



2023年2月 第8版

研究用試薬

モリナガ
加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2
(Cat.# M3102)

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.miobs.com> E-MAIL: info_miobs@morinaga.co.jp

目次

I.	キットの構成1
II.	その他必要な器具・装置1
III.	キットの特長2
IV.	測定原理2
V.	測定する際の注意事項3
VI.	測定方法 1(配合飼料及び食品残さを含まない動物 質性飼料を測定する場合)	
	1. 試薬の調製法4
	2. 測定溶液の調製法・抽出法5
	3. 測定操作手順6
VII.	測定方法 2(加工食品残さを原料とする動物質性飼 料を測定する場合)	
	1. 試薬の調製法7
	2. 測定溶液の調製法・抽出法7
	3. 測定操作手順8
VIII.	加熱処理牛由来タンパク質混入の判定法8
IX.	測定のフローチャート9
X.	ELISA フォーマット (作成例)10
XI.	試験成立条件10
XII.	判定基準10
XIII.	測定例11
XIV.	使用上又は取扱い上の注意12
XV.	キットの保存条件と有効期限12
XVI.	保証12

I. キットの構成

品名		識別	容量	数量
A	A液(10倍濃縮液)	…赤A液ラベル	100 mL	1本
B	B液(10倍濃縮液)	…青B液ラベル	100 mL	1本
C	C液(10倍濃縮液)		100 mL	1本
D	検体希釈液(10倍濃縮液)	…赤ラベル	13 mL	1本
E	陽性対照溶液(高濃度標準品)	…赤キャップ	1.8 mL	1本
F	陽性対照溶液(低濃度標準品)	…青キャップ	1.8 mL	1本
G	陰性対照溶液 I	…黄キャップ	1.8 mL	1本
H	陰性対照溶液 II	…緑キャップ	1.8 mL	1本
I	洗浄液(20倍濃縮液)		50 mL	1本
J	酵素標識抗体溶液		13 mL	1本
K	酵素基質溶液(TMB溶液)		13 mL	1本
L	反応停止液(1N硫酸)		13 mL	1本
M	抗体固相化プレート		8ウェル×3本	4パック
	プレートシール		—	2枚
	プレート用フレーム		—	1枚
	プレート用ふた		—	1枚

II. その他必要な器具・装置

1. ミルミキサー
飼料を均質化できるもの
2. 秤量天秤
飼料 0.4～1.0 g を秤量できるもの
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. 水浴
沸騰を維持できるもの
7. 遠心分離機
3000 × *g* 以上の遠心加速度の出せるもの
8. ろ紙 (ADVANTEC 製 5A ろ紙を推奨)
9. マイクロピペット (50μL～1000 μL)
10. ポリプロピレン製チューブ (1.5 mL)

11. プレート洗浄機

本キット専用の洗浄機の準備をお勧めします。

⚠️注意 他の測定試薬と洗浄機を共用される場合は、測定済みの試薬のキャリーオーバーを避けるため、十分にリンスしてからご使用ください

12. 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

13. マスク、使い捨てプラスチック手袋

III. キットの特長

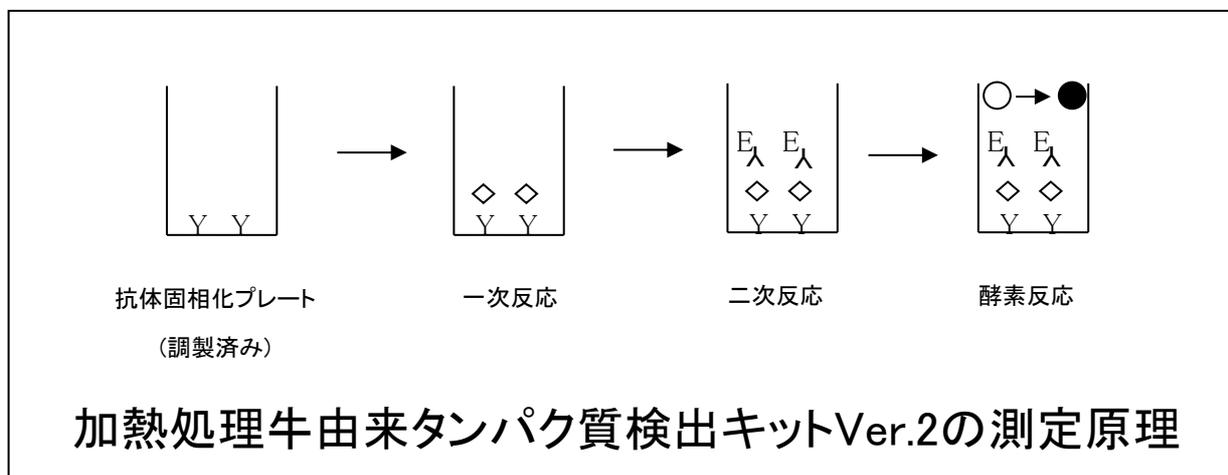
1. マイクロプレートを使用したサンドイッチ ELISA 法であるため特別な施設・設備等を必要とせず、通常の実験室で測定可能です。
2. このキットは飼料中の加熱処理牛由来タンパク質を検出するキットです。BSE プリオンタンパク質の有無を確認する検査薬ではありません。
3. このキットは、「飼料分析基準」に配合飼料・動物質性飼料中の牛由来たん白質の検査キットとして掲載されました。(2011年8月22日、23 消安第 2266 号農林水産省消費・安全局長通知「飼料分析基準の一部改正について」)
4. このキットは、農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課より、加工食品残さを原料とする動物質性飼料中の牛由来たん白質の検査キットとして承認されました。(2014年10月27日 26 消安第 3691 号農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知「加工食品残さを原料とする動物質性飼料中の牛由来たん白質の確認試験法について」)

IV. 測定原理

一次反応: 測定溶液中の加熱処理牛由来タンパク質が、プレート上の固相化モノクローナル抗体に結合し、[固相化抗体/加熱処理牛由来タンパク質]の複合体を形成します。

二次反応: 酵素標識モノクローナル抗体が複合体上の加熱処理牛由来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加熱処理牛由来タンパク質の混入を判定します。



V. 測定する際の注意事項

1. 試薬は全て 25°C に戻してから使用してください。
本キットは反応温度の影響を受けやすく、至適条件 (20~25°C) 以外では試験成立条件の「(3) E 陽性対照溶液 (高濃度標準品) の平均吸光度が 0.6 以上 1.6 以下であること」を満たせなくなる可能性があります。
2. 測定は二重測定以上で行ってください。
3. 反応時間を厳守して測定してください。
4. 一次反応、二次反応時は必ずキット付属のプレートシールを使用してください。
5. 標準溶液および測定溶液を分注する際、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。マイクロピペットは定期的に校正してください。
6. 実験に用いる器具類は汚染が無いよう、使用前に十分洗浄してください。吸光度のバラツキや、バックグラウンドの上昇の原因になります。試薬の調製には、使い捨てのプラスチックピペットや使い捨てチューブなどを使用すると、汚染の影響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。
7. 本キットによる測定は非常に高感度なため、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、試薬の分注後は必ず付属のプレート用ふたをしてください。口や手からの混入を防ぐため、実験中はマスクや使い捨てのプラスチック手袋等を着用することをお勧めします。
8. 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。ウェル内に液が残存していないことを十分確認しながら洗浄操作を行ってください。そのため、アスピレーションによって液を除いたり、ペーパータオルなどを使用してプレートをよく叩いて内容液を除いてください。洗浄後は速やかに次の試薬を分注してください。
9. 酵素反応は遮光下で行ってください。
10. プレートの底は触れないようにしてください。もし指紋等で底面が曇った場合は、十分に拭き取ってから吸光度を測ってください。汚れで吸光度が正しく測定できない場合があります。
11. 本キットは高濃度の界面活性剤や還元剤を含んでおりますので、実験中はマスクや使い捨てのプラスチック手袋等を着用することをお勧めします。

VI. 測定方法 1 (配合飼料及び加工食品残さを含まない動物質性飼料を測定する場合)

1. 試薬の調製法

- 1) M 抗体固相化プレートはアルミパウチから出さずに 25°Cに戻し、その後開封してください。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 25°Cに戻してください。
 - E 陽性対照溶液 (高濃度標準品)
 - F 陽性対照溶液 (低濃度標準品)
 - G 陰性対照溶液 I
 - H 陰性対照溶液 II
 - J 酵素標識抗体溶液
 - K 酵素基質溶液 (TMB 溶液)
 - L 反応停止液 (1N硫酸)
- 3) 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。必要量を調製してください。
 - ※ A 液に沈殿が生じている場合は、加温し完全に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。

(例: 24 検体測定する場合)

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/>		
抽出液	500 mL

4) 検体希釈液の調製

- D 検体希釈液 (10 倍濃縮液)を精製水で 10 倍に希釈します。必要量を調製してください。
- ※検体の希釈および測定の際の Blank として用います。

(例: 24 検体測定する場合)

検体希釈液 (10 倍濃縮液)	3 mL
精製水	27 mL
<hr/>		
検体希釈液	30 mL

5) 洗浄液の調製

I 洗浄液 (20 倍濃縮液) を精製水で 20 倍に希釈します。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。

2. 測定溶液の調製法・抽出法

- 1) 飼料をミルミキサー等で粉碎し、均質化操作を行います。
- 2) 均質化した飼料 1 g をポリプロピレン製遠心管 (50 mL) にとり、抽出液 19 mL (4 ページの「3) 抽出液の調製」参照) を加えて、ボルテックスミキサーで 30 秒間攪拌します。その後 10 秒間静置します。この攪拌操作を 3 回繰り返します。
- 3) 沸騰水浴中で 10 分間加熱します。加熱後は抽出サンプルの温度が 25°C となるよう水浴中で放冷してください。
- 4) 3000 × g で 10 分間、室温にて遠心分離し、上清をろ過し、得られたろ過液を検体とします。
- 5) 検体を検体希釈液 (4 ページの「4) 検体希釈液の調製」参照) で 20 倍希釈したものを測定溶液とします。

(測定溶液の調製)

検体	50 μL
検体希釈液	950 μL
<hr/>		
測定溶液	1,000 μL

3. 測定操作手順

- 全ての試薬は 25°C に戻してから使用してください。
- 反応温度は 25°C で行ってください。
本キットは反応温度の影響を受けやすく、至適条件 (20~25°C) 以外では試験成立条件の「(3) E 陽性対照溶液 (高濃度標準品) の平均吸光度が 0.6 以上 1.6 以下であること」を満たせなくなる可能性があります。
- 測定は二重測定以上で行ってください。
- 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。

(一次反応)

- 1) M 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 Blank (検体希釈液)、E 陽性対照溶液 (高濃度標準品)、F 陽性対照溶液 (低濃度標準品)、G 陰性対照溶液 I、H 陰性対照溶液 II、および測定溶液を 100 μ L ずつ分注します。
- 3) プレートシールで密閉し、さらにプレート用ふたをして、25°C 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) J 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) プレートシールで密閉し、さらにプレート用ふたをして、25°C で正確に 1 時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) K 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 25°C 遮光下で正確に 20 分間静置して反応させます。
- 10) L 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 における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、各ウェルの 450 nm の吸光度値から 600~650 nm の吸光度値を差し引いた値をそのウェルの吸光度値とします。

 **注意** 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。

- 12) F 陽性対照溶液 (低濃度標準品) の吸光度を基準として、飼料中の加熱処理牛由来タンパク質の混入を判定します。判定法は 8 ページ「加熱処理由来牛タンパク質混入の判定法」を参照してください。

VII. 測定方法 2(加工食品残さを原料とする動物質性飼料を測定する場合)

1. 試薬の調製法

検体希釈液Ⅱは、以下の手順に従い調製してください。

その他の試薬類の調製法は4ページの「1.試薬の調製法」を参照してください。

1) 検体希釈液Ⅱの調製

抽出液(4ページの「3)抽出液の調製」参照)を検体希釈液(4ページの「4)検体希釈液の調製」参照)で20倍希釈したものを検体希釈液Ⅱとします。必要量を調製してください。

※検体希釈液で20倍希釈した検体をさらに4倍希釈する際に用います。

(例:43検体測定する場合)

抽出液	1 mL
検体希釈液	19 mL
<hr/>		
検体希釈液Ⅱ	20 mL

2. 測定溶液の調製法・抽出法

- 1) 飼料をミルミキサー等で粉碎し、均質化操作を行います。
- 2) 均質化した飼料 0.4 g (0.40~0.44 g) をポリプロピレン製遠心管(50 mL)にとり、抽出液 19.6 mL (4ページの「3)抽出液の調製」参照)を加えて、ボルテックスミキサーで30秒間攪拌します。その後10秒間静置します。この攪拌操作を3回繰り返します。
- 3) 沸騰水浴中で10分間加熱します。加熱後は抽出サンプルの温度が25℃となるよう水浴中で放冷してください。
- 4) $3000 \times g$ で10分間、室温にて遠心分離し、上清をろ過し、得られたろ過液を検体とします。
- 5) 検体を検体希釈液(4ページの「4)検体希釈液の調製」参照)で20倍希釈します。
- 6) 20倍希釈した検体を、検体希釈液Ⅱでさらに4倍希釈したものを測定溶液とします。

(測定溶液の調製)

検体	50 μ L
検体希釈液	950 μ L
<hr/>		
20倍希釈検体	1,000 μ L
20倍希釈検体	100 μ L
検体希釈液Ⅱ	300 μ L
<hr/>		
測定溶液	400 μ L

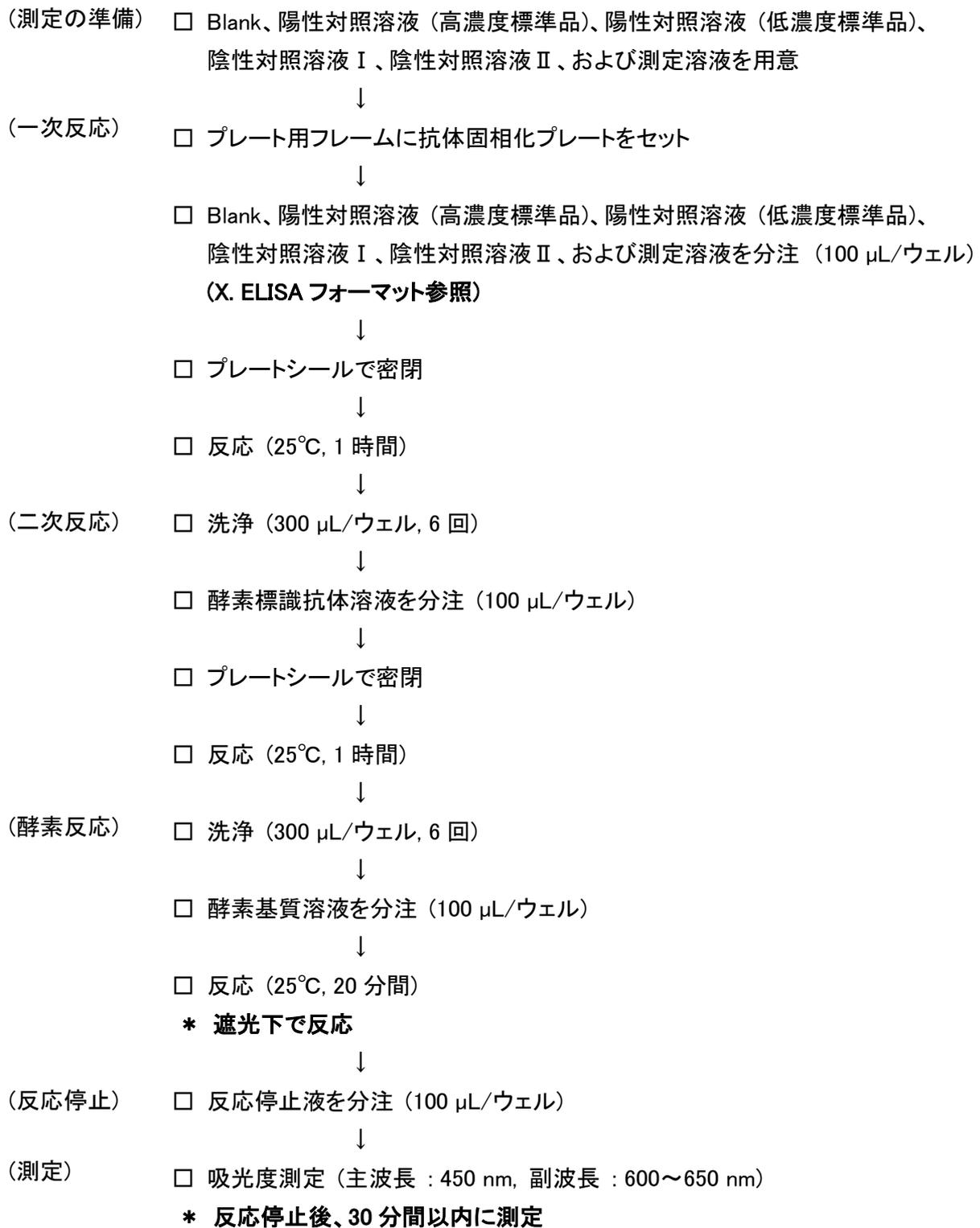
3. 測定操作手順

6 ページの「3. 測定操作手順」に従い測定します。

VIII. 加熱処理牛由来タンパク質混入の判定法

1. 二重測定した吸光度の平均値を算出します。
2. 試験の成立は、以下の条件を満たしている場合に限りです。条件を満たさない場合は測定をやり直してください。
 - (1) Blank、G 陰性対照溶液 I、H 陰性対照溶液 II の吸光度（平均値）が 0.08 以下であること。
 - (2) Blank、G 陰性対照溶液 I、H 陰性対照溶液 II の吸光度（平均値）が F 陽性対照溶液（低濃度標準品）の吸光度（平均値）未満であること。
 - (3) E 陽性対照溶液（高濃度標準品）の吸光度（平均値）が 0.6 以上 1.6 以下であること。
3. 測定溶液の吸光度（平均値）が、F 陽性対照溶液（低濃度標準品）の吸光度（平均値）以上である場合、加熱処理牛由来タンパク質の混入があるものと判定します。

IX. 測定のプロフローチャート



X. ELISA フォーマット

(作成例)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank		飼料 4		飼料 12		飼料 20		飼料 28		飼料 36	
B	陽性対照溶液 (高濃度標準品)		飼料 5		飼料 13		飼料 21		飼料 29		飼料 37	
C	陽性対照溶液 (低濃度標準品)		飼料 6		飼料 14		飼料 22		飼料 30		飼料 38	
D	陰性対照溶液 I		飼料 7		飼料 15		飼料 23		飼料 31		飼料 39	
E	陰性対照溶液 II		飼料 8		飼料 16		飼料 24		飼料 32		飼料 40	
F	飼料 1		飼料 9		飼料 17		飼料 25		飼料 33		飼料 41	
G	飼料 2		飼料 10		飼料 18		飼料 26		飼料 34		飼料 42	
H	飼料 3		飼料 11		飼料 19		飼料 27		飼料 35		飼料 43	

XI. 試験成立条件

- (1) Blank の吸光度、陰性対照溶液 I、II の吸光度 ≤ 0.08
- (2) Blank の吸光度、陰性対照溶液 I、II の吸光度 $<$ 陽性対照溶液(低濃度標準品)の吸光度
- (3) $0.6 \leq$ 陽性対照溶液(高濃度標準品)の吸光度 ≤ 1.6

※試験成立条件はすべて二重測定以上の吸光度の平均値を用いる

XII. 判定基準

[陽性] 検体の吸光度 \geq 陽性対照溶液(低濃度標準品)の吸光度

[陰性] 検体の吸光度 $<$ 陽性対照溶液(低濃度標準品)の吸光度

※陽性、陰性の判断はすべて二重測定以上の吸光度の平均値を用いる。

XIII. 測定例

	1	2	平均
Blank	0.030	0.036	0.033
陽性対照溶液 (高濃度標準品)	1.208	1.212	1.210
陽性対照溶液 (低濃度標準品)	0.123	0.127	0.125
陰性対照溶液 I	0.022	0.028	0.025
陰性対照溶液 II	0.037	0.035	0.036

※試験成立条件

陽性対照溶液 (低濃度標準品)吸光度の平均値 = 0.125

- | | | |
|-----------------------------|--------------------|------|
| (1) Blank の吸光度の平均値 | :0.033 ≤ 0.08 | …クリア |
| 陰性対照溶液 I の吸光度の平均値 | :0.025 ≤ 0.08 | …クリア |
| 陰性対照溶液 II の吸光度の平均値 | :0.036 ≤ 0.08 | …クリア |
| (2) Blank の吸光度の平均値 | :0.033 < 0.125 | …クリア |
| 陰性対照溶液 I の吸光度の平均値 | :0.025 < 0.125 | …クリア |
| 陰性対照溶液 II の吸光度の平均値 | :0.036 < 0.125 | …クリア |
| (3) 陽性対照溶液 (高濃度標準品)の吸光度の平均値 | :0.6 ≤ 1.210 ≤ 1.6 | …クリア |

飼料の測定

	1	2	平均	判定
検体 1	0.097	0.098	0.098	—
検体 2	0.334	0.336	0.335	+

※ 陽性判定基準

陽性対照溶液 (低濃度標準品)吸光度の平均値 = 0.125

飼料 1 の吸光度の平均値 < 0.125 …陰性

飼料 2 の吸光度の平均値 ≥ 0.125 …陽性

XIV. 使用上または取扱い上の注意

1. 有効期限の過ぎたキットは使用しないでください。
2. 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。
3. 測定の際は必ず Blank、陽性対照溶液、陰性対照溶液を同時に測定してください。
4. 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処置を行い、必要があれば医師の診察を受けてください。
5. キットに組み込まれている試薬類は凍結させないでください。
6. 保存中や反応中は強い光にさらさないでください。

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。
2. キットの有効期限はラベルに記載してあります。
3. 一度開封した試薬は、必ず一週間以内に使用してください。

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下さい。
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。