

研究用試薬

モリナガ FASPEK エライザⅡ

卵 (卵白アルブミン)	(Cat.# M2111)
牛乳	(Cat.# M2122)
牛乳 (β -ラクトグロブリン)	(Cat.# M2112)
小麦 (グリアジン)	(Cat.# M2114)
そば	(Cat.# M2115)
落花生	(Cat.# M2116)
くるみ	(Cat.# M2124)
カシューナッツ	(Cat.# M2125)
大豆	(Cat.# M2117)

共通取扱説明書

【お願い】

製品をご使用になる前に、必ずお読みください。

株式会社森永生科学研究所

横浜市鶴見区下末吉 2-1-1 〒230-8504

URL: <https://www.morinaga-biosci.co.jp> E-MAIL: info_miobs@morinaga.co.jp

An instruction in English is from page 17.

目 次

I . キットの特長	3
II . キットの構成	4
III . その他必要な器具・装置	4
IV . 測定原理	5
V . 測定する際の注意事項	6
VI . 測定の流れ	7
VII . 試薬の調製法	8
VIII . 抽出法および測定溶液の調製法	10
IX . 測定操作手順	11
X . 特定原材料等由来タンパク質含量の算出法	12
XI . 測定のフローチャート	14
XII . 試験室間バリデーションの結果	14
XIII . 偽陽性・偽陰性	15
XIV . 廃棄上の注意事項	15
XV . キットの保存条件と有効期限	16
XVI . 保証	16

【重要な注意】

本キットは食品中の特定原材料等由来タンパク質含量を測定するための研究用試薬であり、食物アレルギー症状を診断する臨床検査薬ではありません。本キットによる測定結果とアレルギー症状の発症との相関性については確認されておりません。

I. キットの特長

1. 本キットは食品中における特定原材料および特定原材料に準ずるもの（以下「特定原材料等」）を高感度に検出可能です。
2. マイクロプレートを使用したサンドイッチ ELISA 法であるため特別な施設・設備等を必要とせず、通常の実験室で測定可能です。
3. 従来法「モリナガ FASPEK 特定原材料測定キット」と同様に、食品の加工の有無に関わらずタンパク質を高回収率で抽出できる検体抽出液を使用しています。毒物である 2-メルカプトエタノールを使わないため、より安全で環境にも優しいキットです。（特許第5451854号）
4. 特定原材料等に含まれる検出タンパク質（下表参照）に対する抗体を用いて、食品中に含まれる特定原材料等由来の総タンパク質含量を定量します。
5. 測定溶液中の特定原材料等由来総タンパク質を 0.78 ng/mL から測定可能です。

キットのラインアップ

キット名	検出タンパク質	定量対象
FASPEK エライザⅡ卵 (卵白アルブミン)	卵白アルブミン	卵総タンパク質
FASPEK エライザⅡ牛乳	カゼイン β-ラクトグロブリン	牛乳総タンパク質
FASPEK エライザⅡ牛乳 (β-ラクトグロブリン)	β-ラクトグロブリン	牛乳総タンパク質
FASPEK エライザⅡ小麦 (グリアジン)	グリアジン	小麦総タンパク質
FASPEK エライザⅡそば	部分精製 そばタンパク質	そば総タンパク質
FASPEK エライザⅡ落花生	部分精製 落花生タンパク質	落花生総タンパク質
FASPEK エライザⅡくるみ	2Sアルブミン	くるみ総タンパク質
FASPEK エライザⅡ カシューナッツ	2Sアルブミン	カシューナッツ 総タンパク質
FASPEK エライザⅡ大豆	β-コングリシニン	大豆総タンパク質

II. キットの構成

	品名	容量	数量
A	特定原材料抽出液 ExSta™ A液 (10倍濃縮液)	100 mL	1本
B	特定原材料抽出液 ExSta™ B液 (10倍濃縮液)	100 mL	1本
C	特定原材料抽出液 ExSta™ C液 (10倍濃縮液)	100 mL	1本
D	抗体固相化プレート	8ウェル×6本	2パック
E	標準品 (50 ng/mL)	1 mL	2本
F	酵素標識抗体溶液	13 mL	1本
G	酵素基質溶液 (TMB 溶液)	13 mL	1本
H	反応停止液 (1N 硫酸) *取扱注意*	13 mL	1本
I	洗浄液 (20倍濃縮液)	50 mL	1本
	プレート用フレーム	—	1個
	プレート用ふた	—	1枚
	取扱説明書	—	1部

III. その他必要な器具・装置

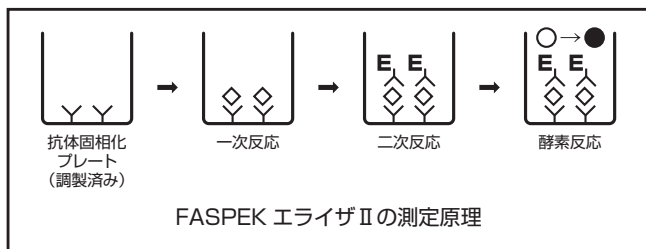
1. ミルミキサー (食品の均質化が可能な機器)
2. 秤量天秤 (食品 1.0 g を秤量可能な機器)
3. ポリプロピレン製遠心管 (50 mL)
4. メスシリンダー、プラスチックピペット
5. ボルテックスミキサー
6. 振とう機
7. 遠心分離機 (遠心加速度 $3,000 \times g$ 以上で分離可能な機器)
8. ろ紙
9. マイクロピペット (50 μ L~1000 μ L)
10. ポリプロピレン製チューブ (1.5 mL)
11. プレートリーダー
単波長の場合: 450 nm
2波長の場合: 主波長 450 nm・副波長 600~650 nm
12. 保護具 (マスク、保護メガネ、使い捨てのプラスチック手袋等)

IV . 測定原理

一次反応：測定溶液中の検出タンパク質が、プレート上の固相化抗体に結合し、[固相化抗体－検出タンパク質]の複合体を形成します。

二次反応：酵素標識抗体が複合体上の検出タンパク質に結合します。

酵素反応：酵素基質溶液を加えると、プレート上の複合体に結合した酵素により呈色します。得られた吸光度より測定溶液中の特定原材料等由来総タンパク質濃度を標準曲線から算出します。



V. 測定する際の注意事項

1. 標準品 (50 ng/mL) には特定原材料等由来タンパク質を使用しています。これらのタンパク質にアレルギーのある方は本キットを使用する際には試薬の取り扱いに十分に注意し、慎重に測定操作を行ってください。
2. キットを構成する試薬の取り扱いに関しては SDS (安全データシート) をご確認ください。
<https://www.morinaga-biosci.co.jp/products/faspek2/#sds>
試薬が誤って目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の診断を受けてください。検査を安全に行うため、検査中は保護メガネやマスク等の保護具の着用をお勧めします。
3. 試薬は全て室温 (20~30 °C) に戻してから使用してください。
4. A 液、B 液、C 液、反応停止液、洗浄液は、モリナガ FASPEK エライザⅡシリーズの全製品で共通の試薬として使用可能です。そのほかの試薬につきましては、ロット番号の異なる試薬を組み合わせ使用しないでください。
5. 測定は二重測定以上で行ってください。三重測定を推奨します。
6. 測定の際は必ず標準溶液を同時に測定してください。
7. 反応時間を厳守して測定してください。
8. 標準溶液および測定溶液を分注する際、ピペティング容量にばらつきが生じないように注意してください。マイクロピペットは定期的に校正してください。
9. 測定に用いる器具類は使用前に十分に洗浄してください。器具類の汚染は吸光度のばらつきやバックグラウンド上昇の原因となります。試薬調製時に使い捨てのピペットやチューブを使用することで汚染の可能性を低減することができます。またウェルへの分注の際に用いるピペットチップはフィルター付きのものをお勧めします。
10. 本キットは非常に高感度であるため、測定は埃などが除去された清潔な環境で行ってください。汚染を防ぐため、試薬分注後は必ず付属のプレート用ふたを使用してください。また、汚染を防ぐには、マスクやプラスチック手袋の着用も効果的です。

11. 各反応終了後の洗浄操作は非常に重要です。洗浄が不十分だと、バックグラウンドが高くなる可能性があります。洗浄操作では、アスピレーションによって溶液を除く、ペーパータオルなどを使用してプレートをよく叩くなどの方法で、ウェル内の溶液を十分に除去してください。洗浄後は速やかに次の試薬を分注してください。
※自動プレート洗浄機をご使用の場合は、各反応で添加した溶液を完全に除去するため、ウェル当たりの洗浄液量を、400 μ L を目安に増量して洗浄操作を行ってください。
12. 酵素反応は遮光下で行ってください。
13. プレートの底には触れないようにしてください。底面が汚れていると吸光度が正しく測定できない場合があります。もし指紋等で底面が曇った場合は、紙ワイパー（キムワイプ等）で十分にふき取ってから吸光度を測ってください。

VI. 測定の流れ

- 1日目 検体抽出液の調製
（「VII. 試薬の調製法」 p.8 参照）
↓
抽出操作
（「VIII. 抽出法および測定溶液の調製法」 p.10 参照）
- 2日目 測定溶液の調製
（「VIII. 抽出法および測定溶液の調製法」 p.10 参照）
↓
試薬の調製
（「VII. 試薬の調製法」 p.8 ~ 9 参照）
↓
測定
（「IX. 測定操作手順」 p.11 参照）
↓
濃度の算出
（「X. 特定原材料等由来タンパク質含量の算出法」
p.12 参照）

VII. 試薬の調製法

1. **D 抗体固相化プレート**は袋から出さずに室温 (20~30 °C) に戻してから開封してください。開封後は直ちに使用してください。
2. 以下の試薬は、そのまま使用します。使用前に室温に戻してください。

E 標準品 (50 ng/mL)

F 酵素標識抗体溶液

G 酵素基質溶液 (TMB溶液)

H 反応停止液 (1 N硫酸)

3. **検体抽出液の調製**

A液 (10倍濃縮液)、**B液** (10倍濃縮液)、**C液** (10倍濃縮液)、精製水を 1:1:1:7 の比率で混合します。一回の測定に必要な量を用時調製してください。

※ A液に沈殿が生じている場合は、加温溶解してからご使用ください。溶解後は室温で保存可能です。

※ C液は白濁することがありますが、品質上問題はありません。

※ 24 検体を測定する場合の調製量を以下に例示します。

A液 (10倍濃縮液)	50 mL
B液 (10倍濃縮液)	50 mL
C液 (10倍濃縮液)	50 mL
精製水	350 mL
<hr/>	
	500 mL

4. **検体希釈液 I の調製**

C液 (10倍濃縮液) を精製水で 10倍希釈します。一回の測定に必要な量を用時調製してください。

※ 検体希釈液 II の調製および食品抽出液の上清またはろ過液の希釈に用います。

※ 24 検体を測定する場合の調製量を以下に例示します。

C液 (10倍濃縮液)	5 mL
精製水	45 mL
<hr/>	
	50 mL

5. 検体希釈液Ⅱの調製

3.で調製した**検体抽出液**を4.で調製した**検体希釈液Ⅰ**で20倍希釈します。一回の測定に必要な量を用時調製してください。

※標準溶液の調製および測定溶液の再希釈に用います。

※24 検体を測定する場合の調製量を以下に例示します。

検体抽出液	……………	1 mL
検体希釈液Ⅰ	……………	19 mL
		20 mL

6. 標準溶液の調製

標準溶液 (50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0 ng/mL) を調製します。

E 標準品 (50 ng/mL) を下記に示すように**検体希釈液Ⅱ** (「5. 検体希釈液Ⅱの調製」参照) を用いて希釈し、25 ng/mL から0.78 ng/mL の希釈系列を調製します。

ブランク (0 ng/mL) は**検体希釈液Ⅱ**を使用します。

標準溶液 (ng/mL)	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0
標準品	1000							
検体希釈液Ⅱ		500	500	500	500	500	500	500
総液量	1000	500	500	500	500	500	500	500

(μL)

※標準溶液は用時調製してください。また、測定毎に標準曲線を作成してください。

7. 洗浄液の調製

Ⅰ 洗浄液 (20倍濃縮液) を精製水で20倍希釈します。必要量を調製してください。

※洗浄操作には調製済み洗浄液を使用します。

VIII. 抽出法および測定溶液の調製法

1. 食品をミルミキサー等で粉碎・均質化し、調製試料とします。
2. 調製試料 1.0 g をポリプロピレン製遠心管 (50 mL) にとり、**検体抽出液 19 mL** (「VII. 試薬の調製法 3. 検体抽出液の調製」参照) を加え、ボルテックスミキサー等を用いて十分に分散させます。
3. 遠心管を横にして振とう機で一晩 (12時間以上) 振とうしながら抽出します (90~110往復/分、室温、振とう幅 3 cm 程度)。振とうにより、液が遠心管の両端に打ち付けるように調整します。時々遠心管の上下を入れ替える等をして、液面に沿って付着する検体を分散させます。
4. 抽出液のpHを確認し、必要であれば中性付近 (pH 6.0~8.0) になるよう調整します (pH試験紙で結構です)。
※このとき調整に使用したアルカリ (あるいは酸) 溶液の液量を加味し、最終的な特定原材料等由来のタンパク質含有量を算出してください。
5. 3,000 × g で 20 分間 (室温) 遠心分離し、上清を分取します。沈査が得られない場合はろ紙でろ過し、ろ過液とします。
6. 上清またはろ過液を**検体希釈液 I** (「VII. 試薬の調製法 4. 検体希釈液 I の調製」参照) を用い 20 倍に希釈し、**測定溶液** とします。
例: **検体希釈液 I** 950 μ L に、上清またはろ過液 50 μ L を添加します。
7. さらに希釈する場合は、**検体希釈液 II** (「VII. 試薬の調製法 5. 検体希釈液 II の調製」参照) を用い希釈し、**測定溶液** とします。

IX. 測定操作手順

- ・全ての試薬は室温 (20~30 ℃) に戻してから使用してください。
- ・反応温度は室温で行ってください。
- ・測定は二重測定以上で行ってください。三重測定を推奨します。
- ・ピペッティング容量にばらつきが生じないように注意してください。
- ・自動プレート洗浄機をご使用の場合は、各反応で添加した溶液を完全に除去するため、ウェル当たりの洗浄液量を 400 μ L (目安) に増量して洗浄操作を行ってください。
- ・酵素反応停止後は 30 分以内に吸光度を測定してください。

<一次反応>

1. **D 抗体固相化プレート**を付属のプレート用フレームにセットします。
2. 各ウェルに**標準溶液** (0, 0.78~50 ng/mL)、**測定溶液**を 100 μ L ずつ分注します。
3. プレート用ふたをして、室温で正確に 1 時間静置して反応させます。

<二次反応>

4. ウェル内の溶液を完全に除去し、ウェルあたり 300 μ L の洗浄液で 6 回洗浄します。
5. **F 酵素標識抗体溶液**を各ウェルに 100 μ L ずつ分注します。
6. プレート用ふたをして、室温で正確に 30 分間静置して反応させます。

<酵素反応>

7. ウェル内の溶液を完全に除去し、ウェルあたり 300 μ L の洗浄液で 6 回洗浄します。
8. **G 酵素基質溶液**を各ウェルに 100 μ L ずつ分注します。
9. プレート用ふたをして室温遮光下で正確に 20 分間静置して反応させます。
10. **H 反応停止液**を各ウェルに 100 μ L ずつ分注し酵素反応を停止させます。
11. 各ウェルの 450 nm および 600~650 nm における吸光度をプレートリーダーで測定し、各ウェルの 450 nm の吸光度から

600～650 nm の吸光度を差し引いた値をそのウェルの吸光度とします。

12. 標準溶液の吸光度より標準曲線を作成し、食品中の特定原材料等由来タンパク質含量を求めます。

※「X. 特定原材料等由来タンパク質含量の算出法」を参照してください。

X. 特定原材料等由来タンパク質含量の算出法

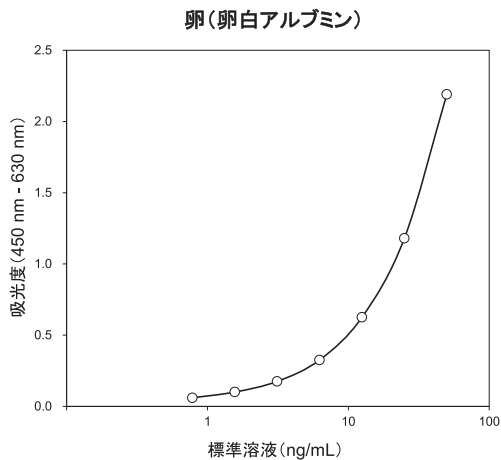
1. 測定した各ウェルの吸光度の平均値を算出します。
2. 標準溶液の濃度を横軸に、吸光度を縦軸にプロットし、標準曲線を作成します。グラフ描画ソフトウェアを用いて標準曲線を作成する場合は、4-パラメーターロジスティック回帰を推奨します。
3. 標準曲線より各測定溶液の濃度を読み取ります。
4. 次の式を用いて、測定溶液の濃度から食品中の特定原材料等由来タンパク質含量を求めます。

食品中の特定原材料等由来タンパク質含量 (μg/g) =
[測定溶液の濃度 (ng/mL)] × [抽出時の希釈倍率] × [測定時の希釈倍率] ÷ 1000

※サンドイッチ ELISA 法で食品中の特定原材料等由来タンパク質含量を測定する場合、標準曲線の作成方法が測定値に影響を及ぼします。そのため、4-パラメーターロジスティック解析以外の方法によって標準曲線を作成し算出した測定値は、4-パラメーターロジスティック解析により算出した測定値と差が生じる場合があります。

※測定溶液の吸光度が標準曲線の吸光度より高い場合は、さらに希釈して(「VIII. 抽出法および測定溶液の調製法 7.」参照)、再度測定してください。

<標準曲線の例>



※他品目の標準曲線も同様の形状となります。

XI. 測定のプロフローチャート

試薬、測定溶液の調製	<input type="checkbox"/> 検体抽出液、検体希釈液 I、検体希釈液 II および洗淨液を調製 標準溶液 (0, 0.78~50 ng/mL)、測定溶液の準備 ↓
一次反応	<input type="checkbox"/> 標準溶液、測定溶液 (100 μ L/ ウェル) *測定は二重以上 ↓
	<input type="checkbox"/> 反応 (室温、1 時間) ↓
	<input type="checkbox"/> 洗淨 (300 μ L/ ウェル、6 回) ↓
二次反応	<input type="checkbox"/> 酵素標識抗体溶液 (100 μ L/ ウェル) ↓
	<input type="checkbox"/> 反応 (室温、30分) ↓
	<input type="checkbox"/> 洗淨 (300 μ L/ ウェル、6 回) ↓
酵素反応	<input type="checkbox"/> 酵素基質溶液 (100 μ L/ ウェル) ↓
	<input type="checkbox"/> 反応 (室温、20分) *遮光下で反応 ↓
反応停止	<input type="checkbox"/> 反応停止液 (100 μ L/ ウェル) ↓
測定	<input type="checkbox"/> 吸光度測定 *反応停止後 30分以内に測定 (主波長: 450 nm、副波長: 600~650 nm)

XII. 試験室間バリデーションの結果

<卵 (卵白アルブミン)、小麦 (グリアジン)、そば、落花生>
消費者庁通知に則った従来法の試験室間バリデーションの結果
および本キットと従来法との相関は、弊社ホームページ (<https://www.morinaga-biosci.co.jp/products/faspek2.html#a4>) をご参照ください。

<牛乳、くるみ、カシューナッツ>

消費者庁通知に則った試験室間バリデーションの結果は、弊社ホームページ (<https://www.morinaga-biosci.co.jp/products/faspek2.html#a4>) をご参照ください。

XIII. 偽陽性・偽陰性

食品反応性データは、弊社ホームページ (<https://www.morinaga-biosci.co.jp/products/reactive.html>) をご参照ください。

XIV. 廃棄上の注意事項

1. H 反応停止液および反応停止液を添加した後のウェル内溶液は酸性溶液です。廃棄の際には、廃棄物に関する規定に従って適切に処理してください。その他の試薬については、十分量的の水で流して廃棄してください。
2. 使用後の試薬容器および使用した器具等の廃棄の際には、廃棄物に関する規定に従って適切に処理してください。

XV. キットの保存条件と有効期限

1. 2～8℃で光の当たらない場所に保管してください(凍結厳禁)。
2. 有効期限はラベルに記載してあります。有効期限を過ぎたキットは使用しないでください。
3. 一度開封した試薬は、保管条件により劣化する可能性があります。なるべく早く使用してください。

XVI. 保証

1. 本キットを使用して得られた結果の評価および利用は、お客様の責任と判断において行ってください。
2. 測定結果を利用し、その結果生じた損害および損失については、当社は一切責任を負いません。
3. 本キット以外の試薬または原材料を使用されて得られた結果については、当社は一切保証いたしません。
4. 万一、試薬に品質上の瑕疵があると当社が判断した場合は、新しい製品とお取り替えいたします。