

ELISA-TEK™ “RAW MEAT SPECIATION KITS”

ELISA-TEK™ 生肉種判別キット取扱説明書

アヅマックスコード(メーカーコード)

牛肉(510511)、豚肉(510521)、鶏肉(510531)、羊肉(510541)、馬肉(510551)、ミックス3種(牛、豚、鶏)(510503S3)、ミックス4種(牛、豚、鶏、羊)(510504S4)、ミックス3種(カスタム仕様)(510501S3C)、ミックス4種(カスタム仕様)(510501S4C)

(抄訳版:必ず原文をご確認ください。万一、本書の内容が原文と違う場合は原文を正とします。なお、仕様・価格は予告無く変更される場合があります。)

ELISA Technologies Inc.

(訳:アヅマックス株式会社)

はじめに

望まないあるいは忌避すべき種類の肉が混入されることを防ぐことは、経済・規制・健康・文化的理由から重要です。多くの国では、消費者が購入する肉が純正であり不当表示がないことを確かめるために肉種の同定試験が行われております。

本キットは、種に特異的な抗血清を利用した酵素免疫測定(ELISA)法に基づいています。本キットは、使いやすく洗練されていて、生の畜肉・鶏肉製品の内容物の種別を判定するようデザインされた高感度・特異的なキットです。

試験原理

本キットは、直接法による非競合法(サンドイッチ法)ELISA 法キットです。試料肉は挽いて食塩水で抽出します。抽出液を希釈したものを、あらかじめ精製された種特異的な血清アルブミン抗体をコーティングしたプラスチックのマイクロウェルに加えます。希釈された肉抽出液中のアルブミン濃度が増えると、ウェルに吸着した抗体と結合したアルブミンも増えます。反応が進んだ後、結合していない物質は洗浄によって除かれます。

抗体がコーティングされたウェルに結合したアルブミンを定量するために、一定量のペルオキシダーゼが結合した種特異的抗体(酵素複合体)と反応させます。インキュベーション後、結合していない余分な複合体を洗浄で取り除きます。結合しているペルオキシダーゼの反応を一定量の TMB 基質を加えて行います。25%リン酸を加えて反応を停止し、青色を生じさせます。発色は抽出液にもともとあったアルブミンの量に直接、比例するので、分光光度計かプレート・リーダーで肉の種別を定性的に測定することもできます。

安全上の注意

このキットを使用する際には、GLP(優良試験室規範)の手法に従って下さい。この規範に従えば試薬の人体に対する潜在リスクも小さくなります。防護服(必要ならば白衣、眼鏡またはゴーグル、手袋)を着用し、試薬を肌で触れたり、吸引したりしないようにして下さい。肌・眼に触れた場合には、洗浄措置を施して下さい。分析試料によるアレルギー・毒性・感染の潜在リスクにも留意して下さい。

キットの内容

留意事項

- A マイクロウェルモジュール: 8連ウェルのウェルストリップ 12 本
フレームに収められ乾燥剤とともにホイルパウチに入っています。各ウェルは、種に特異的な抗体が一定量塗布され、凍結乾燥され、種ごとに標識されています。
標識: COW(牛)、PIG(豚)、POU(鶏)、SHP(羊・山羊)、HRS(馬)
- B 種別アルブミン・コントロール: 2種(訳注: 牛肉用、豚肉用、鶏肉用、羊肉用、馬肉用では 2 種。ミックス3種では3種、ミックス4種では 4 種)
各種別の陽性コントロールのバッファー溶液(キャリア蛋白と保存料アジ化ナトリウム(0.04%)を含む)が各 2.0mL 含まれています。
それぞれのアルブミン・コントロールは陽性コントロールとして使用できます。一方で別の種のアルブミン・コントロールは陰性コントロールとして使用できます。(訳注: 例えば、牛肉検出試験では牛アルブミンを陽性コントロールとして、他のアルブミンを陰性コントロールとして使用できます。)しかし、試験目的に適した赤味肉組織の抽出液を陽性/陰性コントロールとして使用されることをお勧めします。
留意点: アルブミン・コントロールは希釈せずに、種に特異的な陽性反応が出ることを意図しています。アルブミン・コントロールは 100%肉組織陽性コントロール(9ページ参照)と等価ではありませんので、1%肉組織陽性コントロールを調製するためには利用できません。
- C ペルオキシダーゼ複合抗アルブミン抗体(ANTI-ALBUMIN PEROXIDASE CONJUGATES): 3個
複合抗体のバッファー溶液(保存料アジ化ナトリウム(0.04%)を含む)が各 3.6mL 含まれています。
- D 希釈用バッファー5倍濃厚液(ASSAY DILUENT CONCENTRATE): 1 個
ツーン 80 入りトリス緩衝生理食塩水5倍濃厚液が 20mL 含まれています。
- E 基質 TMB 液(TMB SUBSTRATE): 1 個
安定化 TMB が入った 12.0mL のバッファー液。
- F 反応停止液(STOP SOLUTION): 1 個
リン酸が 25%(w/v)入った蒸留水 12.0mL。
- G 洗浄液濃厚液(WASH SOLUTION CONCENTRATE): 1 個
トリス生理食塩水バッファーの 10 倍濃縮液が 100mL 含まれています。
- H 取扱説明書(英文、和文各 1 部)、ワークシート(英文)、結果報告書の例(英文)
注) アジ化ナトリウムは、濃度が 0.1%以下のため、毒劇物取締法には該当いたしません。

有効期限

未開封のキットの有効期限は、外側のラベルに表示されています。個々の内容物の有効期限はそれぞれのラベルに表示されています。一度開封した試薬は高温(室温)にさらすことを最小にして下さい。(留意点: 安定性試験で、ペルオキシダーゼ複合抗牛アルブミン抗体は冷蔵(2-8℃)保存で 6 か月間しか安定でないことが分かりました。)

キットの保存

- ELISA-TEKTM 生肉種判別キットは、冷蔵保存2-8℃してください。凍結厳禁。キットの試薬は試験前には冷蔵庫から取り出し室温(20-25℃)に戻します。使用しなかった分は直ちに2-8℃に戻します。
- 抗体塗布マイクロウェルモジュールは、乾燥状態でよく密閉して保存します。もし乾燥剤がピンクに変色した場合、乾燥剤を 100℃のオーブンで再乾燥できます(青色に変わります)。あるいは乾燥剤を交換するか、マイクロウェルモジュールを冷蔵(2-8℃)の乾燥室に保管してください。

抽出試料の保管

弊社単独での妥当性検証試験(In-house single lab validation testing)では、100%陽性、1%陽性組織試料抽出液を3~6回、凍結融解を繰り返した後、4℃で保管したところ3~7日間は安定でした。最適な結果を得るためには、試料は抽出したその日のうちに試験して、凍結融解を繰り返すのは避けてください。

キット以外に必要なもの

試薬： 精製水、塩化ナトリウム

機器： 遠心分離機(10,000xg)と適当な遠心管。(またはワットマン#4 または同等のろ紙)
ガラス製プラスチック製実験器具 1 式、メスシリンダー、肉抽出物容器、ピペット、包丁
マイクロピペット(エッペンドルフ 2233351 型かそれと同等の物)及び 25、50、100 μ 量が移送できるチップ。

マイクロウェル・プレートリーダー、450nm と 630nm のフィルターが装着された2波長測定ができるもの

その他のオプション機器： ブレンダー・ストマッカー・ホモジナイザー類とストマッカー袋(またはフワール・バッグ)

100 μ 用リピート式マイクロピペット(エッペンドルフ 22260006 型かそれと同等の物)
および同チップ、

100 μ 用マルチチャンネル式マイクロピペットおよび同チップ、

マイクロウェルウォッシャー(ヌンク社イムノ・ウォッシュ8型、Biotek 社 EL403 型、等)
または洗浄瓶でもよい。

操作上の留意点と注意

1. 本キットを操作する前に本取扱説明書を熟読して下さい。
2. 本キットは一つの統合ユニットとして使用されるよう設計され、内容物は正しい結果が得られるよう最適化されています。他のキットおよびあるいは他のロットの内容物と交換して使用すると、分析精度が低下する可能性がありますので、ご使用になれません。
3. マイクロウェルストリップは再使用できません。
4. 必ずしも無菌状態で操作する必要はありません。
5. すべての内容物はテスト開始前に室温(20-25°C)に戻して下さい。
6. 使用前に、ゆっくり、逆さにしたり揺らしたりを繰り返して、全ての試薬・試料を完全に均質にして下さい。振とうは厳禁です。
7. テストを開始したら、全てのステップを中断することなく完了させて下さい。
8. ウェル間の交差汚染がないように注意して下さい。それぞれの試薬・試料ごとにピペットのチップを入れ替えてください。指やピペットチップでウェルの上端に触れないようにしてください。
9. 複合体 Conjugate と基質 Substrate が混ざらないようにして下さい。両試薬を分注する際のプラスチック槽はそれぞれ別のものを使用するようにして下さい。
10. 交差汚染を避けるため、包丁、切断面、手はそれぞれの試料を扱うたびに完全にきれいにし、水ですすいで下さい。
11. ウェルの洗浄が不十分だと、結果に甚大な影響をおよぼします。
12. すべての試料は生あるいは未加熱のものでなければなりません。
13. フレームからはずしてもわかるようすべてのストリップの上端を鉛筆で番号付けすることをお奨めします。
14. 前述のとおり、目的にかなった種類の赤味肉組織抽出液を陽性、陰性コントロールとしてご使用になることをお奨めします。陽性アルブミン・コントロールは反応がうまくいっているか否か確認する為に使用します。

試料調製と抽出

抽出溶媒：

生理食塩水(0.9%塩化ナトリウムの脱イオン水溶液、例：塩化ナトリウム 9gを水 1Lに溶かす。)を食肉試料の抽出に使用します。必要に応じて、水を抽出溶媒に用いてもよいです。

試料調製：

ある種の試料(挽肉、機械的に骨を取り除いた肉)は、さらなる調製は不要です。肉のブロックや冷凍ブロック試料は使用前に、細断し、挽き、混合してください。試料をより細かく細断して均一化すればするほどに、より良い分析結果が得られます。

試料の抽出：

留意点： この試験法の感度のためには、試料の交差汚染を防ぐために十分な注意を払う必要があります。お使いになった装置、器具、容器、平面は、次の試料を分析する前に完全に洗っておくか、廃棄して下さい。

- サイコロ状に(または挽肉に)した試料を1g秤量し、清浄なストマッカー袋、フワール・バッグ、試験管またはビーカーに入れます。
- 生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム)の9mLを加えます。
留意点：検体の性質によっては、もっと大きな量の試料が適当で替わりの容器が必要な場合があります。もし、大きな量の試料を試験する場合には、生理食塩水の量もそれに比例して大きくする必要があります。(例、5gの試料には45mLの生理食塩水が必要になります。)
- 内容物を混合します。(例、内容物が入った袋をストマッカーに取付け、10秒間、処理します。)または、試験管に栓をして混合するか、ビーカーの内容液をホモジナイザーなどで機械的に混合します。
- 10分間、室温で静置する。
留意点：検体のタイプによっては、沈降した肉の層の上に、透明な層、または薄いスラリー状のものが見えることがあります。必要に応じて、抽出液をろ過(ワットマンろ紙又は0.45µmフィルター)または遠心分離(10,000xg, 10分)して清澄にしてください。試料に脂肪が多い場合は、10倍希釈の前に注意深く水層を取り出すのが適切です。(例、清浄なパスツールピペットを使用します。)
- 抽出した上清液を10倍に希釈します。(例、清澄な液体かスラリー0.1mLに0.9mLの調製済み希釈用バッファーを加えて、よく混合する。)
- 得られた希釈済み試料抽出液をELISA測定に使用します。

種特異的肉組織コントロールの調製

留意点：

●陽性、陰性の種特異的アルブミン・コントロールは、それぞれのキットに入っていて希釈を必要としません。それぞれの種特異的コントロールは、同一性試験では陽性コントロールとして異種性試験では陰性コントロールとして使用されます。(訳注：例えば牛アルブミン・コントロールは、牛肉検出試験では陽性コントロールとして、馬肉検出試験では陰性コントロールとして使用されます。)

●アルブミン・コントロールは100%陽性コントロール(9ページ参照)と等価ではありませんので、1%肉組織陽性コントロールを調製するためには利用できません。ゆえに肉組織コントロールは本試験法のコントロールとして最適です。

●肉組織コントロールを調製する際は、他種の肉との交差汚染がないように十分ご注意ください。つまり、肉組織コントロールを調製するための肉は、他の肉と接触しないように、および他の肉が接触した個所に接触しないようにしなければなりません。

100%肉組織コントロールの調製

- 赤味生肉をサイコロ切り・コマ切れ・みじん切りにする。
- 上記試料5gを量って、ストマッカー袋またはフワール・バッグに入れる。生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム水溶液)45mLを加える。
- ストマッカー袋をストマッカーに取付け、10秒間ホモジナイズする。
- ストマッカーから袋を取り出し、室温で10分間静置する。
- 必要に応じて、抽出液を遠心分離またはろ過して、清澄な液を得る。
- 抽出液を適当にラベルした(例、「生豚肉組織コントロール」、「年月日」)バイアルに入れる。
- この抽出液を調製済み希釈バッファーで10倍に希釈し、これを100%生肉組織コントロールとする。

1%肉組織陽性コントロールの調製

留意点：本キットは、産業規制上重大とみなされる量(通常約1%)の混入があった場合、明らかな青い発色があるように設計されております。他の種の肉がいろいろな濃度で混入していて、その中に問題となる肉を見つけるためには、1%生肉組織コントロールをご使用になることをお勧めします。

- 試験目的にかなう種の肉(訳注：馬肉検出試験の場合は馬肉)の抽出液(前項で希釈バッファーで希釈していないもの)を選びます。
- 抽出液の50µLをとり、生理食塩水(または、他種の生肉組織抽出液)を加えて5.00mLにします。
- これを調製済み希釈バッファーで10倍に希釈し、それを1%生肉組織コントロールとし、ELISA測定に用います。

キットの準備と試薬の調製

A. マイクロウェル・モジュール：ラベルがある側を上にして切れ目のところからアルミ袋を開きます。マイクロウェル・モジュールを取り出し、開口部を上にして台上に置きます。それぞれの試験数に応じて必要となるストリ

ップの数をフレームに取付けます。残りのフレームとストリップはアルミ袋に戻し、乾燥材が袋に入っていることを確かめ、ビニールテープで(のぞましくはヒートシールで)袋を密封してください。

B. アルブミン・コントロール: そのままでご使用になれます。

C. 抗アルブミン・ペルオキシダーゼ複合体: そのままでご使用になれます。

D. 希釈バッファー濃厚液: 希釈バッファー濃厚液は 5 倍濃厚液なので、蒸留水または脱イオン水で5倍に希釈する必要があります。(例、ボトル全量(20mL)に 80mL の水を加える。)調製済み希釈バッファーは、肉抽出液と試料の希釈にご使用になれます。

E. TMB 基質液: そのままでご使用になれます。

F. 反応停止液: そのままでご使用になれます。

G. 洗浄バッファー濃厚液: 洗浄バッファー濃厚液は 10 倍濃厚液なので、蒸留水または脱イオン水で 10 倍に希釈する必要があります。

96 穴の試験には、洗浄バッファー濃厚液 100mL に蒸留水または脱イオン水 900mL を加え、容器の上下を数回ゆっくりさかさまにして混合します。

試験数が少量の場合は、洗浄バッファー濃厚液を蒸留水または脱イオン水で 10 倍に希釈します。(例、24 穴の試験では、洗浄バッファー濃厚液 24mL に蒸留水または脱イオン水 216mL を加えます。)

ELISA 試験法の概略

操作	量	時間	内容
滴下	100 μ L		希釈用バッファー、コントロールないし試料抽出液をウェルに滴下
インキュベート		20 分	室温でインキュベート
洗浄			洗浄液で 3 回洗浄
滴下	100 μ L		ピペットでペルオキシダーゼ複合抗アルブミン抗体 Conjugate を全ウェルに滴下
インキュベート		20 分	室温でインキュベート
洗浄			洗浄液で 5 回洗浄
滴下	100 μ L		ピペットで TMB 基質液 Substrate を全ウェルに滴下
インキュベート		10 分	室温でインキュベート
滴下	100 μ L		ピペットで反応停止液 Stop Solution を全ウェルに滴下、ゆっくり8の字を書くように回転してまぜる。
結果			マイクロプレートリーダー(450nm,630nm 2波長)で測定しデータを解析する。

酵素免疫測定法(ELISA)手法の詳細

プレートの配置計画

本キットは 96 穴のマイクロモジュールを使用します。それは分析する試料の数によって分割できるストリップ方式になっています。試料とコントロールを入れるウェルを配置する計画を予め立てておくことは、重要です。配置計画は、試験する種ごとにウェルを割り当てるに必要なストリップの数を求めるのに必要です。また、試験結果を解析するのに、どのウェルにどの試料、どのコントロールが入っているか配置計画として記録しておく必要があります。

留意事項：本キットに慣れていない方は、少数の試験をされることをお勧めします。すべての試験は一連で、結果の記入にはキットに入っているワークシートをご利用になれます。スクリーニングには、各試料とコントロールは一連あるいは二連で試験されるのが適当でしょう。法令違反摘発のためには、各試料とコントロールは4連(n=4)で試験されるのが適当でしょう。(本書末尾の配置計画を参照)

1. 96 穴の配置を示すワークシートを置きます。それぞれの試料とコントロールの繰返し試験数(n)を決めます。ワークシートにそれぞれの試料とコントロールの位置を記します。
2. 試験目的にかなった種のコントロールとその数を決めてください。少なくとも一連の陽性・陰性アルブミン・コントロールまたは肉組織コントロールを必ず入れてください。理想的には、それぞれの試験ごとに、一つ以上の100%陽性組織コントロール、1%陽性組織コントロール、そして一つ以上の陰性組織コントロールを試験することが望ましいです。100%陽性組織コントロール、1%陽性組織コントロールは、分析対象の肉の抽出液から調製して下さい。つまり、鶏肉を検出したいときは鶏肉の抽出液から調製します。陰性コントロールは、分析目的としない肉を1種類以上(例、牛肉中の馬肉を分析する場合は牛肉と鶏肉)の抽出液を調製してご使用ください。

ELISA の詳細な試験手順

1. 試験する前に予めキットの箱から試薬を取り出し室温にしておきます。
2. あらかじめ調製しておいた肉組織コントロール、試料抽出液を冷蔵庫から出し、試験するときには室温になっているようにして下さい。
3. アルミ袋を開きます。プレート配置計画に従って、各種必要数のストリップをスペアのフレームに開口部を上にして取付けます。残りのフレームとストリップはアルミ袋に戻し、乾燥剤が中にあることを確認して注意深く密閉します。鉛筆でストリップ上端部に番号をつけ、フレームからはずしても判るようにします。
4. キットの試薬を調製します。(5ページを参照)
5. マイクロピペットでそれぞれのブランク用ウェルに調製済み希釈バッファー100 μ L を滴下します。
6. それぞれの陰性コントロール用ウェルに希釈済み陰性組織コントロール(または陰性アルブミン・コントロール)100 μ L を滴下します。
7. それぞれの1%陽性コントロール用ウェルに1%陽性組織コントロール 100 μ L を滴下します。
8. それぞれの100%陽性コントロール用ウェルに100%陽性組織コントロール(または、陽性アルブミン・コントロール)を100 μ L 滴下します。
9. それぞれの希釈済み試料抽出液 100 μ L を指定されたウェルに滴下します。
10. プレートを手で8の字を書くようにして混合し、覆いをします。室温で20分間、静置します。
11. 静置終了後、ウェルの内容液を適当な容器に振るようして廃棄します。(訳者注:その後、台上に敷いた吸水紙に数回叩き付けて、内容を完全に取り除く操作をした方が交差汚染が防げます。)そして洗浄ビンで、すべてのウェルに希釈済み洗浄バッファーを注意深く満たした後、再度内容液を廃棄して洗浄します。この洗浄/廃棄をさらに2(～4)回繰り返します。最後にプレートを逆さにし(あるいは吸引し)よく廃棄して、台上に敷いた吸水紙の上に数回たたき付けて、内容を完全に取り除きます。

留意事項：プレートを逆さにする前には、ストリップがフレームからはずれ落ちないように、長辺の中央部にストリップがしっかりとハマっているか確かめてください。

マイクロプレートウォッシャーやストリップウォッシャーを使用する場合には、洗浄液量をウェルあたり 300 μ L とします。洗浄/吸引を3回繰り返します。最後にプレートを逆さにし(あるいは吸引し)よく廃棄して、台上

にしいた吸水紙の上に数回たたき付けて、内容を完全に取り除きます。

12. 各該当種の抗アルブミン・ペルオキシダーゼ複合体溶液 100 μ L を、各該当種ストリップの各マイクロウェルに滴下する。各ストリップは上から下に順に操作します。種別が変わるごとにピペットチップは交換し、順次滴下して下さい。
13. プレートを手で8の字を書くようにして混合し、覆いをします。室温で 20 分間、インキュベートします。
14. インキュベーションが終わったら、ステップ 10 と同様に洗浄工程を繰り返します。(ただし、洗浄は5回して下さい。)
15. すべてのウェルに TMB 基質液をプレートの奥の列から手前まで連続して 100 μ L ずつ滴下して下さい。
16. プレートを手で8の字を書くようにして混合し、覆いをします。室温で 10 分間、インキュベートします。
17. 反応停止液 100 μ L を全ウェルに、奥のストリップから手前のストリップへ、手ばやく滴下します。
18. プレートを手で8の字を書くようにして混合し、発色反応を停止します。
19. 各ウェルの吸光度を 450nm と 630nm のフィルターが装着されたマイクロプレートリーダーで読みます。450-630nm の2波長で測定して下さい。反応停止液の滴下後、10 分以内に吸光度を測定して下さい。

試験結果の判定

試験の有効性の機器による判定

1. マイクロプレートリーダーを 450-630nm の2波長測定にプログラムして下さい。
2. マイクロプレートをプレートリーダーのキャリッジに置き、希釈バッファーが入ったブランク・ウェルから機器ブランクをとります。または、ステップ4で全てのウェルの吸光度を測定して、それぞれの試料やコントロールの平均吸光度からブランク・ウェルの吸光度を差し引きます。
3. それぞれのウェルの吸光度を読み取るかまたは、リーダーがプリントしたコピーをとります。
4. 陽性コントロール、1%陽性組織コントロール、陰性コントロールのそれぞれの平均吸光度を求めます。
5. それぞれのコントロールの繰り返し試験の標準偏差を求めます。

以下の場合、試験は有効と見なされます。

- a. ブランクを差し引いた 100%陽性組織コントロールの平均吸光度が 0.600 以上で、かつ
- b. ブランクを差し引いた1%陽性組織コントロールの平均吸光度が 0.250 以上で、かつ
- c. ブランクを差し引いた陰性コントロールの平均吸光度が 0.150 未満のもの

上記の条件に満たない場合、その試験は無効と見なされ、再試験が必要となります。

試験が有効と見なされた場合に、各試料は以下のように陽性か陰性か区別されます。

試験結果の機器による判定

- a. ブランクを差し引いた試料の平均吸光度が 0.150 以上の場合、陽性と判定されます。
- b. ブランクを差し引いた試料の平均吸光度が 0.150 未満の場合、陰性と判定されます。

本キットの性能の特性

本キットは既述のとおり使用された場合、検体に試験対象の肉が約1%以上のレベルで含んでいるか否かを定性的に検出することになります。

メーカー(ELISA technologies, Inc)では、4ページ(肉組織コントロールの調製)の方法で調製した生赤身肉の抽出液を陰性の肉の抽出液で 100 倍に希釈したときに陽性の結果が得られています。(すなわち問題の肉の含有が約 1%)。また、99g の生の羊肉に1gの生の豚肉を混ぜてから調製した抽出液は、強い陽性反応が

出ることを確認しています。

本キットの発色反応の強さは存在する抗原の量に比例しますが、本キットは定量測定を意図としてしたものではないことは、重要ですのでご理解下さい。結果の定量的解釈には、試料の成分の多様性(例えば、赤身の量、水分量、脂肪量など)、試料の取り扱いの多様性(例えば、保管温度、湿度、凍結の有無など)を考慮しなければなりません。

本キットは室温(20-25℃)で理想的な性能を発揮するようデザインされています。この室温の範囲外で操作する場合には、適宜インキュベーション時間を調整することが必要かもしれません。

キットおよび操作者が正しく機能・操作したとき、各肉種の陰性コントロールは肉眼で明らかに透明でなければなりませんし、一方、陽性コントロールは(反応停止液の滴下前)明らかな青色となります。

もしブランクや陰性コントロールが目に見える発色(450-630nm で 0.250 以上)を示した場合は、TMB 基質液の汚染か、ペルオキシダーゼ複合体の隣接するウェルへの飛散を示唆しています。このような陰性コントロールの発色はテスト操作上の問題点を示唆していますし、その結果の解釈には注意が必要です。

特異性

各種固有の試薬は、各肉種パネルに対しての交差反応のテストが行われ、異種試料に対しては陰性の結果を示しています。

ある種では卵、乳/粉乳、等があると、陽性を示すことがあります。それらには、その種の血清アルブミン蛋白が含まれているからです。

以下の表に、各キットのいろいろな種の肉、乳、卵などに対する反応性を調べた結果を載せました。

表1. 交差反応性/いろいろな肉組織コントロールによる干渉

試料	検査キット				
	牛用	豚用	鶏用	羊用	馬用
牛	+++++	—	—	—	—
豚	—	+++++	—	—	—
鶏	—	—	+++++	—	—
羊	—	—	—	+++++	—
馬	—	—	—	—	+++++
鹿	++	—	—	—	—
牛乳	++++	—	—	—	—
羊乳	—	—	—	++++	—
山羊	—	—	—	+++	—
山羊乳	—	—	—	+++	—
七面鳥	—	—	+++	—	—
アヒル	—	—	+++	—	—
卵(卵白・卵黄)	—	—	++++	—	—

—: 100%赤身筋肉組織コントロールに陰性を示した反応。

+++++: 最大の反応、+++ : 中程度の反応、

検出限界: すべての種の肉では1%未満。

牛乳、羊乳、山羊乳では5%未満。

試験ノートの一例 (英文取扱説明書の p17 をご利用ください。)

検出目的: 牛肉中の生豚肉

分析者: 牛山鶏子

年月日: 07-20-14

被検試料	
1	牛挽肉 # 1
2	牛挽肉 # 2
3	牛挽肉 # 3
4	牛挽肉 # 4
5	牛挽肉 # 5
6	牛挽肉 # 6
7	牛挽肉 # 7
8	牛挽肉 # 8
9	牛挽肉 # 9
10	牛挽肉 # 10
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	

プレートの配置計画(P6を参照すること)

- 1) コントロールと試料抽出液を用意する。4連で試験することにした。
- 2) 使用するストリップにマークする。

ストリップ番号	豚肉の検出に使用								不使用			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	bf	ch	#1	#3	#5	#7	#9				
B	B	bf	ch	#1	#3	#5	#7	#9				
C	B	bf	ch	#1	#3	#5	#7	#9				
D	B	bf	ch	#1	#3	#5	#7	#9				
E	1%	pk	sh	#2	#4	#6	#8	#10				
F	1%	pk	sh	#2	#4	#6	#8	#10				
G	1%	pk	sh	#2	#4	#6	#8	#10				
H	1%	pk	sh	#2	#4	#6	#8	#10				

- 3) 各種コントロールと試料抽出液の位置を記入する。

“B” : ブランクとして希釈バッファー、 “1%” : 1%陽性豚肉組織コントロール、
 ”pk” : 100%陽性豚肉組織コントロールでも豚アルブミンコントロールでも良い。
 “bf, ch, sh” は、それぞれ牛、鶏、羊のアルブミンコントロール。陰性コントロールとして使用。

操作記録 (P6-7を参照すること)

- 4) 時間と室温を記録する。

ステップ	添加操作	添加容量	インキュベーション時間	添加時刻	室温℃
4 ~ 7	試料液とコントロール	100 μL	20 分間	10:18	22.5
9	酵素複合体	100 μL	20 分間	10:42	22.5
12	TMB 基質	100 μL	10 分間	11:07	23.0
19	反応停止液	100 μL		結果読取	23.0

参考例 (英文取扱説明書の p18 をご利用ください。)

検出目的: 生豚肉 日付: 07-20-13

コントロール		試験した 肉の種	ブランクを差引いた 平均吸光度	標準偏差	有効性確認 100%陽性>0.600、1%陽性>0.2750	
種	記号					
バッファー	Bk	豚肉	0,044	0,002	-	有効
1%豚肉	1%	豚肉	0,427	0/002	+	
牛肉	Bf	豚肉	0,037	0,001	-	
豚肉	Pk	豚肉	1,065	0,014	+	
鶏肉	Ch	豚肉	0,043	0,002	-	
羊肉	Sh	豚肉	0,050	0,001	-	
試料の記号		試験肉種	平均吸光度(ブランク差引)	標準偏差	試験結果(陽性: >0.150)	
牛挽肉 # 1		豚肉	0,066	0,001	-	
牛挽肉 # 2		豚肉	0,046	0,001	-	
牛挽肉 # 3		豚肉	0,159	0,002	+	
牛挽肉 # 4		豚肉	0,046	0,001	-	
牛挽肉 # 5		豚肉	0,694	0,020	+	
牛挽肉 # 6		豚肉	0,058	0,002	-	
牛挽肉 # 7		豚肉	0,066	0,003	-	
牛挽肉 # 8		豚肉	0,850	0,013	+	
牛挽肉 # 9		豚肉	0,050	0,001	-	
牛挽肉 # 10		豚肉	0,461	0,005	+	

製造元：ELISA Technologies Inc.

販売元：アツマックス株式会社

〒290-0044 千葉県市原市玉前西 1-6-13

ご注文・お問合せ：アツマックス(株)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、取扱説明書等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

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いません。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、購入品あるいはその一部に対し、交換か返金がなされません。