



2017年10月 第1版

研究用試薬

Wheat/Gluten(Gliadin) ELISA Kit

操作手順書

【お願い】

製品をご使用になる前に、
キット添付の取扱説明書(英語)
を必ずお読みください。

株式会社森永生科学研究所

横浜市金沢区幸浦2-1-16 〒236-0003
URL : <http://www.miobs.com> E-MAIL : info@miobs.com

目 次

I. キットの構成	3
II. その他必要な器具・装置	3
III. キット性能	3
IV. 試薬の調製法	4
V. 操作手順(推奨法)	5
小麦タンパク質濃度の算出法	6
標準曲線の例	6
グルテン含量の算出法	7
VI. 操作手順(ハイレンジ法)	7
グルテン含量の算出法	8
VII. キットの保存条件と有効期限	8
VIII. 使用上または取扱上の注意	8
IX. 参考文献	9
X. 保証	9

I. キットの構成

品名		容量	数量
A	Antibody-coated Microplate Module	8 ウェル×6 本	2 パック
B	Wheat Standard (50 ng/mL)	1 mL	2 本
C	Enzyme-conjugated Antibody	13 mL	1 本
D	Enzyme Substrate (TMB Solution)	13 mL	1 本
E	Stop Solution (1N Sulfuric Acid)	13 mL	1 本
F	Sample Buffer (20X Concentrate)	50 mL	1 本
G	Wash Buffer (20X Concentrate)	50 mL	1 本
H	Extraction Component A (20X Concentrate)	55 mL	1 本
	Frame for mounting the microplate module	-	1 個
	Microplate cover	-	1 枚

II. その他必要な器具・装置

- 2-メルカプトエタノール
- 蒸留水(または脱イオン水)
- マイクロピペット(20~1000 μ L)、チップ
- メスシリンダー
- ポリプロピレン製遠心管(50 mL)
- ポリプロピレン製チューブ(1~2 mL)
- チューブラック
- pH試験紙
- ホモジナイザー/ブレンダー
- 水浴(沸騰を維持できるもの)もしくは振とう機
- 遠心分離機
- ボルテックスミキサー
- アスピレーターまたはマイクロプレート洗浄装置
- マイクロプレートリーダー(主波長 450 nm・副波長 600~650 nm)

III. キット性能

サンプル調製時間	約 10 分	
サンプル抽出時間	約 30 分もしくは一晩	
ELISA 検査時間	約 2 時間 30 分	
感度	推奨法	0.31 ppm 小麦タンパク質 (0.26 ppm グルテン*)
	ハイレンジ法	1.05 ppm グルテン*
測定レンジ	0.78~50 ng/mL 小麦タンパク質	
室内精度	< 10 %	
室間精度	< 10 %	
回収率	100±25%	

*グルテンへの換算につきましては 7 ページ グルテン含量の算出法をご覧ください。
 ※特異性データにつきましては、当社までお問合せください。

IV. 試薬の調製法

1. 検体抽出液の調製

Sample Buffer (F)、**Extraction Component A (H)**、2-メルカプトエタノール、精製水を5:5:2:88の比率で混合します。必要量を調製してください。

(例:40検体測定する場合)

Sample Buffer (20× Concentrate) (F)	40 mL
Extraction Component A (20× Concentrate) (H)	40 mL
2-メルカプトエタノール	16 mL
精製水	704 mL
	<hr/>
	800 mL

※**Extraction Component A (H)** は冷蔵下で沈殿が生じている場合がございます。加温溶解(30-37°C)してからご使用ください。溶解後は室温(20-25°C)で保存可能です。

※**検体抽出液**は**検体希釈液Ⅱ**を調製するまでは4°Cで保管してください。沈殿が生じた場合は室温(20-25°C)で溶解させた後使用してください。

2. 検体希釈液Ⅰの調製

検体希釈液Ⅰは**検体希釈液Ⅱ**の調製および推奨法のろ過液の希釈に用います。**Sample Buffer (F)**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。

(例:40検体測定する場合)

Sample Buffer (20× Concentrate) (F)	5 mL
精製水	95 mL
	<hr/>
	100 mL

3. 検体希釈液Ⅱの調製

検体希釈液Ⅱは標準溶液の調製および推奨法の測定溶液の再希釈、ハイレンジ法のろ過液の希釈に用います。**検体抽出液**を**検体希釈液Ⅰ**で20倍に希釈します。必要量を調製してください。

(例:40検体測定する場合)

検体抽出液	2 mL
検体希釈液Ⅰ	38 mL
	<hr/>
	40 mL

4. 洗浄液の調製

Wash Buffer (G)を精製水で20倍に希釈します。均一になるよう混合してください。

5. Wheat Standard (50 ng/mL) (B)

Wheat Standard (50 ng/mL) (B)は小麦標準溶液の調製に用います。

V. 操作手順（推奨法）

【測定範囲：0-20 ppm 小麦タンパク質、0-17 ppmグルテン】

コンタミネーションによる誤判定防止のため、使い捨てチューブの使用をお勧めします。

また、測定で使用する器具類は十分洗浄してください。

a. サンプル調製法

検査状況に応じて2種の抽出法がございます。

（短時間抽出法）

1. 食品をミルミキサー等で粉碎し、均質化操作を行います。
2. 均質化した食品1gをポリプロピレン製遠心管(50 mL)にとり、**検体抽出液**を19 mL加えます。ふたを強く締め、ボルテックスミキサーで30秒間攪拌します。
3. チューブのふたを閉めた状態で沸騰した水浴中で10分間加熱します。
4. 水浴等で室温まで冷却します(約10分間)。
5. ボルテックスミキサーで30秒間攪拌します。
6. 抽出液のpHを確認し、必要であれば塩酸や水酸化ナトリウム溶液で中性付近 (pH6-8)になるよう調整します。
7. 3,000 x gで20分間、20-25°Cで遠心分離し、上清を分取します。(必要であればろ過をしてください。)
8. 上清もしくはろ過液を**検体希釈液 I**で20倍に希釈し、**測定溶液**とします。
※さらに希釈する場合は、**検体希釈液 II**を用い希釈し、**測定溶液**とします。

（終夜抽出法）

1. 食品をミルミキサー等で粉碎し、均質化操作を行います。
2. 均質化した食品1gをポリプロピレン製遠心管(50 mL)にとり、**検体抽出液**を19 mL加えます。ふたを強く締め、ボルテックスミキサーで30秒間攪拌します。
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、振とう幅3 cm程度)。
4. 短時間抽出法の6-8に従い**測定溶液**を調製します。

b. 小麦標準溶液の調製

1. 6個のポリプロピレン製チューブを準備し、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25 ng/mLと記載します。各チューブに**検体希釈液 II**を0.5 mLずつ分注します。
2. **Wheat Standard (B)** 0.5 mLを25 ng/mLと記載のチューブに加え、しっかり混合します。
3. 2.で調製した25 ng/mLのチューブ内溶液0.5 mLを12.5 ng/mLと記載のチューブに加え、しっかり混合します。
4. 同様に2倍ずつの希釈系列を0.78 ng/mLまで調製します。
5. チューブに0 ng/mLと記載し、**検体希釈液 II**を0.5 mL加えます。

c. ELISA操作手順

（一次反応）

1. **Antibody-coated Microplate Module (A)**を室温(20-25°C)に戻し、開封します。モジュールをフレームにセットします。
2. 各ウェルに**小麦標準溶液**(0、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50 ng/mL)と**測定溶液**を100 µLずつ分注します。二重測定以上としてください。
※検体中の小麦濃度が50 ng/mL以上の場合、**検体希釈液 II**で希釈して検査してください。
3. プレート用ふたをします。
4. 20-25°Cで1時間反応させます。

(二次反応)

1. アスピレーターを使用して、もしくはプレートを逆さまにして紙タオル上にたたきつけ、ウェル内の溶液を完全に除去します。
2. ウェルあたり300 μLの洗浄液で6回洗浄します。洗浄後は溶液が残らないようプレートを清潔な紙タオル上でたたいてください。
3. **Enzyme-conjugated Antibody (C)** を各ウェルに100 μLずつ分注します。
4. プレート用ふたをして、20-25 °Cで正確に30分間反応させます。

(酵素反応)

1. ウェル内の溶液を完全に除去し、ウェルあたり300 μLの洗浄液で6回洗浄します。
2. **Enzyme Substrate (D)** を各ウェルに100 μLずつ速やかに分注します。
3. プレート用ふたをして20-25 °Cで正確に30分間、遮光下で反応させます。
4. **Stop Solution (E)** を各ウェルに100 μLずつ分注し酵素反応を停止させます。
5. 各ウェルの450nmおよび600~650nm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450nmの吸光度から600~650nm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。
※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。

小麦タンパク質濃度の算出法

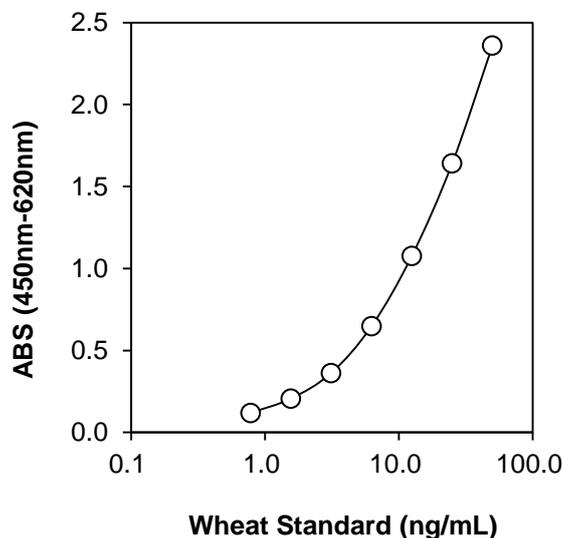
1. 測定した各ウェルの吸光度の平均値を算出します。グラフ化ソフトウェア、マイクロプレートリーダーのグラフ機能、またはグラフ用紙を使用して、標準溶液の濃度を横軸に、吸光度を縦軸にプロットし、標準曲線を作成します。
※標準曲線は測定毎に作成してください。
2. 標準曲線より各測定溶液の濃度を読み取ります。
3. 測定溶液の平均吸光度が50 ng/mL小麦標準溶液の吸光度より大きい場合は、さらに希釈してから再度測定してください。

検体中の小麦タンパク質含量 (μg/g)は次の式で求められます。

$$\text{小麦タンパク質含量 (}\mu\text{g/g)} = \frac{\text{OV} \times \text{希釈A} \times \text{希釈B}}{1,000}$$

- OV: 測定溶液の濃度
希釈A: 推奨法a.2の希釈倍率(通常20倍)
希釈B: 推奨法a.8の希釈倍率(通常20倍)

標準曲線の例



グルテン含量の算出法

グルテンは、小麦タンパク質の約85%を占めることが広く知られています(Ⅸ.参考文献1-4参照)。従って、食品中のグルテン含量は次の式で求められます。

$$\text{グルテン含量} (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{OV} \times \text{希釈A} \times \text{希釈B} \times 0.85}{1,000}$$

- OV: 測定溶液の濃度
希釈A: 推奨法a.2の希釈倍率(通常20倍)
希釈B: 推奨法a.8の希釈倍率(通常20倍)

Ⅵ. 操作手順 (ハイレンジ法) 【測定範囲：0-68 ppmグルテン】

ハイレンジ法は、推奨法より広い測定範囲で、検体中のおおよそのグルテン含量を測定する方法です。17 ppm以上のグルテンを含むと思われる検体の正確なグルテン含量を測定したい場合は、推奨法a.8にありますように、測定溶液を検体希釈液Ⅱで希釈後、測定することをお勧めします。

a. サンプル調製法

検査状況に応じて2種の抽出法がございます。

※推奨法とハイレンジ法は測定溶液調製時の希釈液および希釈倍率が異なります。

(短時間抽出法)

1. 食品をミルミキサー等で粉碎し、均質化操作を行います。
2. 均質化した食品1gをポリプロピレン製遠心管(50 mL)にとり、**検体抽出液**を19 mL加えます。ふたを強く締め、ボルテックスミキサーで30秒間攪拌します。
3. チューブのふたを閉めた状態で沸騰した水浴中で10分間加熱します。
4. 水浴等で室温まで冷却します(およそ10分間)。
5. ボルテックスミキサーで30秒間攪拌します。
6. 抽出液のpHを確認し、必要であれば塩酸や水酸化ナトリウム溶液で中性付近(pH6-8)になるよう調整します。
7. 3,000 x gで20分間、20-25°Cで遠心分離し、上清を分取します。(必要であればろ過をしてください。)
8. 上清もしくはろ過液を**検体希釈液Ⅱ**で80倍に希釈し、**測定溶液**とします。

(例)	上清もしくはろ過液	0.025 mL
	検体希釈液Ⅱ	1.975 mL
		2 mL

(終夜抽出法)

1. 食品をミルミキサー等で粉碎し、均質化操作を行います。
2. 均質化した食品1gをポリプロピレン製遠心管(50 mL)にとり、**検体抽出液**を19 mL加えます。ふたを強く締め、ボルテックスミキサーで30秒間攪拌します。
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、振とう幅3 cm程度)。
4. 短時間抽出法の6-8に従い**測定溶液**を調製します。

b. 小麦標準溶液の調製

5ページ推奨法、b. 小麦標準溶液の調製をご参照ください。

c. ELISA操作手順

5ページ推奨法、c. ELISA操作手順をご参照ください。

グルテン含量の算出法

1. 測定した各ウェルの吸光度の平均値を算出します。グラフ化ソフトウェア、マイクロプレートリーダーのグラフ機能、またはグラフ用紙を使用して、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。
※標準曲線は測定毎に作成してください。
2. 標準曲線より各測定溶液の濃度を読み取ります。

検体中のグルテン含量 (μg/g)は次の式で求められます。

$$\text{グルテン含量 (}\mu\text{g/g)} = \frac{\text{OV} \times \text{希釈A} \times \text{希釈B} \times 0.85}{1,000}$$

OV: 測定溶液の濃度
希釈A: ハイレンジ法a.2の希釈倍率(通常20倍)
希釈B: ハイレンジ法a.8の希釈倍率(通常80倍)

VII. キットの保存条件と有効期限

1. 2～8℃でキットを保管してください。凍結しないでください。
2. キットは20～25℃で使用してください。使用後は速やかに2～8℃で保管してください。また、キットを25℃以上の温度にさらさないでください。
3. 外箱に記載された有効期限が経過した後はキットを使用しないでください。

VIII. 使用上または取扱上の注意

(一般)

1. キットの試薬には小麦タンパク質を使用しています。小麦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。くしゃみやかゆみなどのアレルギー反応が重度または長期間続く場合は医師の診断を受けてください。
2. ピペット操作等分析技術を有する方の使用をお勧めします。
3. **Stop Solution (E)**の取り扱いに注意してください。接触した場合は、直ちに患部を大量の水で洗い流し、必要に応じて医師の診察を受けてください。
4. 適切な防護服、ゴーグル、手袋の着用をお勧めします。
5. キットの試薬には有害物質 (CAS No.60-24-2)に分類されている2-メルカプトエタノールを使用しています。十分に換気された元でキットを使用し、試薬の取り扱いにご注意ください。
6. 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。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。

(ELISA)

1. 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。
2. すべての試薬は、使用前に20～25℃に戻してから使用してください。
3. 測定の際は必ず標準溶液を同時に測定してください。
4. 測定は二重測定以上で行ってください。
5. 標準溶液および測定溶液を分注する際、ピPETTING容量にばらつきが生じないように注意してください。
6. 操作手順は慎重に行ってください。
7. バックグラウンドの影響を最小限に抑えるために、洗浄操作は非常に重要です。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。

8. 酵素反応は遮光下で行ってください。

※加工食品の場合、小麦タンパク質の変性および不溶化のため、測定時の検出感度が低下することがあります。そのため、陰性の結果であってもELISAで反応しない小麦タンパク質もしくは検出限界以下の濃度で存在している場合があります。

IX. 参考文献

1. T. B. Osborne (1924), The Vegetable Proteins, Longmans green and Co., London, UK
2. John Holme (1966), “A review of wheat flour proteins and their functional properties”, The Bakers Digest, Vol.40, pp.38-42
3. S. Shibata, and T. Nakae (Ed.) (1990), Komugikoseihinno chisiki [Knowledge of wheat products]. Japan, Saiwai Shobo
4. Nihon mugirui kenkyukai (Ed.) (1964), Komugiko-sono genryo to kakohin [Wheat-material and processing] Japan, Yuni Ato

X. 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し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、新しい製品とお取替えいたします。