

コード番号: 1330P (R7021)(160921-170126)

SureFoodアレルゲンQUANTグルテン(realtimePCR)(S3206)

SureFoodアレルゲン・グルテン(realtimePCR)(S3106)

RIDAスクリーン・グリアジン競合法 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・グリアジン競合法は“グルテン・フリー”と表示された発酵食品や加水分解食品(例:ビール、でんぷん、スターチ・シロップ、麦芽エキス、サワードウ、醤油)の分析に使用されます。この競合法酵素免疫測定キットは小麦(グリアジン)、ライ麦(セカリン)、大麦(ホルデイン)からのプロラミンのペプチド断片を定量分析します。このキットに用いられているR5モノクローナル抗体は、プロラミン分子中に繰り返し表現されるQQPFPのペプチド配列を認識します。

R5抗体を用いたELISAキットであるRIDAスクリーン・グリアジン競合法は、
-2015年5月にAOACのOMA(オフィシャル・メソッド)に認可され、First Action Status
-AACCI(AACCI 38-55.01)により妥当性評価されています。

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(標準測定を含む)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
所要時間: 試料の調製:約30分(10試料あたり)
キットの操作:40分(インキュベーション時間)
検出限界: グリアジン 1.36mg/kg食品
定量限界: グリアジン 5 mg/kg食品
標準物質: RIDAスクリーン標準物質は小麦、ライ麦、大麦の混合物の加水分解物
特異性: R5モノクローナル抗体は、小麦のグリアジンやそれに相当する
ライ麦・大麦のプロラミン類の潜在的に毒性のある配列を認識します。

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㈱にお問い合わせください。

関連製品: RIDAスクリーン・グリアジン(1331P/R7001)
RIDAスクリーンFASTグリアジン(1331PF/R7002)
RIDAスクリーンQuickグリアジン(1331PQ/R7003,R7004,R7005)
カクテル溶液(R7006,R7016)
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)

1. 用途

RIDAスクリーン・グリアジン競合法は“グルテン・フリー”と表示された発酵食品や加水分解食品(例:ビール、でんぷん、スターチ・シロップ、スターチ、麦芽エキス、サワードウ、醤油)の分析に使用されます。

2. 概説

食品中に小麦粉とグルテンを使用することは、熱安定性や、その結合・膨張といった物理化学的性状を改良するために、ふつうによく用いられます。グルテンは小麦、ライ麦、大麦にある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元に戻る可能性があります。

コーデックス食品委員会(Alinorm 08/31/26)では、

1. 食品中のグルテン含量が20ppm未満のものを、「グルテン・フリー食品」と、
2. 食品中のグルテン含量が20ppm以上で100ppm以下のものを「低グルテン食品」と、

表示して良いとしました。

グルテン分析のコーデックス委員会の公式な標準試験法は、R5抗体(Mendez抗体)を用いたELISA法とされています。この要求事項を満たしたELISAキットは、サンドイッチ法のRIDAスクリーン・グリアジン(1331P)と、本キットRIDAスクリーン・グリアジン競合法(R7021)です。

発酵や加水分解などの食品加工工程で、インタクトなプロラミン分子は部分的にまたは完全に小さいペプチドの断片に分解されます。セリアック病患者にとってはそれらの断片も、胃でさらに分解されても有害です。サンドイッチ法ELISAは少なくとも2個以上のエピトープが必要なため、ひとつの小さいペプチド配列(モチーフ)を検出することが出来ません。しかし、競合法フォーマットならば、小さいペプチド断片を検出できます。本キットRIDAスクリーン・グリアジン競合法(R7021)には新しい標準物質が入っています。この標準物質は、小麦、ライ麦、大麦をペプシンやトリプシンで消化し、それらのペプチド断片を混合して、タンパク量測定の後に、凍結乾燥したものです。タンパク量測定はDumasの方法で行いました。

この試験法はプロラミン濃度に関連しているため、コーデックス委員会の限界値にも関連しています。分析結果はmg/kg(ppm)グリアジンと表します。この標準物質はドイツ食品化学研究センター(German Research Centre for Food Chemistry)のDr. Köhler教授のワーキング・グループによって作られました。

3. 試験の原理

本試験法は抗原抗体反応の原理に基づいています。マイクロタイターストリップのウェルには抗原としてグリアジンが塗布固着されています。標準液(小麦、ライ麦、大麦の混合物を加水分解したもの)または試料液と、ペルオキシダーゼで標識された抗グリアジン抗体(モノクローナルR5抗体)とを同時に各ウェルに滴下します。すると、遊離のグリアジンと固定化されたグリアジンがグリアジン結合サイトをめぐって競合します。洗浄段階で溶液中の抗原と結合した酵素複合体は取り除かれますが、プレートの抗原と結合した酵素複合体は残ります。各ウェルに発色基質液を滴下、インキュベートします。結合した酵素複合体は発色基質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あるいはプロラミンの濃度に反比例します。

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
試料希釈/バッファー Buffer	白	濃縮液	5倍
標準1 Standard 1	透明	即使用可	0 ng/mL
標準2 Standard 2	透明	即使用可	10 ng/mL
標準3 Standard 3	透明	即使用可	30 ng/mL
標準4 Standard 4	透明	即使用可	90 ng/mL
標準5 Standard 5	透明	即使用可	270 ng/mL
洗浄/バッファー* Wash Buffer	茶	濃縮液	10倍
酵素複合体 Conjugate	赤	濃縮液	11倍
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

*この洗浄/バッファー濃縮液には、毒物劇物取締法に該当するチメロサール(毒物)が0.1%以下含まれていますので取扱、保管、廃棄等については法令に従ってください。

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、
- メスピペット
- 20 μ L-100 μ L、200 μ L-1000 μ L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
- スターチやシロップなどの試料の抽出にはエタノール水溶液(60%)が必要です。例:分析用エタノール150mLに蒸留水100mLを加え良く振とうして作る。

-ビール、麦芽、ホップなどポリフェノールを含む試料の抽出には10%魚ゼラチン液が入ったエタノール水溶液(60%)が必要です。:作成法の一例: 魚ゼラチン液(Serva, 22156またはSigma,G-7765)10gを30mLの蒸留水に溶かし、100mL容のメスシリンダーに入れ、次に分析用エタノール60mLを加えます。pHを8.5に調製した後、蒸留水を加えて100mLにする。魚ゼラチンは、60%エタノールには、完全には溶解しないので、攪拌しながら試料調製に必要な量を取ってください。魚ゼラチンエタノール溶液は、室温で2週間保存できます。

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。

注) 洗浄/バッファーにはチメロサール(<0.1%)(毒劇物取締法の毒物に該当)が含まれていますので法規に則ってお取り扱いください。

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stripp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#1 (0ppb)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。

9.2. 試料の抽出

カクテル溶媒で抽出した試料は本キット(RIDAスクリーン・グリアジン競合法)には使用できませんので、それぞれの試料ではエタノール抽出をご使用下さい。

試料希釈/バッファーは、5倍濃縮液です。実際に必要な分のみを蒸留水で希釈して下さい。(例、3mLの濃縮液に12mLの蒸留水を加えると、10検体の試料に使用できる量になります。)バッファーが試料のグリアジン

に汚染されないようご注意ください。

代表試料5～50gをホモジナイズします。

-**固体試料(例:スターチ、スターチ・シロップ)**:ホモジナイズした代表試料1gを量り採り、60%エタノール10mLと混合します(5.2参照)。

-**ポリフェノールを含む固体試料(例:麦芽、ホップ)**:ホモジナイズした代表試料1gを量り採り、10%魚ゼラチン入り60%エタノール10mLと混合します(5.2参照)。

-**液体試料の場合(例、醤油)**:1mLの試料に60%エタノール9mLを加え混合します(5.2参照)。

-**ビールの場合**:1mLの試料を9mLの10%魚ゼラチン入り60%エタノールと混合します(5.2参照)。

以下は、すべての試料について同様に実施します。

-30秒間以上、完全に振とう混合します。(できればヴォルテックス・ミキサーで)

-さらに容器の上下を交互に逆にして10分間振とうします。

-最低2500xgで室温(20-25°C)中、10分間遠心分離又はろ過します。(または、試料液2mLをマイクロ遠心機で高速で10分間遠心分離します。)

-上澄み液を希釈済み試料希釈バッファーで50倍に希釈します。(10.1参照)(例:上清20μLに試料希釈バッファー980μLを加える)

-1ウェルあたり50μLをアッセイに用います。

注意:遠心分離の後で得られた全ての上清液は、バイアルの蓋をしっかりと閉めて、暗所で、室温で、4週間保管できます。

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。

-**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。分取するまえにビ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。

酵素複合体液、基質/発色液、停止液の分注には、時間のズレを防ぐため、マルチチャンネルやステッパーピペットのご利用をお勧めします。

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. 50μLの標準液又は調製した試料を2連でウェルに分注します。

3. 50μLの希釈した酵素複合体(10.1を参照)を各ウェルに入れ、手でプレートをゆるやかに振とうしながら混合した後、30分間室温(20-25°C)で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。この操作をあと2回繰り返します。

5. すべてのウェルに100μLの基質/発色液を加えます。よく混合し、室温(20-25°C)で10分間暗所でインキュベートします。

6. 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10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“RIDASOFT Win/RIDASOFT Win.net”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。

検量線から得られたグリアジン濃度ng/mL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。RIDASOFT Winでは、この希釈係数500が既定値としてセットされています。RIDASOFT Win(Ver.1.93以降)では、結果はグリアジンとグルテンで表示されます。R5抗体は、グリアジン、セカリン、ホルデインを検出します。

グルテン濃度を求めるには、さらに2をかける必要があります。しかしながら、このファクターは分析すべき試料によって変わります。特にデンプンでは、洗浄の度合いが多いほど、試料中のグルテリン濃度が高くなります。この場合、ファクターはより大きくなり、従ってグルテン濃度も高くなります。

例: 検量線から得られたグリアジン濃度が50ng/mL(ppm)とします。希釈係数500をかけ、25,000ng/kgすなわち25mg/kg(ppm)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50mg/kg(ppm)となります。

背景情報:

次の表は、加水分解試料の測定精度を示したものです(詳細は、JAOAC.Int.98:1346-1354, 2015で公表されています)。

(表省略:英文をご参照ください)

-このキットで使用している標準のペプシン/トリプシン消化は、すべての加水分解プロセスを代表するものではありませんので、特殊なプロセスについては性能確認されることをお勧めします。

-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。

-加熱処理試料のエタノール抽出では、回収率が低くなる場合があります。そのような試料ではカクテル溶液で抽出するサンドイッチELISA法によるグリアジン測定をお勧めします。

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。

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

-正確な結果を得るためにはスパイク試験をお薦めします。

-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))

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。