

ELISA-TEK™ “COOKED MEAT SPECIATION KITS” ELISA-TEK™ 加工肉種判別キット取扱説明書

アツマックスコード

牛肉(6191L611)、豚肉(6191L621)、鶏肉(6191L631)、羊肉(6191L641)、馬肉(6191L651)、鹿肉(6191L661)、七面鳥(6191L671)、ミックス3種(牛、豚、鶏)(6191L601S3)、ミックス4種(牛、豚、鶏、羊)(6191L601S4)、ミックス3種(カスタム仕様)(6191L601S3C)、ミックス4種(カスタム仕様)(6191L601S4C)

メーカーコード

牛肉(510611)、豚肉(510621)、鶏肉(510631)、羊肉(510641)、馬肉(510651)、鹿肉(510661)、七面鳥(510671)、ミックス3種(牛、豚、鶏)(510603)、ミックス4種(牛、豚、鶏、羊)(510604)、ミックス3種(カスタム仕様)(510601)、ミックス4種(カスタム仕様)(510601)

ユーザーマニュアル

(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。)

* 飼料からの動物肉の検出(抽出や閾値など)については最終ページにコメントがあります。必ず、ご一読ください。

ELISA Technologies Inc.

(訳:アツマックス株式会社)

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・文化または宗教上の理由から重要です。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が行われております。

USDA(米国農務省)が開発し利用されている本キットは、熱に強い、種に特異的な、筋肉中の糖タンパクに対する抗体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、加工畜肉・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・特異的なテストです。本キットは、ポータブルにかつ使いやすく洗練されてきたもので、USDA-FSISの定めた加工肉種別判定ELISA法のプロトコルに準拠・凌駕し、使いやすく組み立てられています。本キットは、試料の母材が変わっても本取扱説明書のプロトコルで高い感度で判定できる柔軟性のあるキットです。

留意事項:

本取扱説明書にはUSDA-FSIS(米国農務省食品安全監視局)が発行したMicrobiology Laboratory GuidebookにあるRonald G. Bergerの”Identification of Animal Species in Cooked and Canned Meat and Poultry Products”(加工済み・缶詰の畜肉・鶏肉製品の動物種別の判定)の方法が入っています。この方法に従うことで、本キットの使用者は、USDA-FSIS公定法に沿った測定結果を得ることができます。

試験原理

本キットは、簡単な抽出と増幅・二重サンドイッチELISA法によって、調理済み・缶詰の畜肉・鶏肉製品の成分として使用されている動物組織の種の同定を行います。

このタイプのELISAでは、捕捉用の抗体がマイクロウェル底面のプラスチックに固着されています。試料の抽出物をウェルに滴下すると、もしテストされる種組織の抗原が存在すれば、ウェルの抗体によって捕捉されます。

未結合の内容物を洗浄で除去した後、捕捉抗体として同様に種に特異的な、ビオチン化抗体を滴下します。問題の種組織の抗原が既に結合されている場合のみ、このビオチン化抗体はウェル固相に結合します。そうでない場合、ビオチン化抗体は洗浄によって除去されます。

洗浄後、さらにストレプトアビジン-セイヨウワサビペルオキシダーゼ複合体をウェルに滴下します。すべての固相にあるビオチンはストレプトアビジン複合体と結合します。未結合の複合体は洗浄によって除去されます。洗浄後、ウェルに酵素に対する基質(ABTS)を滴下します。種組織の抗原が試料中に存在していたならば、基質に対する結合酵素の作用により緑色に発色します。緑色の発色は目でも読めますし、USDA-FSIS手順によればマイクロプレートリーダーを利用します。

留意事項:

本キットは内容肉種別の推定のための定性テストとして使用するよう意図されています。発色度合いは抽出物における抗原の量に比例しますが、試料中における種組織の定量検査に用いることはできません。試料の内容(枝肉量、水分量、脂肪量など)や試料の処理(調理時間、温度など)の違いが抽出物における抗原の量に影響します。すなわち抗原の量および発色の強さは試料の内容、加工その他の要因に関連します。

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)に従って下さい。この基準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。分析試料のアレルギー・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

本キットは分析目的の肉種によってキットの内容が異なりますのでご注意ください。

- 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。
- B 種別陽性コントロール:3個(ないしはそれ以上)
各種別の陽性コントロールのバッファー溶液が各 1.5mL 含まれています。(保存料アジ化ナトリウム 0.04% 含有)
- C ビオチン化 抗種別特異抗体:3個(ないしはそれ以上)
抗体のバッファー溶液が各 1.0mL 含まれています。(血清担体、保湿剤、保存料アジ化ナトリウム 0.04% 含有)
- D ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体:1 個
上記複合体のバッファー溶液が 6.0mL 含まれています。
- E 基質液 ABTS 濃縮液:1 個
ABTS(2,2'-アジノージ-(3-エチルベンゾチアゾリン スルホン酸) 1.5%水溶液が 1.1mL 含まれています。
- F 過酸化水素クエン酸バッファー:1 個
過酸化水素入りクエン酸バッファーが 12.0mL 含まれています。
- G 反応停止液:1 個
フッ化ナトリウム 1.5%水溶液が 6.0mL 含まれています。
- H 洗浄液濃縮液: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。
- I 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。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。

キットの保存

- ELISA-TEKTM 加工肉種判別キットは、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℃のオープ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。

試料抽出物の保存

試料抽出物は 2-8℃で 36 時間保存できます。保存をさらに長期化するには凍結して下さい。-20℃でおおよそ数ヶ月間は安定です。

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： ガラス製プラスチック製実験器具 1 式、試料の調製・抽出用器具、肉抽出物容器、ワットマン No.4 ろ紙あるいは同等品、25、50、100 μ l 用マイクロピペットおよび同チップ、マイクロウェル用洗浄ビン

留意点： USDA 法では 414nm(405–420nm)と 492nm(485–500nm)の2波長タイプのプレートリーダーを指定しています。)

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、遠心分離機と遠心管、25、50、100 μ l 用リピーター式マイクロピペットおよび同チップ、25、50、100 μ l 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

操作上の留意点・注意

1. キットを操作する前にマニュアルを熟読して下さい。
2. この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(21–25 $^{\circ}$ 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。**振とうしないで下さい。**
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・試料ごとピペットのチップは交換してください。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、ナイフ、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、結果に大きな影響をおよぼします。
12. すべての試料をよく加熱してください。非加熱試料、または加熱不十分が疑われる試料を試験する場合、試料を振とう、ろ過/遠心分離する前に、抽出物(肉と生食水の混合物)を 95–100 $^{\circ}$ Cのウォーターバスで 15 分間加熱することをお奨めします。
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。

試料調製と抽出 (飼料からの場合は最終ページをご参照下さい。: 訳者註)

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。

留意点： 感度の観点からこの段階での試料の相互汚染には十分注意して下さい。すべての機器・器材は、異なる試料を抽出するたびに、完全に洗浄するか、使い捨てとして下さい。

留意点： お客様が分析対象とする母材と同種の肉から、以下の試料の抽出法と同じ方法で、陰性コントロールを調製してください。

(訳者注: 例えば、牛肉中の豚肉の有無を試験したい場合は、100%牛肉を陰性コントロールとする。)

1. 検体試料をコマ切れ・みじん切りにします。
2. 上記試料 5g を、約 180mL 容量のストマッカー一袋にとります。
3. 生理食塩水(0.9%[0.15M]塩化ナトリウム水溶液) 10mL を加えます。
4. ストマッカーで 60 秒間ホモジナイズする。あるいは手もみでもかまいません。
5. ストマッカーから取り出し、室温で1時間静置します。

留意点： すべての試料は加熱済みであること。未加熱試料あるいは加熱不十分が疑われる試料を試験

する場合には、混合、遠心分離/ろ過する前の抽出物(肉/水の混合物)をウォーターバスで 95-100°C 15 分間加熱することをお奨めします。

留意点: 沈殿(肉)層の上部に澄んだ液層が現れますが、試料の種類によっては薄いスラリー状物質が得られます。必要ならば 6.の方法でろ過/遠心分離で抽出液をきれいにして下さい。

6. 液層部をワットマン No.4 ろ紙(または同等の物)でろ過する。あるいは、液層の一部を遠心管にとり、10,000xG で 10 分間遠心分離する。

7. 上清を組織抽出物として ELISA 検査に使用する。

留意点: 試料に脂肪が多く含まれる場合には、液層のさらに上部に脂肪層が現れますが、これを採取することは避けて下さい。液層をきれいなパストールピペットなどで採取し、きれいな容器に移し換え、それを分析して下さい。

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。以下の方法で、試料とコントロールを入れるウェルを配置する準備をすることは、重要です。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が必要ですが、本キットではキットの陽性コントロール(牛肉中の豚肉を分析する場合は豚肉)、または分析対象の赤味肉組織から「試料の前処理と抽出」記載の方法で調製した抽出液を使用します。1%陽性コントロールはキット中の適切な種の陽性コントロールまたは分析対象の赤味肉組織抽出液を 100 倍に希釈して(例:陽性コントロール 10 μ L + 990 μ L 生理食塩水)調製してください。陰性コントロールは、1種またはそれ以上のキットのコントロール(牛肉中の豚肉を分析する場合は牛肉)、または分析対象の母材と同種の赤味肉組織肉の抽出液を調製してご使用ください。それぞれのコントロールと試料抽出液を何連で試験するが決めてください。試料をスクリーニングする場合は、一連または二連での試験が適当でしょう。

留意事項: USDA-FSIS の試験法では、それぞれのコントロールと違反の可能性のある試料は、4連で試験する必要がありますとしています。

試薬類の調製

A マイクロウェルモジュール:

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。

B 種別陽性コントロール: そのまま 100%陽性コントロールとしてご利用になれます。1%コントロールについては希釈を要します。(例:100%コントロール 10 μ L を生理食塩水 990 μ L に溶かす。)

C ビオチン化抗種別特異抗体: そのままご利用になれます

D ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体: そのままご利用になれます

E/F 基質液 ABTS 濃厚液と過酸化水素クエン酸バッファー: 各々バイアルを逆さにして混ぜます。決して振とうしないで下さい。基質液 ABTS は 25 倍濃厚液です。過酸化水素クエン酸バッファーで希釈し、テスト用 ABTS 溶液を調製して下さい。

96 ウェル分: ABTS 濃縮液 500 μ L に過酸化水素クエン酸バッファー12.0mL を加え、蓋をし、繰り返し逆さにしたり、8の字を書いたりしてゆっくり混ぜます。

その他の場合: 必要量を過酸化水素クエン酸バッファーで 25 倍希釈して下さい。(8 ウェルの場合、過酸化水素クエン酸バッファー0.6mL をバイアルにとり、ABTS 濃縮液 25 μ L を滴下、蓋をし、8の字を書いてゆっくり混ぜます。

留意事項: 使用直前に希釈調製して下さい。例えば複合体滴下後インキュベーションの際など。

G 反応停止液: そのままご利用になれます

H 洗浄液濃縮液: 洗浄液濃縮液は 10 倍濃厚液です。純水で希釈し、ワーキング洗浄液を調製して下さい。

96 ウェル分: 洗浄液濃縮液 100mL に、脱イオン水 900mL を加え 1.0L となるようにして下さい。

ELISA 試験法の概略

| 操作 | 量 | 時間 | 内容 |
|---------|-------------|---|--|
| 滴下 | 100 μ L | | 生食水、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 | | 60 分 | 室温でインキュベート |
| 洗浄 | | | ワーキング洗浄液で 3 回洗浄 |
| 滴下 | 25 μ L | | ピペットでビオチン化種特異抗体をウェルに滴下 |
| インキュベート | | 60 分 | 室温でインキュベート |
| 洗浄 | | | ワーキング洗浄液で 3 回洗浄 |
| 滴下 | 25 μ L | | ピペットでアビジン酵素複合体 Conjugate をウェルに滴下 |
| インキュベート | | 30 分 | 室温でインキュベート |
| 洗浄 | | | ワーキング洗浄液で 6 回洗浄 |
| 滴下 | 50 μ L | | ピペットで基質液 Substrate をウェルに滴下 |
| インキュベート | | 30 分(ELISA-tek 法) または (USDA 法) 5-30 分 | 室温でインキュベート または、陽性コントロールの 414-492nm の吸光度が 0.45 から 0.50 の間になるまで室温でインキュベート |
| 滴下 | 50 μ L | | ピペットで反応停止液をウェルに滴下、まぜる |
| 結果 | | | マイクロプレートリーダー(414nm~492nm 波長)で測定しデータを解析する。 |

ELISA の詳細な試験手順

1. 試験する前に予め箱から試薬を取り出し室温にしておきます。
2. 試料の抽出(p3「試料調製と抽出」を参照)と、母材に適合した陰性コントロールの調製、試薬の調製などをします。(p4「試薬の調製」を参照)
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取り付けます。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. マイクロピペットでブランク用ウェルに生理食塩水 100 μ L を滴下します。

留意事項：以降、相互汚染をさけるため、各試料、各コントロールごとにチップを付け替えて下さい。

5. 陰性コントロール用ウェルに陰性コントロール 100 μ L を滴下します。
6. 1%陽性コントロール用ウェルに陽性1%コントロール 100 μ L を滴下します。
7. 100%陽性コントロール用ウェルに陽性コントロール 100 μ L を滴下します。
8. 試料抽出液 100 μ L を適宜ウェルに滴下します。脂肪が入らないようにして下さい。
9. 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 60 分静置します。
10. 静置終了後、ウェルの内容を適当な容器に振るようにして廃棄します。(訳者注:その後、台上に敷いた吸水紙に数回叩き付けて、内容を完全に除去し操作をした方が交差汚染が防げます。)そして洗浄ビンで、すべてのウェルに洗浄液を注意深く満たした後、再度内容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、内容を完全に除去します。

留意事項：プレートを逆にする前には、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、台上に敷いた吸水紙の上に数回たたき付けて、内容を完全に除去します。

11. 各該当種のビオチン化抗体 25 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。
留意事項：各ウェルの底面に液があることを確認して下さい。なければ、軽くフレームのふちを叩き、壁面に付着した液が底面に行くようにして下さい。壁面には液が残らないようにして下さい。(濡れていても構わない。)
12. 覆いをして、室温で 60 分インキュベートします。
13. 10.の洗浄を行います。
14. ペルオキシダーゼ複合体 25 μ L を各ウェルに滴下します。各ウェルの底面に液があることを確認して下さい。なければ、軽くフレームのふちを叩き、壁面に付着した液が底面に行くようにして下さい。壁面には液が残らないようにして下さい。(濡れていても構わない。)
15. プレートに覆いをして、室温で 30 分インキュベートします。
16. 10.の洗浄を行います。但し洗浄/廃棄の回数を 6 回にして下さい。
17. 基質 ABTS ワーキング液(希釈調製済み、p4「試薬の調製、E/F」参照)50 μ L を各ウェルに滴下します。
18. 覆いをして、室温で 30 分インキュベートします。
または、USDA 法では：
100%陽性コントロールが入ったウェルの色の変化を観察して、変化が見られたらプレートをリーダーに入れ 414-492nm の吸光度を測定します。それが 0.45 から 0.50 の範囲内かどうかを確かめます。
19. 反応停止液 50 μ L を各ウェルにすばやく滴下します。
20. プレートを手でゆっくり混合し反応停止液が行き渡るようにし、発色反応を停止させます。
21. アッセイ結果を、マイクロプレートリーダーで 414-492nm の吸光度を測定して判定します。

試験結果の判定

マイクロプレートリーダーのプログラムを、414nm(405~420nm の波長でも良い。)の吸光度を読み、その吸光度を 490nm(485~500nm の波長でもよい。)の吸光度で差し引くように設定します。

1. 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、生理食塩水が入ったブランク・ウェルから機器ブランクをとります。または、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。
2. それぞれのウェルの吸光度を読み取るかまたは、プレートリーダーがプリントしたコピーをとります。
3. 100%陽性コントロール、1%陽性コントロール、陰性コントロール、各試料をそれぞれ入れたウェルの吸光度からブランクの吸光度を差し引いた吸光度値を求めます。
4. 以下の方法で試験結果の妥当性の検証をします。
 - ELISA-tek 法：
ブランクを差し引いた 1%陽性コントロールの吸光度値が 0.250 より大きく、それぞれのブランク吸光度を差し引いた陰性コントロールの吸光度値は 0.150 以下でなければなりません。それぞれの試料の吸光度の繰返し標準偏差は 0.060 以下でなければなりません。
 - USDA 法：
ブランクを差し引いた 100%陽性コントロールの吸光度値が 0.600 より大きく、それぞれのブランク吸光度を差し引いた陰性コントロールの吸光度値は 0.060 以下でなければなりません。それぞれの試料の吸光度の繰返し標準偏差は 0.060 以下でなければなりません。

試験結果が以上の条件に合致すれば、その結果は有効です。そうでない場合は無効なので再試験してください。

5. 試験結果が上記の条件で有効と判定されたら、未知の試料は以下の通り分類できます。

○ ELISA-tek 法:

未知試料は以下の2つの基準のいずれかに分類されます。その試料にとってどちらが良いかはご利用になる方に任されています。ELISA technologies 社の試験室ではこのキットの妥当性を基準1で検証しています。

基準1 — ブランク吸光度を差し引いた試料の平均吸光度値から標準偏差の3倍を差し引いた値が0.250より大きければ、その試料は陽性です。それ以外は陰性です。

基準2 — ブランク吸光度を差し引いた試料の平均吸光度値から標準偏差の3倍を差し引いた値が0.100より大きく、それが陰性コントロール(キットに入っているものまたは自製のもの)の中で最も高い吸光度値に標準偏差の3倍を加えた値より高ければ、その試料は陽性です。

基準2をご採用になる際は、適切な母材の陰性コントロールを自製され、ご使用になるようお勧めします。

○ USDA 法:

ブランク吸光度を差し引いた試料の平均吸光度値から標準偏差の3倍を差し引いた値が0.250より大きければ、その試料は陽性です。それ以外は陰性です。この基準で陰性ではあるが ELISA-tek 法基準2で陽性になる試料は BRAL (Below Regulatory Action Level: 法的取締り基準以下)と、記録します。

(ここにある判定はあくまでも肉製品における異種肉混入に対する USDA の判定基準です。飼料の判定基準ではありません。飼料からの場合は最終ページをご参照ください。)

性能特性

このキットは既述のとおり使用された場合、USDA 基準の分類に合致した結果を出すことになり、調理済み/缶詰め肉・鶏内にテスト種肉を約1%以上レベルで含んでいることを検出することになります。

我々の実験では、コントロールの調製にある方法で処理した生枝肉の試料を陰性の肉の抽出物で1:100に希釈したときに陽性の結果を示しています。(すなわち問題の肉の含有が約1%)

このキットは室温(20-25°C)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、陽性コントロールを望ましい値(414nm で 0.600~0.900)にするために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、各種テスト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明らかな中間の緑色となります。

ブランクや陰性コントロールの目に見える発色(414nm で 0.250)は、隣接ウェルへの滴下の際の基質 ABTS 液のコンタミネーションかペルオキシダーゼ複合体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。鳥類(ニワトリ、カモ、メンドリ、ガン、アヒルなど)の試料はすべて、家禽類テストで陽性の反応をします。同様にバイソンはビーフテストで陽性の、ヤギはヒツジテストで陽性の反応をしめすでしょう。その他近隣種の反応の詳細はお問合せください。

プレートプランや結果表の例は本文をご参照ください。

免責事項

ELISA Technologies社は、製品が高品質の材料で製造されていること以外には何ら明示的にも示唆的にも、取り扱

い説明書に正しく従って加工肉特異抗原を定性的に検出する目的以外に使用されたことについては保証するものではありません。

材料や試薬の安全な取り扱い、適切な保管、普遍的な試験室安全プロトコル・方法も留意すべきことです。

本キットを目的外で使用することは目的外使用とみなされます。

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、特別な損害を含むあらゆる損害の保証は、ELISA technologies社の裁量する範囲に限られます。

以上は、その輸入販売を行うものも同様です。

製造：ELISA Technologies Inc.

販売：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、交換か返金が行なわれます。

ELISA-TEK 加工肉種検査キットによる動物性飼料、肉骨粉飼料の同定

ELISA Technology Inc.社

訳: アズマックス株式会社

飼料におけるマトリックスの検討

加工肉種検査用 ELISA キットは元来、肉製品・缶詰肉製品のコスト削減目的の混ぜ物を検出するために、米農務省(USDA)によって開発されました。この USDA のプロトコルにならって開発された ELISA-TEK 加工肉種検査キットは肉骨粉や動物性飼料に含まれる中身の同定にも使用できるでしょう。効果的な同定にはこれらサンプル中にあるマトリックスを考慮しなければなりません。

- (1) 典型的な飼料サンプルは加工肉に比べ、大幅に水分が少ない
- (2) また加工肉製品に比べ、高い温度で加工されている
- (3) 通常、抗原レベルが様々に異なる多くの種類の組織・副産物を含んでいる

通常これらの複合的な影響により、ELISA-TEK 加工肉種検査キットの飼料サンプルにおける感度は肉製品・缶詰肉製品よりも低下します。ELISA-TEK 加工肉種検査キットにより肉骨粉や動物性飼料を検査する場合には、ELISA の操作方法は変わりませんが、USDA の前処理方法やデータ解釈は以下のように修正されることをお奨めいたします。

ELISA 法検査における飼料サンプルの前処理

まず、標準の USDA 加工肉種検査用 ELISA 法にある抽出方法(食塩水(0.15M)を 1:2 の割合で加え抽出する)で飼料から抽出します。1:2 の割合では、すべての食塩水が完全にサンプルに吸収されてしまう場合がありますが、その場合は 1:3 まで食塩水を増やしてください。適度な上清が得られたら、その抽出液量を記録し、上清を ELISA 法に用います。それでも足りない場合には、適度な上清が得られるまで液量を増加して下さい。

混ぜ物検定のための閾値と検出限界としての閾値

USDA 法ではコスト削減目的の混ぜ物について、骨格筋赤身肉 1%を閾値としています。これは Berger らにより JAOAC Vol.71, No.2,1988, p406-409 で報告された 125-250ppm よりもかなり高い値です。一方、上述のように、典型的な飼料サンプルでは加工肉や缶詰製品よりも抗原の量は少なくなります。偽陰性の判定を減らし、かつ ELISA 法の感度を完全にいかすには、飼料中における動物肉種抗原が存在するか否かを判定するための閾値として、混ぜ物検定のための閾値よりも検出限界の閾値を使用されることをお奨めします。(すべてのサンプルで検出感度 125-250ppm を保証する意味ではありません: 訳者註)

飼料サンプルにおける検出限界としての閾値

Berger による加工肉種検査 ELISA では、各々の標準・サンプルの複数ウェルにおける吸光度の平均値と標準偏差から検出限界が計算されています。陰性コントロール吸光度の平均値にその標準偏差の 3 倍数を加えた値を閾値として、その値を超えたサンプルを肉種抗原陽性としています。

標準偏差を使わず簡単に行うには、陰性コントロールの吸光度に 2 あるいは 2.5 といった数をかけることで閾値をえることも考えられます。すなわち陰性コントロールの吸光度値の平均値の 2 倍あるいは 2.5 倍を超えたサンプルを陽性とします。