



2021年1月 第1版

研究用試薬

Sesame ELISA Kit II

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: <https://www.miobs.com> E-MAIL: info_miobs@morinaga.co.jp

目 次

I. キットの特徴	3
II. キットの構成	3
III. その他必要な器具・装置	3
IV. 試薬の調製法	4
V. 操作手順	5
ごまタンパク質濃度の算出法	6
標準曲線の例	7
VI. キットの保存条件	7
VII. 使用上または取扱上の注意	7

I. キットの特徴

1. 本キットは食品中のごま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. 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。(特許第3600231号、特許第5451854号)
4. ごま11S-グロブリンに対するモノクローナル抗体を用いて、食品中に含まれるごま由来の総タンパク質濃度を測定します。
5. 測定溶液中のごま総タンパク質を0.39 ppbから検出可能です

II. キットの構成

品名		容量	数量
A	Reagent A (10X Concentrate)	100 mL	1 本
B	Reagent B (10X Concentrate)	100 mL	1 本
C	Reagent C (10X Concentrate)	100 mL	1 本
D	Antibody-coated Microplate Module	8 ウェル×6 本	2 パック
E	Sesame Standard (25 ng/mL)	1 mL	2 本
F	Enzyme-conjugated Antibody	13 mL	1 本
G	Enzyme Substrate (TMB Solution)	13 mL	1 本
H	Stop Solution (1N Sulfuric Acid)	13 mL	1 本
I	Wash Buffer (20X Concentrate)	50 mL	1 本
	Frame for mounting the microplate module	-	1 個
	Microplate cover	-	1 枚

III. その他必要な器具・装置

1. ミルミキサー
食品を均質化できるもの
2. 秤量天秤
食品を1g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. 振とう機(終夜抽出法で測定溶液を調製する場合に使用)
7. 水浴(沸騰を維持できるもの、短時間抽出法で測定溶液を調製する場合に使用)
8. 遠心分離機(3,000 x g 以上の遠心加速度の出せるもの)
9. ろ紙
10. マイクロピペット(50 µL~1000 µL)、チップ
11. ポリプロピレン製チューブ(1.5 mL)
12. プレートリーダー
短波長の場合 : 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

IV. 試薬の調製法

1. 検体抽出液の調製

Reagent A (10X Concentrate) (A)、**Reagent B (10X Concentrate) (B)**、**Reagent C (10X Concentrate) (C)**、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。

(例:24検体測定する場合)

Reagent A (10X Concentrate) (A)	50 mL
Reagent B (10X Concentrate) (B)	50 mL
Reagent C (10X Concentrate) (C)	50 mL
精製水	350 mL
	<hr/>
	500 mL

※**Reagent A (10X Concentrate) (A)** 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。

※**Reagent C (10X Concentrate) (C)** は白濁することがありますが、品質上問題はありません。

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、および上清またはろ過液の希釈に用います。**Reagent C (10X Concentrate) (C)**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。

(例:24検体測定する場合)

Reagent C (10X Concentrate) (C)	5 mL
精製水	45 mL
	<hr/>
	50 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測定溶液の再希釈に用います。**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:24検体測定する場合)

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

4. 洗浄液の調製

Wash Buffer (20X Concentrate) (I) 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. Sesame Standard (25 ng/mL) (E)

Sesame Standard (25 ng/mL) (E) は、**ごま標準溶液の調製において、25 ppbごま標準溶液として用います。**

V. 操作手順

- ・全ての試薬は室温(20~30°C)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。
- ・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。

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。

(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)に取り、**検体抽出液**を19 mLを加え混合します。この際に、あまり泡立たせないよう注意しながら、ボルテックスミキサー等を用いて食品を分散させます。
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)。
4. 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。
5. 3,000 x gで20分間、室温で遠心分離し、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**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。

(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)に取り、**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. 終夜抽出法の4~6に従い**測定溶液**を調製します。

b. ごま標準溶液の調製

1. 6個のポリプロピレン製チューブを準備し、0.39 0.78、1.56、3.13、6.25、12.5 ppbと記載します。各チューブに**検体希釈液 II**を500 μ Lずつ分注します。
2. **Sesame Standard (E)** 500 μ Lを12.5 ppb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12.5 ppbのチューブ内溶液500 μ Lを6.25 ppb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0.39 ppbまで調製します。(下図参照)
5. チューブに0 ppbと記載し、**検体希釈液 II**を500 μ L加えます。

標準溶液 (ppb)	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0
Sesame Standard	1000	500						
検体希釈液 II		500	500	500	500	500	500	500
			500	500	500	500	500	
総液量	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	

(μ L)

c. ELISA操作手順

(一次反応)

1. **Antibody-coated Microplate Module (D)**を室温に戻し、開封します。モジュールをフレームにセットします。
2. 各ウェルにごま標準溶液 (0、0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25 ppb)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。
※検体中のごまタンパク濃度が25 ppb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て、室温で正確に1時間静置して反応させます。

(二次反応)

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-conjugated Antibody (F)** を各ウェルに100 μLずつ分注します。
3. 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)

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 (G)** を各ウェルに100 μLずつ分注します。
3. 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。
4. **Stop Solution (H)** 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。
※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。

ごま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、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25 ppbごま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。

検体中のごまタンパク質含量 (ppm)は次の式で求められます。

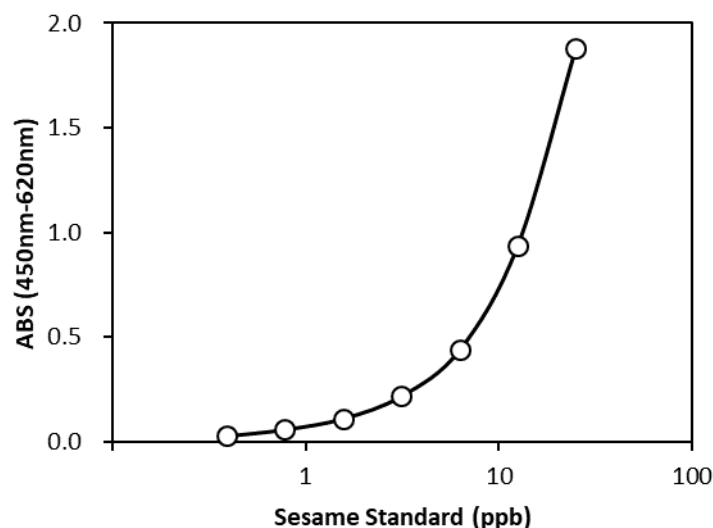
$$\text{ごまタンパク質含量 (ppm)} = \frac{\text{OV} \times \text{希釈A} \times \text{希釈B}}{1000}$$

OV : 測定溶液の濃度 (ppb)

希釈A: 抽出時の希釈倍率 (通常20倍)

希釈B: 測定時の希釈倍率 (通常20倍)

標準曲線の例



VI. キットの保存条件

1. 2~8°Cで光の当たらない場所に保管してください。
2. 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。

VII. 使用上または取扱上の注意

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. 測定の際は必ず標準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。
7. 本キットは食品中のごまタンパク質濃度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との相関性については確認されておりません。