

コード番号: 1331P (R7001) (151009-171017)

RIDAスクリーン・グリアジン取扱説明書

(R-Biopharm社製)

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

RIDAスクリーン・グリアジンは、グルテンフリー表示食品中の小麦のグリアジン、ライ麦のセカリン、大麦のホルデンなどのプロラミン類を定量的に分析するサンドイッチ型酵素免疫測定法キットです。

R5抗体を用いたELISAキットであるRIDAスクリーン・グリアジンは、
-2012年1月にAOACのOMA(オフィシャル・メソッド)に認可され、
-AOAC RIIによって「性能検証済み試験法」(PTM)の認証を受け(第120601号)でおります。
また、コーデックス委員会(Codex Alimentarius)のオフィシャル・メソッド(タイプ1)でもあります。

本キットには、酵素免疫測定に必要なすべての試薬(標準を含む)が含まれていて、96回の測定(検量線分を含む)が行えます。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: ホモジナイズ、抽出
標準物質: 標準物質はプロラミン・ワーキング・グループによって検量されています。
所要時間: 試料の調製:約2時間(10試料あたり)
キットの操作:1時間30分
検出限界: グリアジン0.5ppm(mg/kg)(グルテン1ppm(mg/kg)に相当)
定量限界: グリアジン2.5ppm(mg/kg)(グルテン5ppm(mg/kg)に相当)
特異性: R5モノクローナル抗体により小麦のグリアジン画分やそれに相当するライ麦・大麦のプロラミン類と反応します。

使用している抗体に対する交差反応性は、純食品(例:コーンフラワー)について測定されました。混合/加工食品(例:コーンブレッド)については異なる場合もあります。干渉物質(例:ポリフェノール)は、スパイク試験により確認することができます。

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、アヅマックス様にお問い合わせください。

関連製品: RIDAスクリーンFASTグリアジン(1331PF)
RIDAスクリーン・グリアジン競合法(1330P)
カクテル溶液(R7006)
RIDA抽出溶液(カラーレス)(R7098)
グリアジン・アッセイ・コントロール(R7012)
RIDAスクリーンQuickグリアジン(1331PQ)
SureFoodアレルギー・クワント・グルテン(S3206)
SureFoodアレルギー・グルテン(S3106)

1. 用途

RIDAスクリーン・グリアジンは、そば、米、トウモロコシ、えん麦、テフ、スパイスなどの粉末から、あるいは麺類、冷凍食品、ベーカリー製品、ソーセージ、飲料、アイスクリームなどの加工食品から、小麦のグリアジン、ライ麦のセカリン、大麦のホルデンなどのプロラミン類を定量的に分析するサンドイッチ型酵素免疫測定法キットです。

すべての試料はカクテル溶媒(R7006、R-5メソッド法に基づくコーデックス公定法)またはRIDA抽出溶媒(R7099)で抽出されなければなりません。

2. 概説

小麦粉やグルテンには熱安定性その他の有用な性質(例えば、テクスチャー、保湿性、フレーバーなど)があるので、食品材料として極めて一般的であります。グルテンは小麦、ライ麦、大麦にあり、プロラミンとグルテリンの混合物です。

セリアック病は小腸に障害をもたらすグルテンに対する慢性の不耐症ですが、グルテンを避けた食餌を摂ることによって、回復する可能性があります。

コーデックス食品委員会(Alinorm 08/31/26)によれば、食品のグルテン量によって2種の表示が定められています。

- 食品中のグルテン含量が20ppm未満のものは“グルテンフリー”と表示して良い。
- 食品中のグルテン含量が20ppm以上で100ppm未満を“低グルテン食品”と表示して良い。というものです。

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グリアジンに対する特異抗体を塗布固着しています。各ウェルに、試料又は標準液を滴下すると、グリアジンがあれば、特異抗体に結合します。抗体に結合されない試料成分は洗浄段階で取り除かれます。その後、酵素ペルオキダーゼで標識した抗体(酵素複合抗体)を滴下して、ウェルに固定されたグリアジンに結合させます。(サンドイッチ的)

結合していない酵素複合体は洗浄で取り除かれます。酵素基質液と発色液を滴下、インキュベートします。結合した酵素複合抗体は無色の発色源を青色に変色させます。反応停止液によって、青色は黄色に変色します。450nm波長のフォトメーターで吸光度を測定します。吸光度は試料中のグリアジン濃度に比例します。

4. キットの内容

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
試料希釈バッファー Buffer	白	濃縮液	5倍 60 mL
標準1 Standard 1	透明	即使用可	0 ng/mL グ リアジン 1.3 mL
標準2 Standard 2	透明	即使用可	5 ng/mL グ リアジン 1.3 mL
標準3	透明	即使用可	10 ng/mL 1.3 mL

Standard 3			グリアジン	
標準4 Standard 4	透明	即使用可	20 ng/mL グリアジン	1.3 mL
標準5 Standard 5	透明	即使用可	40 ng/mL グリアジン	1.3 mL
標準6 Standard 6	透明	即使用可	80 ng/mL グリアジン	1.3 mL
洗浄バッファー* Wash Buffer	茶	濃縮液	10倍	100 mL
酵素複合体 Conjugate	赤	濃縮液	11倍	1.2 mL
基質液 Substrate	緑	即使用可		7 mL
発色液 Chromogen	青	即使用可		7 mL
停止液 Stop solution	黄	即使用可		14 mL

5. 必要な機器、試薬(キットには含まれていません)

5.1. 機器:

- マイクロプレートリーダー(吸光度計450nm)、
- 遠心分離機、ガラス製遠心管、
- シェーカー(上下交互の振とうができるもの)、
- ミル、ブレンダー、ホモジナイザー、または、乳鉢と乳棒等、
- 恒温水槽(50°C)
- メスピペット
- 20μL-100μL、200μL-1000μLの可変式マイクロピペットとチップ、

5.2. 試薬:

- 蒸留水または脱イオン水
- グルテンフリースキムミルク粉末(食品グレード)
- カクテル溶液(R7006)105mL: 試料調製用。
- エタノール水溶液(80%): カクテル溶液を用いた試料の抽出用。分析用エタノール120mL に蒸留水30mLを加えて作る。

6. 取扱上の注意

この試験は、よく習熟された方が行ってください。取扱説明書には厳格に従ってください。このキットには、有害な成分が含まれている場合があります。含まれている物質の危険、有害性情報は、この製品のSDS(安全データシート(MSDS))をご参照ください。詳細はアヅ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アルミ袋に戻し、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。
発色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。
期限の過ぎたキットは品質を保証できません。
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. 試薬の不良・劣化

- 発色液の使用前の着色(青)は劣化の恐れを示します。
- Standard#6(80ppb)標準液のテスト結果で吸光度が0.8未満($A_{450nm} < 0.8$)の場合、試薬の劣化の恐れがあります。

9. 試料の調製

9.1. 事前の注意

空気中の穀物粉や汚れた実験器具は、グリアジン測定にコンタミネーションをもたらします。そこで、事前に以下の点に留意して下さい。

- 測定を始める前にゴム手袋を装着し、測定が終わるまでそのままゴム手袋を着けて下さい。
- 実験台、ガラス器具、粉砕機等を40%エタノールまたは2-プロパノールできれいにして下さい。(5.2参照)
- 試料調製はELISA測定をする部屋とは別の部屋でおこなして下さい。
- 試薬や器具にグリアジンがコンタミしていないか、RIDAクイック・グリアジン(1332PQ)で調べて下さい。
- カクテル溶液には2-メルカプトエタノールが入っているので、ドラフト内で試験して下さい。
- 2-メルカプトエタノールはELISA測定を妨害する可能性があるため試料を少なくとも500倍に希釈して下さい。(約20mg/kgのグルテン量が予想される場合は500倍、約100 mg/kgのグルテン量が予想される場合は2500倍に希釈することをお勧めします。)

9.2. カクテル溶液(R7006)を用いた抽出法(AOACオフィシャル・メソッド)

充分な量の試料(最少で5gまたは5mL)を、固体ではよく挽いて粉末にし、液体では良く混合してホモジナイズします。

- 液体食品試料の場合: 0.25mLのホモジナイズした試料にカクテル溶液を2.5mL加え、栓をしてよく混合します。

- 他の食品試料(例: 大豆やキノアが入っている試料)の場合: 0.25gのホモジナイズした試料にカクテル溶液を2.5mL加え、栓をしてよく混合します。

- タンニン、ポリフェノールを含む試料(例: チョコレート、コーヒー、ココア、そば、くり粉、雑穀、香辛料を含んだ食品)の場合: ホモジナイズした試料0.25gを量り採り、0.25gの脱脂粉乳と2.5mLのカクテル溶液を加え、栓をして良く混合します。

- 食肉、ソーセージの場合: これらの試料ではグリアジンは均一に分散されていない可能性があります。従って、多めの50gの試料をホモジナイズし、0.25gを量り採り、2.5mLのカクテル溶液を加え、栓をして良く混合します。

- オーツ麦試料: グリアジンは均一に分散されていない可能性があり、ホモジナイズも簡単ではありません。従って、200gの試料をホモジナイズし、最低4倍量の試薬で抽出します: ホモジナイズ試料1gを量り採り、10mL

のカクテル溶液を加え、栓をして良く混合します。

その後は、全ての試料で以下のように処理します。

-50°Cで40分間インキュベートします。

-試料を室温に下げた80%エタノール7.5mL(5.2参照)を加え、良く混合します。(オーツ麦試料:80%エタノール30 mL)

-1時間室温で、容器の上下を交互に逆にするか、容器を回転して、振とうします。

-最低2500xgで室温中、10分間遠心分離します。そして/または、ろ過します。(または、抽出液2mLをマイクロ遠心機で室温で10分間、高速で遠心分離します。)

-上清をネジ蓋付き試験管に入れる。

-試料を希釈済み試料希釈バッファー(10.1参照)で少なくとも12.5倍に希釈(例: 80µL+920µL)します。最終希釈ファクターは少なくとも500となります。

-1ウェル当たり100µLの試料をELISA分析に直ちに使用します。

注記:遠心分離で得られた上清液はしっかり栓をして室温で暗所に置けば、8週間まで保管できます。

10. 酵素免疫測定手順

10.1. 試薬調製

使用前にすべての試薬を室温にします。

-**試料希釈バッファー:** 試料希釈バッファーは5倍濃縮液です。必要量のみ蒸留水で5倍希釈して下さい。(例: 濃縮液3mL+蒸留水12mLで10試料分)。バッファーが試料のグリアジンに汚染されないようにご注意ください。

-**酵素複合体:** 酵素複合体(赤キャップ)は11倍濃縮液です。希釈した酵素複合体液は不安定ですので、必要量のみ調製してください。分取するまえにピンを注意深く振ってください。濃縮液は蒸留水で11倍に希釈します。(濃縮液200µL+蒸留水2mLでストリップ2本分)水がグリアジンに汚染されないようにご注意ください。

-**洗浄バッファー:** 洗浄バッファーは10倍濃縮液です。使用前に濃縮液を蒸留水で10倍に希釈します。(濃縮液100µL+蒸留水900µL)希釈されたバッファーは20-25°Cで4週間安定です。濃縮液を希釈する前に、生じた結晶を37°Cの恒温槽で保温して溶かして下さい。

10.2. 試験手順

洗浄過程が最も重要ですから、以下のマニュアルに従って下さい。作業過程でウェルを乾燥させないように注意して下さい。

6本(48ウェル)以上のストリップを一回の試験で使用しないで下さい。6本以上のストリップを使用されたい場合には、未コートのマイクロプレートプレートをプレプレートとして使用され、時間のズレを防ぐようにしてください。標準や試料をプレプレートに分注(150µL以上)してから、8チャンネルピペットでコート済みプレートに素早く分注してください。

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。各々の標準と試料は複数ウェルで行います。
2. 100µLの標準液又は調製した試料を2連でウェルに滴下、30分間室温(20-25°C)でインキュベートします。
3. 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吸水紙(ペーパー

タオルなど)に3回続けてよくたたきつけ、ウェルの液体をよく除きます。すべてのウェルに250µLの希釈済み洗浄バッファー(10.1参照)を入れ、同様にして液体を除きます。この操作を3回以上繰り返します。

4. 100µLの希釈済み酵素複合体を各ウェルに加え振とう、30分間室温(20-25°C)でインキュベートします。

5. 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吸水紙(ペーパータオルなど)に続けて3回たたきつけ、ウェルの液体をよく除きます。すべてのウェルに250µLの希釈済み洗浄バッファー(10.1参照)を入れ、同様にして液体を除きます。この操作を3回以上繰り返します。

6. すべてのウェルに50µLの基質液と50µLの発色液を加えます。よく混合し、室温(20-25°C)で30分間暗所でインキュベートします。

7. 各ウェルに100µLの反応停止液を加えます。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添加後30分以内に行います。

11. 結果判定

RIDAスクリーンELISAキット商品群用のデータ解析ソフト“RIDAソフト Win”が、本キットでも使用可能です。計算は三次元多項関数(cubic spline function)で行います。

キットに入っている品質保証書に検量線が示されています。品質保証には、グリアジンアッセイコントロール(R7012)をお使いください。

標準液#1(0ppb)の450nmの吸光度が証明書の数よりもかなり高ければ、洗浄不足かグリアジンのコンタミが疑われます。

試料の吸光度が標準液#6の吸光度より高い場合は、試料をさらに希釈し、再試験して下さい。

試料に実際に含まれるグルテン濃度(µg/kg)を得るために、検量線から得られた濃度に希釈係数をかける必要があります。上述の前処理に従った場合の希釈係数は500です。グルテンの約50%がグリアジンです。したがって、計算された濃度にさらに2をかけることでグルテンの量が得られます。

例: 検量線から得られたグリアジン濃度が10µg/kgとします。希釈係数500をかけ、5,000µg/kgすなわち5 mg/kg(ppm)、0.0005%のグリアジン濃度となります。グルテン量を計算すると、2倍で10ppm、0.001%となり、20ppm未満なのでコーデックスの定義では“グルテンフリー”食品と表示して良いことになります。

一般的注意

本キットによる試験で陰性の結果が得られたとしても、検出限界以下のアレルゲンがある可能性や脂質のような他のアレルゲン成分を含んでいる可能性があります。

食品の多様性のため、マトリクス効果を排除することはできません。加工食品(加熱、脱水など)では、タンパク質は変性や断片化をされ、回収率/交差反応性に影響を与える場合があります。交差反応性の評価で1つの代表試料のみの結果では他の試料では違う結果になる場合があります。交差反応性及びマトリクスについては、妥当性試験データをご参照ください。

推奨

より正確な試験結果を出すためには、以下のことを推奨します。

-それぞれの試料について二連で分析してください。

-アレルゲンフリーの試料と、それにアレルゲンを添加した(スパイク)試料を、対照として試験してください。

-食品の多様性のため、マトリクス効果を排除することはできません。正確な結果を得るためにはスパイク試験をお勧めします。

結果の確認には、PCRをご使用ください。(例:SureFoodアレルギーQAUNTグルテン(S3206))

ビールやサワードウなどの食品の製造では、タンパク質が断片化されており、サンドイッチELISAでは値が低くなりますので競合法ELISA(RIDAスクリーングリアジン競合法(1330P))をお薦めします

RIDA抽出溶液(R7098)による抽出法についてはお問い合わせください。

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、アヅマックス株が輸入・国内販売しています。

なお御不明な点がございましたら下記にご連絡ください。

ご注文、お問合せ:

アヅマックス株式会社 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

輸入・販売元: アヅマックス株式会社 本社

〒290-0044千葉県市原市玉前西1-6-13

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

アヅマックス株は、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、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。