

コード番号 R4912 (171123-180209)

RIDAスクリーン FAST β -ラクトグロブリン取扱説明書

(r-Biopharm社製)

(必ず原文をご確認ください。本取扱説明書が原文と、万一内容が異なる場合は原文を正として下さい。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 FAST β -ラクトグロブリン(R4912)は、飲料や食品中の天然及び加工 β -ラクトグロブリン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。

低アレルゲンベビーフードなどの加水分解乳製品中の β -ラクトグロブリンの検出には、競合法ELISAのRIDAスクリーン β -ラクトグロブリン(1313P(R4901))をお薦めします。

食品中のカゼインやカゼイン塩の検出には、RIDAスクリーンFASTカゼイン(1312PF(R4612))またはRIDAスクリーンFASTミルクをお薦めします。

酵素免疫測定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(48回の検定分、検量線分を含む)。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: ホモジナイズ、抽出、

所要時間: 試料の調製: 約45分(10試料あたり)

キットの操作: 30分(インキュベーション時間)

検出限界: β -ラクトグロブリンとして0.04mg/kg(ppm)、マトリクスにより0.02-0.07mg/kg

定量限界: β -ラクトグロブリンとして0.167mg/kg(ppm)

回収率: 100% β -ラクトグロブリン

約100% 粉ミルク、スキムミルク粉、UHTミルク

約120% 生乳、全乳

約80% 乳清粉末

特異性: 本抗体は、牛乳の β -ラクトグロブリンを特異的に検出します。羊、山羊、バッファローの乳に対する交差反応があります。

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。このキットの開発において、70以上の交差反応について検討されました。詳細は、改訂版妥当性試験データをご参照ください。

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FASTミルク(R4652)

-RIDAスクリーンFASTカゼイン(1312PF/R4612)

-RIDAスクリーン β -ラクトグロブリン(1313P/R4901)

-RIDA 抽出液 2(R4613)

-bioavid ラテラルフロー ミルク(BL613-10/BL613-25)

-MoniQA ミルク標準セット(4種)(MQA 122016)

1. 用途

RIDAスクリーン FAST β -ラクトグロブリンは、ライスクリスピー、チョコレート、ソーセージなどの食品中の天然及び加工 β -ラクトグロブリン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。

2. 概説

ミルクには3.2%のタンパク質があり、そのうち10%が β -ラクトグロブリン(乳清蛋白の主成分)で、80%が β -ラクトグロブリンです。最も重要な(特に小児にとって)アレルゲンは β -ラクトグロブリンですが、成人するに従って β -ラクトグロブリンが主たるアレルゲンとなります。

アレルゲンは食品成分としてまたは原材料や加工品中のコンタミとして存在する可能性のある成分です。ミルク及び乳製品は、EU 規則 No.1169/2011に従って、食品に表示しなければならなくなりました。同様の規制が、米国、カナダ、オーストラリア、ニュージーランドでもあります。

3. 試験の原理

マイクロタイターストリップのウェルには、 β -ラクトグロブリンに対する特異抗体を塗布固着しています。各ウェルに、試料ないし標準液を滴下すると、 β -ラクトグロブリンがあれば、特異抗体に結合し、抗原-抗体複合体を形成します。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(酵素複合体)を滴下して、ウェルに固定された抗原-抗体複合体に結合させ、抗体-抗原-抗体複合体(サンドイッチ)を形成します。

結合していない酵素複合体は洗浄で取り除かれます。次に発色基質液を滴下、インキュベートします。結合した酵素複合抗体は発色基質液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 β -ラクトグロブリン濃度に比例します。結果は、 β -ラクトグロブリン mg/Kgで表されます。

4. キットの内容

各キットには(標準分析を含む)48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	48ウェル	
抽出液2 Extractor 2	青	濃縮液	2倍	30 mL x 3
アレルゲン抽出バッファー Allergen extraction buffer	緑	濃縮液	10倍	100 mL
添加剤 1 Additive 1	青			2g
標準1* Standard 1	透明	即使用可	0 mg/kg	1.3 mL
標準2* Standard 2	透明	即使用可	0.167 mg/kg	1.3 mL
標準3* Standard 3	透明	即使用可	0.5 mg/kg	1.3 mL

Standard 3				
標準4*	透明	即使用可	1.5 mg/kg	1.3 mL
Standard 4				
標準5*	透明	即使用可	4.5 mg/kg	1.3 mL
Standard 5				
洗浄バッファー Wash Buffer	茶	濃縮液	10倍	100 mL
酵素複合体 Conjugate	赤	即使用可		7 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

*): 希釈ファクターの100倍が考慮されているので、標準曲線から得られた値がそのまま試料中のβ-ラクトグロブリン濃度になります。

5. キットに含まれない必要なもの

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、遠心管、
- ウォーターバス(60°C、100°C)
- ろ紙、
- 20-200μL・200-1000μLの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
- 1M 塩酸(HCl)
- 1M 水酸化ナトリウム(NaOH)
- 松の実の抽出:牛血清アルブミン(BSA、プロテアーゼフリー)

6. 取扱い上の注意

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。詳細はアズマックス様にお問い合わせください。

注)本製品の抽出液2Iには、毒劇物取締法の劇物に該当する2-メルカプトエタノール(2.5-5.0%)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保存してください(2~8°C)。

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。

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. 不良・劣化

-発色基質液が使用前に既に青く着色していたら、劣化している恐れがあります。

-標準5(Standard 5)のテスト結果で吸光度が1.2未満の場合($A_{450nm} < 1.2$)、試薬の劣化の恐れがあります。

9. 試料の調製

使用される前にすべての試薬を室温(20~25°C)に戻してください。

試料の調製に使用されるミル、ガラス容器、スパチュラなどの器具は、使用前、使用後に洗浄して試料の相互汚染が生じないように注意してください。A-AEPは、使用時に60°Cのウォーターバスで加温してください。(100°Cのウォーターバスは、試料の抽出に使用します)

-アレルギー抽出バッファー

本キット中のアレルギー抽出バッファーは10倍濃縮液です。希釈の前に37°Cの水浴に入れて、生成した結晶を溶かし、よく混合してください。温めた10倍濃厚液を蒸留水で10倍に希釈(例、濃縮液100mLに蒸留水を900mL加える)してください。希釈されたアレルギー抽出バッファーは20~25°Cで約4週間、安定です。

-添加剤1入りアレルギー抽出バッファー(A-AEP)

添加剤1入りアレルギー抽出バッファー(A-AEP)を調製するために、添加剤1の1.35gをガラス製ビーカーに採り、1Mの水酸化ナトリウム(NaOH)を15mL加え、添加剤1が溶けるまでかき回します。次に、メスシリンダーに希釈済みアレルギー抽出バッファーを700mL入れます。それに添加剤1液15mLをかき混ぜながらゆっくり加えます。希釈済みアレルギー抽出バッファーでビーカーを洗いその液も加えます。1M塩酸(HCl)でpH9に調整した後、希釈済みアレルギー抽出バッファーで全量を750mLにします。750mLのA-AEPバッファーで45試料の分析ができます。このバッファーは室温(20~25°C)で3週間保存できます(冷蔵保存はしないでください)。ダストによる結晶の発生を防ぐためきれいな容器に入れてください。結晶が発生したらそのバッファーは廃棄して下さい。

-抽出液2

抽出液2は2倍濃縮液としてキットに入っていますので、蒸留水で2倍に希釈してください。(例:抽出液2の30mLを30mLの蒸留水と混合。)この希釈済み抽出液2は、45試料の分析が可能で、室温(20~25°C)で3ヶ月間保存できます。

9.1. 抽出液2による試料抽出

-代表試料(5-50g)をホモジナイズします。

<固体試料>

-試料1gをバイアルに量り採り(松の実には、0.5gのBSAを加えます)、希釈済み抽出液2(9.参照)を4mL加え、良く混合します。バイアルに栓をして、100°Cのウォーターバスで10分間、加熱します。

- 短時間、冷却します。(約60°Cになるまで)
- A-AEPを、60°Cに予備加熱します。
- 60°Cに加熱したA-AEPバッファー(9.参照)16mLを加えます。

<液体試料>

- 試料1mLをバイアルに量り採り、希釈済み抽出液2(9.参照)を4mL加え、良く混合します。バイアルに栓をして、100°Cの水浴で10分間、加熱します。
- 短時間、冷却します。(約60°Cになるまで)
- A-AEPを、60°Cに予備加熱します。
- 60°Cに加熱したA-AEPバッファー(9.参照)15mLを加えます。

<固体試料、液体試料共に下記の操作を行います>

- 振とう機で激しく振とうします。
- 60°Cの水浴で10分間、抽出します。
- 氷浴で室温まで冷やします。2500xg、10分間遠心分離又はろ過します。(または2mLをマイクロ遠心管にとってマイクロ遠心機にて10分間、高速で遠心分離します。)
- 上澄み又はろ液を希釈済みアレルゲン抽出バッファー(添加剤1(9.参照)を含まないもの)で5倍(1+4)に希釈します(ソーセージなどの試料は、純水で希釈します)。(例、ろ液100μLにバッファーを400μL加える。)
- 注:この希釈した上澄みを直ちに測定します(30分以内)。時間が経つと回収率に影響があります。
- 1ウェルあたり100μLをアッセイに用います。

最終希釈前の抽出試料は、室温で4時間程度保存できます。

抽出液2による試料抽出液は、RIDAスクリーンFASTミルク(R4652)やRIDAスクリーンFASTカゼイン(1312 PF/R4612)の測定でも使用できます。

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(20-25°C)にします。

洗浄バッファーは10倍濃縮液です。希釈する前に37°Cの水浴で沈澱している結晶を完全に溶かして、良く混合して下さい。濃縮液は蒸留水で10倍に希釈します。(濃縮液100mL+蒸留水900mL)希釈されたバッファーは20-25°Cで約4週間安定です。

10.2. 試験手順

3本(24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。3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下さい。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下さい。

酵素複合体、基質発色液、停止液もピペットされることをお勧めします。

- 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) 100μLの標準液又は調製した試料を(別々の2個)ウェルに滴下、10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吸水紙(ペーパータオルなど)に続けざまに3回よくたたきつけ、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。この操作をさらに2回繰り返します。
- 4) 100μLの酵素複合体を各ウェルに加え、良く手で混合し、10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)に続けざまに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。この操作をさらに2回繰り返します。
- 6) すべてのウェルに100μLの基質/発色液を加えます。よく手で混合し、室温(20~25°C)で10分間、暗所でインキュベートします。
- 7) 各ウェルに100μLの停止液を加えます。よく手で混合し、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10分以内に行います。

11. 結果判定

RIDAスクリーンELISAキット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。三次元多項式関数(Cubic Spline Function)で解析して下さい。

キットの中に品質保証書があり、そこに検量線が示されています。

品質保証書と比較して、検量線の吸光度(A_{450nm})が高い場合、特に標準液1(0ppm)の吸光度値が明らかに高い場合は、ウェルの洗浄不足またはアレルゲンによる標準液のコンタミが原因です。

試料の吸光度が標準液5の吸光度よりも高い場合は、試料抽出液をさらに希釈して再測定してください。

注記

この取扱説明書記述の試料調製法に従えば、希釈ファクターは100です。100倍の希釈ファクターが既に考慮されていますのでアレルゲン濃度は標準曲線から直接求められます。

100倍以上の希釈をされた場合は、新たな希釈係数を考慮されてβ-ラクトグロブリン濃度を計算して下さい。

計算例

ミルクが食品に添加されました(ミルクのタンパク含有量については2を参照ください)。

検量線より、β-ラクトグロブリンの濃度が0.5mg/kgと求められました(希釈係数の換算は不要です)。この値は全ミルクタンパク約5mg/kgに相当し($0.5mg/kg \times 3.2\%/0.3\%=5.33mg/kg$)、全ミルク成分約156mg/kg($100\% \times 5mg/kg / 3.2\%$)に相当します。

一般的注意

結果が検出限界以下でも、カゼインや乳糖などの他の乳成分が食品中に入っていることがあります。

β-ラクトグロブリンは、全ミルクタンパクの10%に相当しますので、0.2ppmのβ-ラクトグロブリンを含む試料は、ミルクタンパク2ppmに相当します。

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。

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。

-酸性やアルカリ性の強い試料は、pHを中性に調整してください。

-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。より正確な結果を求められる場合はスパイク試験を行ってください。

-断片化されたタンパクの回収率は、サンドイッチELISAでは低くなりますので、そのような試料の場合は競合法ELISAのRIDAスクリーン β-ラクトグロブリン(R4901)を使用してください。

-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、改訂版妥当性試験データをご参照ください。

各種アプリケーションノートについては、アヅマックス㈱に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づ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㈱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。

輸入・販売元：アヅマックス株式会社

〒290-0044 千葉県市原市玉前西1-6-13

ご注文・お問合せ：アヅマックス㈱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 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扱って下さい
- 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㈱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せん。