

モリナガ FASPEK

牛乳ウエスタンブロットキット (β -ラクトグロブリン)

取扱説明書

【お願い】

製品をご使用になる前に、
必ずお読み下さい。

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

<http://www.miobs.com>

■ キットの構成

	品名	容量	数量
A	抽出用A液 (20倍濃縮液)	55mL	1本
B	抽出用B液 (20倍濃縮液) 医薬用外毒物 2-メルカプトエタノール 40%含有	55mL	1本
C	検体希釈液 (20倍濃縮液)	50mL	1本
D	牛乳標準品 (10 μ g/mL) 医薬用外劇物 2-メルカプトエタノール 4%含有	500 μ L	1本
E	ウサギ抗 β -ラクトグロブリン抗体溶液	1.2mL	1本

■ キットの特長

- 本キットは、通知(「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」平成22年9月10日付消費表第286号消費者庁次長通知)に記載された定量検査法によって得られた検査結果の確認検査として用いる牛乳タンパク質検出用ウエスタンブロットキットです。
- 本キットは、食品検体中に含まれる牛乳タンパク質を、 β -ラクトグロブリンを指標として検出します。

■ 測定する際の注意事項

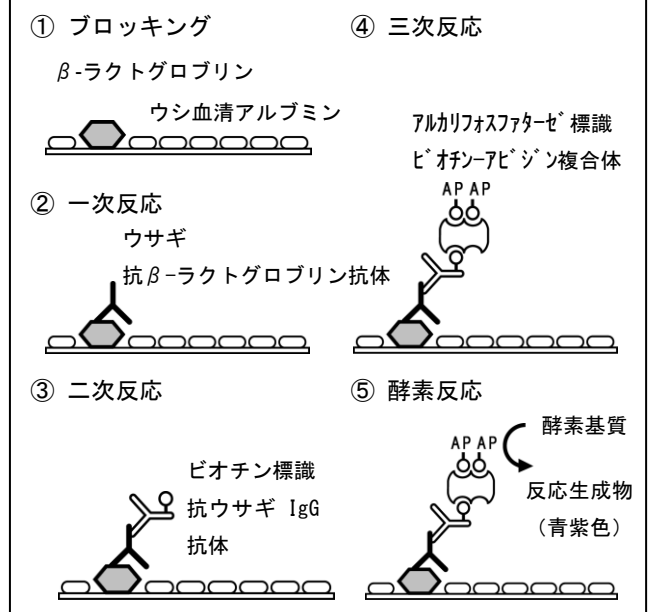
- キットの試薬にはアレルギー性を有する牛乳タンパク質やウシ血清アルブミンを使用しています。これらのタンパク質にアレルギーのある方は試薬の取扱いに十分に注意し、慎重に測定操作を行って下さい。
- 試薬は全て室温(20~25 $^{\circ}$ C)に戻してから使用して下さい。
- 本キットによる測定は埃などが除去された清潔な環境で行って下さい。口や手からの混入を防ぐため、実験中はマスクや使い捨てのプラスチック手袋等を着用することをお勧めします。

- 本キットは高濃度の2-メルカプトエタノールを含むため、ご使用の際特有の臭気を感じる場合があります。そのため、検体の抽出・調製の際にはドラフトの使用をお勧めします。
- 2-メルカプトエタノールは濃度により、毒物または劇物に該当しますので、法令に則った取り扱いをして下さい。

■ 測定原理

- ポリアクリルアミドゲル電気泳動
サンプル中のタンパク質を、その分子量に従って分離する。
- ブロッティング
ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離したタンパク質を電気的に転写膜へ転写する。
- 免疫染色
 - 〈ブロッキング〉
ウサギ抗 β -ラクトグロブリン抗体が非特異的に転写膜に結合するのを防ぐため、ウシ血清アルブミンで転写膜をブロッキングする。
 - 〈一次反応〉
ウサギ抗 β -ラクトグロブリン抗体が、転写膜上の β -ラクトグロブリンに結合し、[ウサギ抗 β -ラクトグロブリン抗体/ β -ラクトグロブリン]の複合体を形成する。
 - 〈二次反応〉
ビオチン標識抗ウサギIgG抗体が複合体中のウサギ抗 β -ラクトグロブリン抗体と結合する。
 - 〈三次反応〉
アルカリホスファターゼ標識ビオチン-アビジン複合体がビオチン標識抗ウサギIgG抗体と結合する。
 - 〈酵素反応〉
検出試薬を添加すると、転写膜上の複合体に結合したアルカリホスファターゼにより試薬中の基質が呈色し、膜上に青紫色のバンドとして沈着する。

〈免疫反応の模式図〉



■ その他必要な器具・装置・試薬

本キットを用いてウエスタンブロット法を実施するには、下記に示した器具、装置、試薬または同等品が別途必要です。(下記は当社での使用例です)

サンプル調製

- ・ホモジナイザー
ミルサー IFN-700G [岩谷産業(株)]
- ・ローディング緩衝液
Laemmli Sample Buffer [BIO-RAD]^{*1}
2-メルカプトエタノール
- ・ヒートブロックまたは湯浴
- ・振とう機

電気泳動

- ・電源装置
Electrophoresis Power Supply - EPS 1001 [GE]^{*2}
- ・泳動装置
セイフティーセルミニ STC-808 [テフコ(株)]
- ・分子量スタンダード
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard [Invitrogen]^{*3}
- ・ポリアクリルアミドゲル
Q-PAGE mini 12.5% 1.0mm×12well [テフコ(株)]
- ・泳動用緩衝液
Tris-BES 泳動バッファー (10x) [テフコ(株)]
- ・酸化防止剤
酸化防止剤 (400x) [テフコ(株)]

プロットイング

- ・転写装置
トランスプロット SD セル [BIO-RAD]^{*1}
- ・転写膜
Amersham Hybond PVDF (0.45μm) [GE]^{*2}
- ・ろ紙
プロットアブソorbentフィルターペーパー (極厚) [BIO-RAD]^{*1}
- ・転写用緩衝液
10x Tris/Glycine [BIO-RAD]^{*1}
メタノール

免疫染色

- ・洗浄液
10x TBS [BIO-RAD]^{*1}
Tween-20
- ・ブロッキング試薬
ウシ血清アルブミン
- ・二次抗体キット
VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit [VECTOR]^{*4}
- ・検出試薬
Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV <BCIP/NBT> [VECTOR]^{*4}
- ・検出試薬用緩衝液
100 mM Tris/塩酸 (pH 9.5)

※1 バイオ・ラッド ラボラトリーズ (株)

※2 GE ヘルスケア・ジャパン (株)

※3 ライフテクノロジーズジャパン (株) インビトロジェン製品

※4 VECTOR LABORATORIES, Inc.

■ 試薬の調製

試薬はすべて常温に戻してから使用して下さい。試薬の必要量は用いる容器によって異なります。必要量を確認の上、調製して下さい。

1. ローディング緩衝液の調製
Laemmli Sample Buffer と 2-メルカプトエタノールを 19 : 1 で混和したものを用品です。
2. 検体抽出液の調製
A 抽出用A液、B 抽出用B液、C 検体希釈液、精製水を 1:1:1:17 の比率で混合します。
* A 抽出用A液に沈澱が生じている場合は加温溶解してからご使用下さい。溶解後は室温で保存可能です。
3. 泳動用緩衝液の調製
Tris-BES 泳動バッファー(10x)を精製水で10倍に希釈して使用します。上部バッファー槽に酸化防止剤(400x)を400倍希釈になるように添加して下さい。
4. 転写用緩衝液の調製
精製水とメタノールおよび10x Tris/Glycineを7:2:1の比で混和して使用します。
5. 洗浄液の調製
10x TBSを精製水で10倍に希釈します。この溶液にTween-20を終濃度が0.05%になるように添加して下さい。
* ブロッキング溶液の調製に使用します。
6. ブロッキング溶液の調製
調製済み洗浄液にウシ由来血清アルブミンを終濃度が0.1%になるように添加して下さい。
* 免疫染色に用いる各試薬の調製に使用します。
7. 一次抗体溶液の調製
E ウサギ抗β-ラクトグロブリン抗体溶液を調製済みブロッキング溶液で100倍に希釈します。
8. 二次抗体溶液の調製
VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kitのビオチン標識抗ウサギIgG抗体をブロッキング溶液で10,000倍に希釈します。
9. アルカリホスファターゼ標識ビオチン-アビジン溶液の調製
VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit中のA液とB液をブロッキング溶液10mLに対して、それぞれ1滴の割合で順次混和します。
* 当溶液は使用する30分前に調製して下さい。
10. 検出試薬の調製
Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV <BCIP/NBT>中の1液、2液、3液を100mM Tris/塩酸(pH 9.5)10mLに対して、それぞれ2滴の割合で順次混和します。

■ 操作手順

I. 検体および標準品の調製

1. 検体の抽出・調製

- (1) 食品検体をミキサー等で粉砕し、均質化操作を行います。
均質化された検体 1g をポリプロピレン製 50 mL 遠心管等に取り、検体抽出液 19 mL を加えてよく振り混ぜて混合します。この際にあまり泡立たせないよう注意しながら、ポルテックスミキサー等を用いて検体を分散させます。
- (2) 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。
- (3) 抽出液の pH を確認し、必要であれば中性付近(pH 6.0~8.0)になるように調整します。(pH 試験紙で結構です)
- (4) 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上清をろ紙でろ過し、抽出液とします。
- (5) この抽出液とローディング緩衝液を 1:2 で混和し、沸騰水浴中で 5 分間加温したものを泳動用サンプルとします。

2. 牛乳標準品の調製

- (1) 検体抽出液とローディング緩衝液を 1:2 で混和し、沸騰水浴中で 5 分間加温して標準品の希釈液を作製します。
- (2) D 牛乳標準品 (10µg/mL) を終濃度が 1µg/mL および 0.5µg/mL になるように(1)で作製した希釈液にて調製して下さい。

II. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ご使用になる装置・試薬の取扱説明書に従い実施して下さい。

1. ポリアクリルアミドゲルを電気泳動槽にセットし、ゲルの各ウェルが完全に浸るまで泳動用緩衝液を注ぎます。液漏れのないことを確認して下さい。
2. ゲルのウェルに分子量スタンダードを 7µL、牛乳標準品 (10µg/mL、1µg/mL、0.5µg/mL) および泳動用サンプルを 20µL ずつ注入します。
* 注入の際に試料が隣のウェルに混入しないよう注意して下さい。
3. ゲル 1 枚あたり 60 mA の定電流で泳動します。ローディング緩衝液に含まれるプロモフェノールブルーがゲルの下端から 1 cm のあたりまで進んだところで泳動を終了します。

III. プロットティング

ご使用になる装置・試薬の取扱説明書に従い実施して下さい。以下の説明は本体が陽極、蓋が陰極の装置に基づいています。

1. 転写膜、ろ紙 2 枚とゲルを、転写装置の陽極面からろ紙、転写膜、ゲル、ろ紙の順に重層します。

- * ろ紙は予め 30 分間転写用緩衝液に浸しておきます。また、転写膜はメタノールに数十秒間浸してから転写用緩衝液に 30 分間浸して使用します。
- * 転写膜、ゲル等を重層する際に気泡が入らないよう注意して下さい。
- * ゲルの乾燥を防ぐために、作業は速やかに行ってください。

2. 陰極のついた上部蓋を閉じ、15 V の定電圧で 1 時間転写します。

IV. 免疫染色

1. 転写後の膜を速やかにブロッキング溶液に浸し、室温で 1 時間振とう又は 4°C で一晩静置します。
2. ブロッキング溶液を捨て、膜を一次抗体溶液に浸して 1 時間振とうします。
3. 一次抗体溶液を捨て適量の洗浄液を加え、5 分間振とうします。この洗浄操作を 3 回繰り返します。
4. 洗浄液を捨て、膜を二次抗体溶液に浸して 30 分間振とうします。反応後、溶液を捨て洗浄液で 5 分間 3 回洗浄します。
5. 膜をアルカリホスファターゼ標識ビオチン-アビジン溶液に浸し、20 分間振とうします。反応後、溶液を捨て洗浄液で 5 分間 3 回洗浄します。
6. 膜を 100 mM Tris/塩酸 (pH 9.5) に浸し、15 分間振とうします。
7. 溶液を捨て検出試薬に 3~10 分間(当社目安)浸し、目的タンパク質のバンドを検出します。バンドの濃さは、免疫染色試薬のロット等に依存する場合がありますので、発色が弱い場合は反応時間を延長して下さい。バックグラウンドが高くなるよう注意して下さい。
8. バンドが十分濃くなったら検出試薬を取り除き、精製水で膜をすすいだ後に遮光しながら精製水中で 15 分間振とうして洗浄します。
9. 洗浄操作の終わった膜は風乾して下さい。遮光下で保存可能です。

■ 結果の判定

ポリアクリルアミドゲル電気泳動における β -ラクトグロブリンの見かけ上の分子量 (MW= 18,400) 付近に明瞭なバンドが検出されたものを陽性とします。

■ バリデーション試験結果

試料

ジュース、ゼリー、おしるこ、トマトソース、コンソメスープ
各試料に牛乳一次標準品粉末をタンパク質濃度が0μg/g又は10μg/gとなるように添加した。

参加機関（8機関）

カゴメ株式会社
神奈川県衛生研究所
川崎市衛生研究所
埼玉県衛生研究所
千葉県衛生研究所
社団法人日本食品衛生協会 食品衛生研究所
株式会社ハウス食品分析テクノサービス
株式会社ファスマック (50音順)

手順

測定マニュアル、報告様式に関する文書、試料（10種類）、キット、その他必要試薬をそれぞれの参加機関に送付した。参加機関は各試料毎に2回の抽出・測定を行い、得られた結果を株式会社森永生科学研究所へ返送した。

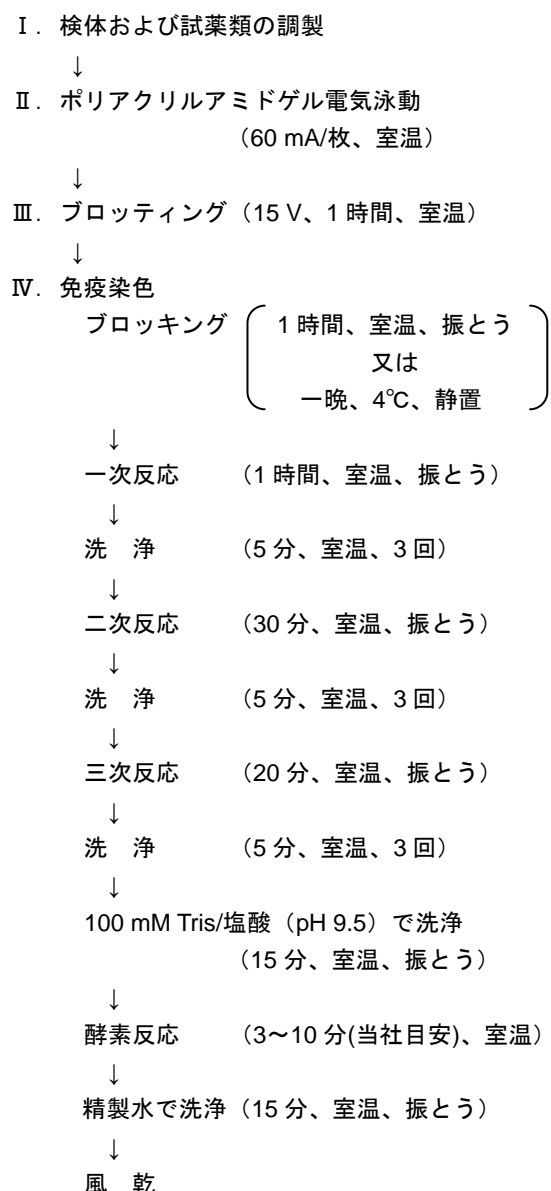
バリデーション結果

下表に、本キットのバリデーションから得られた結果を示す。牛乳濃度0μg/gのブランク試料では全ての試料で陰性であり、10μg/gの牛乳を含む試料では全ての試料で陽性となった。以上より、ブランク試料の陰性率、10μg/g添加試料における陽性率は90%以上であり、通知（「アレルギー物質を含む食品の検査法について」平成22年9月10日付消費表第286号消費者庁次長通知）の基準を満たしている。

(表) モリナガ FASPEK 牛乳ウエスタンブロットキット
(β-ラクトグロブリン)

試料	陽性率	
	添加牛乳濃度 (0μg/g)	添加牛乳濃度 (10μg/g)
ジュース	0/16	16/16
ゼリー	0/16	16/16
おしるこ	0/16	16/16
トマトソース	0/16	16/16
コンソメスープ	0/16	16/16

〈測定のプロフローチャート〉



■ 使用上又は取扱い上の注意

1. 本キット内の試薬は、研究目的以外に使用しないで下さい。
2. 有効期限の過ぎたキットは使用しないで下さい。
3. 保存中や反応中は強い光にさらさないで下さい。

■ キットの保存条件および有効期限

1. 2~8℃で光の当たらない場所に保管して下さい。
2. 有効期限はキット外箱のラベルに記載してあります。

■ 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. 測定結果を利用した結果として発生し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、製品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。