマイシンの濃度に反比例します。したがって、試料中のストレプトマイシンの濃度が高いほど吸光度は低くなります。

#### 4. キット内容

各キットには(標準分析を含む)96回の測定に必要な試薬が含まれています。

内訳	キャップの色	仕様/濃度	容量
マイクロプレート Microtiter Plate	-	即使用可	96ウェル
試料/バッファー Sample buffer	白	即使用可	50mL
標準1 Standard 1	白	即使用可 0 µg/L	1.3 mL
標準2 Standard 2	白	即使用可 0.5 µg/L	1.3 mL
標準3 Standard 3	白	即使用可 1.5 µg/L	1.3 mL
標準4 Standard 4	白	即使用可 4.5 µg/L	1.3 mL
標準5 Standard 5	白	即使用可 13.5 µg/L	1.3 mL
標準6 Standard 6	白	即使用可 40.5 µg/L	1.3 mL
洗浄/バッファー塩Tween Wash Buffer salt Tween		要溶解	
酵素複合体 Conjugate	赤	即使用可	6 mL
基質/発色液 Substrate/Chromogen	茶	即使用可	10 mL
停止液 Stop solution	黄	即使用可	14 mL

#### 5. 必要なもの(キットには含まれていません)

#### 5.1. 機器/器具:

機器/器具	粉ミルク	ハチミツ	肉、肝臓、腎臓、エビ	リンゴジュース
プレートリーダー(450nm)	○	○	○	○
メスピペット	○	○	○	○
20-200 µL、200-1000 µLの可変マイクロピペット	○	○	○	○
Vortex	○	○	○	○
遠心分離機		○	○	
振とう機		○	○	
ミキサー(ストマッカーなど)			○	
エバポレーター		○		

#### 5.2. 試薬:

成分名	ハチミツ
抽出バッファー	○
PBS-バッファー	○
100%(v/v)メタノール	○
RIDA C18カラム(R2002)	○

-抽出バッファー:50mMヘプタンスルホン酸/25mMリン酸三ナトリウム, pH2.0:  
2.0g ヘプタンスルホン酸ナトリウム塩(50mM) + 1.9g リン酸三ナトリウム12水塩(25mM)に蒸留水を加えて200mLとする。pHをリン酸でpH2.0に調整する。

-PBS-バッファー:  
0.55g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O + 2.85g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O + 9g NaClに、蒸留水を加えて1000mLとする

#### 6. 注意事項

この試験は、訓練を受けた試験室職員のみが携わって下さい。この取扱説明書には厳重に従って下さい。

このキットには、危険有害性物質が含まれている場合もありますので、このキットのSDS(MSDS)をご参照ください。アズマックス様にお問い合わせください。

#### 7. 保存条件

キットは2~8°Cで保存してください。凍結させないこと。

未使用のマイクロタイターストリップはホイルバッグに戻し、付属の乾燥材とともにシールして2~8°Cで保存してください。

赤い発色基質液は光に鋭敏なので、直射日光など強い光への曝露を避けてください。

有効期限を過ぎたキットの品質は保証できません。

異なるロット番号のキット間で個々の試薬を入れ換えしないでください。

#### 8. 試薬の不安定化または劣化の兆候

- 使用前に赤い発色基質液が青色に変わっている場合
- 標準1 (0 µg/L) の450nmの吸光度が0.6未満の場合

## 9. 試料の調製

試料は、冷所で保存してください。

### 9.1. ミルク (原乳、生乳、殺菌済、フルクリーム、スキム) 及び粉ミルク (スキムも)

- 粉ミルクは製造元の指示に従って溶解してください。
- 試料バッファーで10倍に希釈します。  
(例: ミルク50µL + 試料バッファー450µL)
- 1ウェルあたり50µLを測定に使用してください。

### 9.2. ハチミツ

- RIDA C18カラムのコンディショニングに使用するメタノール、蒸留水をご使用になる1時間前までに準備してください。使用前にVortexして気泡を除いてください。
- ハチミツ1gをバイアルにとり、抽出バッファー (5.2参照) を加えて10mLにします。
- ハチミツが完全に溶解するまで、振とうします。
- 遠心分離: 10分間/3000 X g/室温 (20-25°C)  
(遠心分離後は、上澄みは透明になります)

RIDA C18カラムによる抽出物の精製 (流速: 1滴/秒)

- カラムのコンディショニングのため、C18カラムに100%メタノール2mL、次に蒸留水2mLを通して洗浄する。
- コンディショニングが終わったら、上澄み液5mLをゆっくりカラムに通す。 (約15滴/分)
- 蒸留水3mLで洗浄する。
- 空気あるいは窒素を2分間カラムに通し残留水分を追い出す。
- 100%メタノール1mLでゆっくりと溶出する (約15滴/分)
- 溶出液を60°Cで、弱い気流、あるいは窒素気流を通して乾固する (訳者注: ローターも使えます)。
- 乾燥した残渣を2mLのPBSバッファー (5.2参照) に再溶解する
- 1ウェルあたり50µLを測定に使用してください。

### 9.3. 肉 (牛、豚、家禽)、肝臓、腎臓 (ブタ、ウシ) 及びエビ

- 試料を完全にホモジナイズします (スタマッカー、ミキサーなど)。
- ホモジナイズした試料5gに20mLの洗浄バッファーを加え10秒間Vortexします。
- 30分間振とうします。
- 遠心分離: 10分間/4000 X g/室温 (20-25°C)。
- 上清を洗浄バッファーで10倍に希釈する。  
(例: 上清50µL + 洗浄バッファー450µL)

- 1ウェルあたり50µLを測定に使用してください。

### 9.4. リンゴジュース

- リンゴジュース又はリンゴジュースの上澄みを試料バッファーで10倍に希釈します。  
(例: リンゴジュース50µL + 試料バッファー450µL)
- 1ウェルあたり50µLを測定に使用してください。

## 10. 測定手順

### 10.1 準備

使用前にすべての試薬を室温にします。

洗浄バッファーはPBS-TWEEN-Bufferを使用します。キットに入っている洗浄バッファー塩 (4.参照) から調製して下さい。袋の全量を1Lの蒸留水に溶かして下さい。その溶液は2-8°Cで4-6週間使用できます。

または: 袋の全量を100mLの蒸留水に溶かし、洗浄用緩衝液10倍液を調製します。使用する前に、これを10倍に希釈します。10倍液は室温 (20-25°C) で8-12週間保存できます。

### 10.2 試験手順

洗浄工程は記載されている方法に従って注意深くお願いします。途中でマイクロウェルが乾燥しないようにしてください。

1) 標準液と試料用に必要な数のマイクロタイターストリップをフレームに入れます。標準液と試料の位置を記録します。ウェルには直接記入しないでください。2連で行うことをお奨めします。

2) 50µLの各標準液又は調製した試料を (別々のストリップの2個) ウェルに加えます。

3) 50µLの酵素複合体を各ウェルに加え、机上で8の字を書くようによく混合し、室温 (20-25°C) で30分間インキュベートします。

4) ウェル中の液体を捨て、マイクロタイターストリップをフレームに入れたまま逆さまにし、吸水紙 (ペーパータオルなど) に少なくとも3回、よくたたきつけ、ウェルの液体を完全に除きます。全てのウェルに250µLの洗浄用バッファーを入れ、同様にして液体を除きます。この操作をあと2回繰り返します。

5) すべてのウェルに100µLの発色基質液 (茶キャップ) を加えます。8の字によく混合し、暗所、室温 (20-25°C) で15分間インキュベートします。

6) 各ウェルに100µLの反応停止液 (黄キャップ) を加えます。よく混合し、空気をブランクとして450nmの吸光度を測定します。読取りは反応停止液を入れてから、15分以内に行います。

## 11. 結果

別売りのELISAキットのデータ解析用ソフト RIDAソフト Win.net (Z9996:R-Biopharm社製) で結果が解析できます。キットに入っている品質証明書に標準液の検量線がありますのでご参考にさせていただきます。

### ソフトウェアをお持ちでない場合の計算法

標準液と試料に対して得られた吸光度の値の平均値を標準液1(ゼロ標準液)の吸光度の値で割り、100をかけます。従って、ゼロ標準液は100%となり、吸光度は百分率で表わされます。

$$\frac{(\text{標準液か試料の吸光度})}{(\text{ゼロ標準液の吸光度})} \times 100 \\ = \% \text{吸光度 (吸光度値比率)}$$

標準液の計算値を片対数グラフの縦軸、[μg/L]単位のストレプトマイシンの濃度を横軸(対数目盛)にして記入します。

試料中に実際に含まれるストレプトマイシンの濃度(μg/L, μg/kg)は、検量線から読み取られた濃度に試料の希釈係数をかけて求めます。本書の試料の調製法に従ったときの希釈係数は以下の通りです。

牛乳	=10
粉ミルク(溶解)	=10
ハチミツ	=4
肉、肝臓、腎臓、エビ	=50
リンゴジュース	=10

R-Biopharmはその製品が標準の品質であること以外には何ら明示的にも示唆的にも保証するものではありません。製品に不具合があれば、R-Biopharmは代替を提供いたします。この製品の商品性およびいずれの目的に対する適合性を保証するものではありません。R-Biopharmはこの製品の使用により生じる直接あるいは間接の費用や、特別あるいは甚大な損害を含むあらゆる損害に対し、その責を負うものではありません。以上は、その輸入販売を行うものも同様です。

本キットはドイツr-Biopharm社の製品で、アズマックス株式が輸入・国内販売しています。

**輸入元・販売元：アズマックス株式会社**

〒290-0044千葉県市原市玉前西1-6-13

**輸入・販売元：アズマックス株式会社**

**ご注文:お問合せ:アズマックス株式会社 東京営業所**

〒103-0025 東京都中央区日本橋茅場町3-2-10 鉄鋼会館5F

TEL.03-6661-1090 FAX.03-6661-1091 E-mail:sales@azmax.co.jp

### ご注意

- 吸飲したり、皮膚と接触したりすると有害である試薬類が含まれています。
- 使用前に、取扱説明書をよくお読みいただき、注意事項をお守りください。
- 責任ある管理者の指導のもとに、保護手袋、保護メガネ等を着用して取り扱ってください
- 開封後は、各容器を密閉し、取扱説明書とともに保管してください。
- 廃棄する場合には、衛生面、環境面に十分配慮し、法規を遵守してください。
- 身体に異常を感じた場合は、ただちに医師の手当を受けてください。
- テスト結果の判断と運用はすべてお客様自身の責任で行ってください。

### 保証について

アズマックス株式は、販売製造後1年以内あるいは記載有効期限のいずれか短い期間内に、キット添付の取扱説明書に基づき使用された場合において、製造物流保管等作業の不具合等による部材等の瑕疵に対してのみ補償いたします。

取扱説明書、ユーザーガイド、検査手順およびアプリケーションは、購入者のためのガイドラインとしてのみを目的として作成されておりますので、購入者の皆様には、各検査手順やそれぞれのアプリケーションにおいての妥当性を、自ら検証していただくようお願いいたします。テスト結果の判断と運用はすべてお客様自身の責任によるもので、この商品の使用によるすべての直接的および間接的な結果としての経済的損失や財産の損害などあらゆる損害に対し、明示的にもあるいは暗示的にも、一切補償するものではありません。また、なんら特定目的への適合性や商品性の保証も致しておりません。

補償に関する唯一の義務は、有効期限内において作業の不具合等による部材等の瑕疵が証明され弊社にすみやかに告知された場合のみであり、購入品あるいはその一部に対し、交換か返金がなされます。