

(別添 3)

判断樹について

1 基本的注意事項

- (1) この判断樹は、健康被害防止の観点に立ち、現在の科学的知見に基づき、アレルギー症状を誘発する可能性のある食品の誤表示による危害をできる限り回避することを目的とし、構成されている。
- (2) 食品中の特定原材料の監視は、原則としてこの判断樹に基づいて行う。
- (3) 検査には偽陽性又は偽陰性を示す食品が存在するので、その判断には十分注意する。すべての検査において、偽陽性又は偽陰性の情報を参照して偽陽性又は偽陰性の確認を必ず行う。
- (4) すべての検査において、製造記録の確認を必ず行う。(ただし、判断樹枝①の場合のみ省略可能。)

2 スクリーニング検査について

- (1) スクリーニング検査は定量検査法を用いて行う。なお、ELISA 法以外の定量検査法を用いることは妨げないが、この場合には、この検査法と同等あるいは同等以上の性能をもっていること。
- (2) スクリーニング検査は、検査特性の異なる 2 種の検査を組み合わせて実施する。
- (3) スクリーニング検査で陽性とは、食品採取重量 1g あたりの特定原材料由来のタンパク質含量が $10\mu\text{g}$ 以上のものをいう¹。
- (4) えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかにが区別できないことを留意する必要がある。

3 製造記録の確認について

- (1) ここでいう「製造記録」とは、製造レシピ(配合表を含む。)、作業手順書、作業日報、検査成績書、ガントチャート(ライン毎の製造予定表)、品質(成分)保証書、商品カルテ(成分情報を含む。)、特定原材料を含まない旨の証明書等をいう。
- (2) 製造記録に記載があるにもかかわらず、表示がないものについては、その根拠を必ず確認する。また、製造記録に記載がないにもかかわらず、表示があるものについては、その根拠を必ず確認する。
- (3) ここでいう「根拠」とは、検査結果もしくは製造記録からの推計値をいう。
- (4) 製造記録が不明なものは、「記載なし」と同様に扱う。

4 確認検査について

- (1) 確認検査は定性検査法を用いて行う。なお、ウェスタンブロット法、PCR 法以外の定性検査法を用いることは妨げないが、この場合には、これらの検査法と同等あるいは同等以上の性能をもっていること。
- (2) 卵、乳の確認検査は、一般的にウェスタンブロット法が使用されている。

この場合、使用する抗体は、卵はオボアルブミン抗体及びオボムコイド抗体、乳は α -カゼイン抗体及び β -ラクトグロブリン抗体を使用する。

- (3) 小麦、そば、落花生、えび、かにの確認検査は、一般的にPCR法が使用されている。PCR法で特異的遺伝子増幅バンドが検出されたものを陽性とする。
- (4) 確認検査の際には、スクリーニング検査で用いたものと同じ調製試料から採取して用いる。2度目の採取が不可能である場合には、別の同検査対象検体を入手し検査を行う。

5 違反発見時の措置

- (1) 特定原材料が含まれる食品に係る表示が訂正されるまでの間（判断樹枝⑫においては、製造記録に「表示なし」の根拠の記載がされるまでの間）は、当該食品等の販売を行わないよう指導する。
- (2) さらに、必要に応じて食品衛生法第54条若しくは第55条に基づく措置等を検討する。

6 枝①から⑫までの考え方

（卵、乳、小麦、そば、落花生の監視のみ）

①	特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生）の表示があり、2種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくとも1つが「+（プラス）」の場合。
---	---

- この場合でも製造記録の確認を行うことは望ましく、この判断樹がこれを妨げるものではないが、省略は可能。
- 確認検査は不要。
- 適正表示と考えられ、行政措置は不要。

（えび、かにの監視のみ）

②	特定原材料（えび、かに）の表示があり、2種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくとも1つが「+（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がある場合。
---	--

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 適正表示と考えられ、行政措置は不要。
- えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかが区別できないこと、えび及びかに以外の甲殻類の一部も検知することに留意する必要がある。

（えび、かにの監視のみ）

③	特定原材料（えび、かに）の表示があり、2種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくとも1つが「+（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がなく、表示した根拠がある場合。
---	--

- 製造記録の確認は必須。

- 製造記録に記載がないにもかかわらず表示した根拠の確認が必要。
- 確認検査は不要。
- 表示することは可能であり、行政措置は不要。
- 製造記録に記載がないにもかかわらず、表示した根拠があれば、今後、その根拠を製造記録に記載するように指導する。
- えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかにが区別できないこと、えび及びかに以外の甲殻類の一部も検知することに留意する必要がある。

(えび、かにの監視のみ)

④	特定原材料(えび、かに)の表示があり、2種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくとも1つが「+(プラス)」で、製造記録に特定原材料の記載がなく、表示した根拠がない場合。
---	--

- 製造記録の確認は必須。
- 原材料欄の外に注意喚起をすることは可能である。
- えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかにが区別できないこと、えび及びかに以外の甲殻類の一部も検知することに留意する必要がある。
- 必要があれば確認検査を実施

⑤	特定原材料の表示があり、2種の検査によるスクリーニング検査結果がどちらも「-(マイナス)」で、製造記録に特定原材料の記載がある場合。
---	--

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 表示することは可能であり、行政措置は不要。
- 食品中に含まれる特定原材料等の総タンパク量が、数 $\mu\text{g/ml}$ 濃度レベル又は数 $\mu\text{g/g}$ 含有レベルに満たない場合は、表示の必要性はないが、この場合に表示をするかしないかの判断は、製造者もしくは販売者によるものである。
- スクリーニング検査結果の「-(マイナス)」が、特定原材料の総タンパク量が0(ゼロ)を意味しないことにご留意願いたい。

⑥	特定原材料の表示があり、2種の検査によるスクリーニング検査結果がどちらも「-(マイナス)」で、製造記録に特定原材料の記載がない場合。
---	--

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 表示してはならず、表示を訂正させる。
- 製造記録に記載がないにもかかわらず、表示した根拠があれば、今後、その根拠を製造記録に記載するように指導する。

⑦	特定原材料の表示がなく、2種の検査によるスクリーニング検査のうち少なくともどちらか1つが「+ (プラス)」で、製造記録に特定原材料の記載がある場合。
---	--

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 表示は必要であり、表示を訂正させる。
- えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかにが区別できないこと、えび及びかに以外の甲殻類の一部も検知することに留意する必要がある。

⑧	特定原材料の表示がなく、2種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくともどちらか1つが「+ (プラス)」で、製造記録に特定原材料の記載がなく、確認検査結果が「+ (プラス)」の場合。
---	--

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は必須。
- 確認検査結果によってスクリーニング検査結果が偽陽性でないことを確認できており、表示が必要であり、表示を訂正させる。
- ただし、通常、原材料として扱われないものによるコンタミネーションが考えられる場合（例：「ソバをゆでた湯でうどんをゆでた場合のゆで湯」、「天ぷらやカツなどの揚げ油」等）は、欄外記載による注意喚起が望ましい。
- えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかにが区別できないこと、えび及びかに以外の甲殻類の一部も検知することに留意する必要がある。

⑨	特定原材料の表示がなく、2種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくともどちらか1つが「+ (プラス)」で、製造記録に特定原材料の記載がなく、確認検査結果が「- (マイナス)」の場合。
---	---

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は必須。
- 確認検査結果によってスクリーニング検査結果が偽陽性でないことを確認できておらず、表示を訂正させることはしない。
- しかし、確認検査結果が「- (マイナス)」がスクリーニング検査結果の「+ (プラス)」を完全に否定するものではないことに留意する必要がある。
- 原材料欄の外に注意喚起をすることは可能である。
- えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかにが区別できないこと、えび及びかに以外の甲殻類の一部も検知することに留意する必要がある。

⑩	特定原材料の表示がなく、2種の検査によるスクリーニング検査結果
---	---------------------------------

	のどちらも「－（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載があり、表示しなかった根拠がある場合。
--	--

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 製造記録に記載があるにもかかわらず、表示しなかった根拠の確認が必要。
- 表示する義務はなく、適正表示である。

⑪	特定原材料の表示がなく、2種の検査によるスクリーニング検査結果のどちらも「－（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載があり、表示しなかった根拠がない場合。
---	---

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 製造記録に記載があるにもかかわらず、表示しなかった根拠の確認が必要。
- 表示することが望ましい。スクリーニング検査結果でどちらも「－（マイナス）」であるため、表示を訂正させることはしないが、表示を勧奨する。
- しかし、製造記録に特定原材料の記載があるにもかかわらず、表示しなかった根拠については製造記録等へ必ず記載するように指導する。なお、スクリーニング検査の検査結果をもって表示しない根拠とする場合でも、自主的な検査結果は根拠として認めるが、行政検査における結果は表示をしない根拠として認めない。

⑫	特定原材料の表示がなく、2種の検査によるスクリーニング検査結果のどちらも「－（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載がない場合。
---	--

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 適正表示と考え、表示がなくても問題ない。

- 1 平成13年10月29日に取りまとめられた厚生労働科学研究費補助金による食品表示が与える社会的影響とその対策及び国際比較に関する研究班アレルギー表示検討会中間報告書において、「数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度レベル又は数 $\mu\text{g}/\text{g}$ 含有レベル以上の特定原材料等の総タンパク質を含有する食品については表示が必要と考えられる。」とされたこと等による。

(別添4)

標準品規格

1. 卵検知用標準液

1.1. 調製法

以下に示す方法に従い、卵一次標準粉末、卵標準品原液、卵一次希釈液及び卵高濃度標準液を調製する。卵標準品原液から卵高濃度標準液調製までの操作は、1日の内に行う。

卵一次標準粉末調製方法

白色レグホン種（産卵鶏）の新鮮卵1kgの卵殻を外し、均一にホモジナイズした後に凍結乾燥する。乾燥物を微粉碎し、卵一次標準粉末とする。

卵標準品原液調製方法

卵一次標準粉末0.2gを50mL PP製チューブに採取し、抽出用緩衝液* 20mLを加え、よくふり混ぜて混合し、固形物を分散させた後、振とう機（90～110rpm）で一晩抽出する。抽出液を10,000×gで30分間遠心分離した後、上澄液を孔径0.8µmのマイクロフィルターでろ過し、卵標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置き、振とう幅は3cm程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブの上下を入れ替えるなどの操作をして、液面に沿って付着するサンプルを分散させる。

* 抽出用緩衝液 0.5% SDS 及び2%メルカプトエタノールを含有するPBS（pH 7.4）。

卵一次希釈液調製方法

卵標準品原液をpH 7.4のPBSで10倍に希釈し、卵一次希釈液とする。

卵高濃度標準液調製方法

卵一次希釈液を0.2% BSAを含むpH 7.4のPBSで2倍に希釈し、卵高濃度標準液とする。卵標準品原液から卵高濃度標準液調製までの操作は、1日の内に行う。

1.2. 規格

卵標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGEによる電気泳動を行うとき、200, 130, 90, 50 kDa付近にそれぞれ明瞭なバンドを認める。

タンパク量

2-D Quant kit（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）により、タンパク質を定量するとき、その濃度は3.8～5.6 mg/mLである。

参考 以下に示す値は参考値とする。

卵一次希釈液のタンパク質を、2-D Quant kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) により定量するとき、その濃度は卵標準品原液のタンパク質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。卵標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、7. に示すような泳動像が得られる。

2. 牛乳検知用標準液

2.1. 調製法

以下に示す方法に従い、牛乳一次標準粉末、牛乳標準品原液、牛乳一次希釈液及び牛乳高濃度標準液を調製する。牛乳標準品原液から牛乳高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

牛乳一次標準粉末調製方法

ホルスタイン種 (乳用牛) の新鮮乳 1 L を氷で冷却しながら攪拌し、乳脂肪が凝固して生じる乳脂塊を脱脂綿で濾過する。この操作を 3 回繰り返し脂肪を除去した後、濾液を凍結乾燥し、乾燥物を微粉碎して牛乳一次標準粉末とする。

牛乳標準品原液調製方法

牛乳一次標準粉末 0.2 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、抽出用緩衝液* 20 mL を加え、よくふり混ぜて混合し、固形物を分散させた後、振とう機 (90～110 rpm) で一晩抽出する。抽出液を 10,000×g で 30 分間遠心分離した後、上澄液を孔径 0.8 μm のマイクロフィルターでろ過し、牛乳標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置く。振とう幅は 3 cm 程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブの上下を入れ替えるなどの操作をして、液面に沿って付着するサンプルを分散させる。

* 抽出用緩衝液 0.5 % SDS 及び 2 % メルカプトエタノールを含有する PBS (pH 7.4)。

牛乳一次希釈液調製方法

牛乳標準品原液を pH 7.4 の PBS で 10 倍に希釈し、牛乳一次希釈液とする。

牛乳高濃度標準液調製方法

牛乳一次希釈液を 0.2 % BSA を含む pH 7.4 の PBS で 2 倍に希釈し、牛乳高濃度標準液とする。牛乳標準品原液から牛乳高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

2.2. 規格

牛乳標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGE による電気泳動を行うとき、40～25 kDa の範囲に 3 本、20 kDa 付近に 1 本の明瞭なバンドを認める。

タンパク量

2-D Quant kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) により、タンパク質を定量するとき、その濃度は 2.1~3.1 mg/mL である。

参考 以下に示す値は参考値とする。

牛乳一次希釈液のタンパク質を、2-D Quant kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) により定量するとき、その濃度は牛乳標準品原液のタンパク質濃度の 0.08 倍~0.12 倍である。牛乳標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、7. に示すような泳動像が得られる。

3. 小麦検知用標準液

3.1. 調製法

以下に示す方法に従い、小麦一次標準粉末、小麦標準品原液、小麦一次希釈液及び小麦高濃度標準液を調製する。小麦標準品原液から小麦高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

小麦一次標準粉末調製方法

以下に示す 14 銘柄の小麦混合物を粉砕し、14 メッシュの篩 (aperture=1.18 mm) を通過したものを、小麦一次標準粉末とする。

混合物に含まれる銘柄

No.1 Canada Western Red Spring	7.14 %
US No.2 or better (Dark) Northern Spring	7.14 %
US Hard Red Winter - High Protein	7.14 %
US Hard Red Winter - Semi Hard	7.14 %
Canada Western Amber Durum - Triticum durum	7.14 %
US Western White (White Club + Soft White)	7.14 % (Club 1.6 %)
Australian Premium White for Japan	7.14 %
Australian Prime Hard	7.14 %
ホクシン	7.14 %
ハルユタカ	7.14 %
農林 61 号	7.14 %
チクゴイズミ	7.14 %
バンドウワセ	7.14 %
シロガネ	7.14 %

小麦標準品原液調製方法

小麦一次標準粉末 1 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、抽出用緩衝液* 20 mL を加え、よくふり混ぜて混合し、固形物を分散させた後、振とう機 (90~110 rpm) で一晩抽出する。抽出液を 10,000×g で 30 分間遠心分離した後、上澄液を孔径 0.8 μm のマイクロフィ

ルターでろ過し、小麦標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置く。振とう幅は3 cm程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブの上下を入れ替えるなどの操作をして、液面に沿って付着するサンプルを分散させる。

* 抽出用緩衝液 0.5 % SDS 及び 2 %メルカプトエタノールを含有する 0.1M Tris-HCl (pH 8.6)

小麦一次希釈液調製方法

小麦標準品原液を pH 7.4 の PBS で 10 倍に希釈し、小麦一次希釈液とする。

小麦高濃度標準液調製方法

小麦一次希釈液を 0.2 % BSA を含む pH 7.4 の PBS で 2 倍に希釈し、小麦高濃度標準液とする。小麦標準品原液から小麦高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

3.2. 規格

小麦標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGE による電気泳動を行うとき、32 kDa~120 kDa の範囲に 4 本以上のバンドを認める。

タンパク量

2-D Quant kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) により、タンパク質を定量するとき、その濃度は 4.0~6.0 mg/mL である。

参考 以下に示す値は参考値とする。

小麦一次希釈液のタンパク質を、2-D Quant kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) により定量するとき、その濃度は小麦標準品原液のタンパク質濃度の 0.08 倍~0.12 倍である。小麦標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、7. に示すような泳動像が得られる。

4. そば検知用標準液

4.1. 調製法

以下に示す方法に従い、そば一次標準粉末、そば標準品原液、そば一次希釈液、そば高濃度標準液を調製する。そば標準品原液からそば高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

そば一次標準粉末調製方法

茨城県産及び中国産(中国北方)産のそばを等量混合した後粉碎し、14 メッシュの篩 (aperture=1.18 mm) を通過したものを、そば一次標準粉末とする。

そば標準品原液調製方法

そば一次標準粉末 1 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、抽出用緩衝液* 20 mL を加え、よくふり混ぜて混合し、固形物を分散させた後、振とう機 (90~110 rpm) で一晩抽出する。抽出液を 10,000×g で 30 分間遠心分離した後、上澄液を孔径 0.8 μm のマイクロフィルターでろ過し、そば標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置く。振とう幅は 3 cm 程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブの上下を入れ替えるなどの操作をして、液面に沿って付着するサンプルを分散させる。

* 抽出用緩衝液 0.5 % SDS、2 % メルカプトエタノール及び 0.5 M 塩化ナトリウムを含有する 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)

そば一次希釈液調製方法

そば標準品原液を pH 7.4 の PBS で 10 倍に希釈し、そば一次希釈液とする。

そば高濃度標準液調製方法

そば一次希釈液を 0.2 % BSA を含む pH 7.4 の PBS で 2 倍に希釈し、そば高濃度標準液とする。そば標準品原液からそば高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

4.2. 規格

そば標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGE による電気泳動を行うとき、28 kDa 付近に 1 本の明瞭なバンドと 32 kDa ~83 kDa の範囲に 4 本以上のバンドを認める。

タンパク量

2-D Quant kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) により、タンパク質を定量するとき、その濃度は 2.8~4.2 mg/mL である。

参考 以下に示す値は参考値とする。

そば一次希釈液のタンパク質を、2-D Quant kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) により定量するとき、その濃度はそば標準品原液のタンパク質濃度の 0.08 倍~0.12 倍である。そば標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、7. に示すような泳動像が得られる。

5. 落花生検知用標準液

5.1. 調製法

以下に示す方法に従い、落花生一次標準粉末、落花生標準品原液、落花生一次希釈液、落花生高濃度標準液を調製する。落花生標準品原液から落花生高濃度標準液調製までの操

作は、1日の内に行う。

落花生一次標準粉末調製方法

千葉県産バージニア種落花生を乳鉢で粉碎しペースト状としたもの1 gを50 mL PP製チューブに採取し、アセトン10 mLを加え、ボルテックスミキサーを用いて1分間攪拌した後、10,000×gで30分間遠心分離し、上清を除く。この操作を3回くり返す。チューブを45°Cのアルミバス上に置き、約7 h乾燥し、落花生一次標準粉末とする。

落花生標準品原液調製方法

落花生一次標準粉末0.4 gに抽出用緩衝液* 20 mLを加え、よくふり混ぜて混合し、固形物を分散させた後、振とう機(90~110 rpm)で一晩抽出する。抽出液を10,000×gで30分間遠心分離した後、上澄液を孔径0.8 μmのマイクロフィルターでろ過し、落花生標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置く。振とう幅は3 cm程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブの上下を入れ替えるなどの操作をして、液面に沿って付着するサンプルを分散させる。

* 抽出用緩衝液 0.5 % SDS、2 %メルカプトエタノール及び0.5 M塩化ナトリウムを含むする20 mM Tris-HCl (pH7.5)

落花生一次希釈液調製方法

落花生標準品原液をpH 7.4のPBSで10倍に希釈し、落花生一次希釈液とする。

落花生高濃度標準液調製方法

落花生一次希釈液を0.2 % BSAを含むpH 7.4のPBSで2倍に希釈し、落花生高濃度標準液とする。落花生品標準原液から落花生高濃度標準液調製までの操作は、1日の内に行う。

5.2. 規格

落花生標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGEによる電気泳動を行うとき、70 kDa付近に1本の明瞭なバンドと15 kDa~30 kDaの範囲に3~4本の明瞭なバンドを認める。

タンパク量

2-D Quant kit (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)により、タンパク質を定量するとき、その濃度は3.6~5.3 mg/mLである。

参考 以下に示す値は参考値とする。

落花生一次希釈液のタンパク質を、2-D Quant kit (GEヘルスケアバイオサイエンス

社製)により定量するとき、その濃度は落花生標準品原液のタンパク質濃度の0.08倍～0.12倍である。落花生標準品原液についてSDS-PAGEを行うとき、7.に示すような泳動像が得られる。

6. 甲殻類検知用標準液*

* えび、かにのスクリーニングに使用するELISAキットはえびとかにを区別せずに検出するため、本標準液の名称は甲殻類検知用標準液とする。

6.1. 調製法

以下に示す方法に従い、甲殻類一次標準粉末、甲殻類標準品原液、甲殻類一次希釈液及び甲殻類高濃度標準液を調製する。甲殻類標準品原液から甲殻類高濃度標準液調製までの操作は、1日の内に行う。

甲殻類一次標準粉末調製法

ウシエビ(ブラックタイガー)(養殖エビ)の尾部筋肉を採取し、氷冷しながら均一にホモジナイズした後に凍結乾燥する。乾燥物を微粉碎し、甲殻類一次標準粉末とする。

甲殻類標準品原液調製法

甲殻類一次標準粉末0.1gを50mL PP製チューブに採取し、抽出用緩衝液*20mLを加え、よくふり混ぜて混合し、固形物を分散させた後、振とう機(90~110rpm)で一晩抽出する。抽出液を10,000×gで30分間遠心分離した後、上澄液を孔径0.8μmのマイクロフィルターでろ過する。ろ過した液を、100℃で10分間加熱し、甲殻類標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置き、振とう幅は3cm程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブの上下を入れ替えるなどの操作をして、液面に沿って付着するサンプルを分散させる。

* 抽出用緩衝液 0.5% SDS、2%メルカプトエタノール、1% Inhibitor Cocktail 及び5mM EDTA (Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit (Thermo Fisher Scientific 社製))を含有するPBS (pH 7.4)

甲殻類一次希釈液調製法

甲殻類標準品原液をpH 7.4のPBSで10倍に希釈し、甲殻類一次希釈液とする。

甲殻類高濃度標準液調製法

甲殻類一次希釈液を0.2% BSAを含むpH 7.4のPBSで2倍に希釈し、甲殻類高濃度標準液とする。甲殻類標準品原液から甲殻類高濃度標準液調製までの操作は、1日の内に行う。

6.2. 規格

甲殻類標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGE による電気泳動を行うとき、160、41、37kDa 付近にそれぞれ 1 本、20～16kDa の範囲に 4 本の明瞭なバンドを認める。

タンパク量

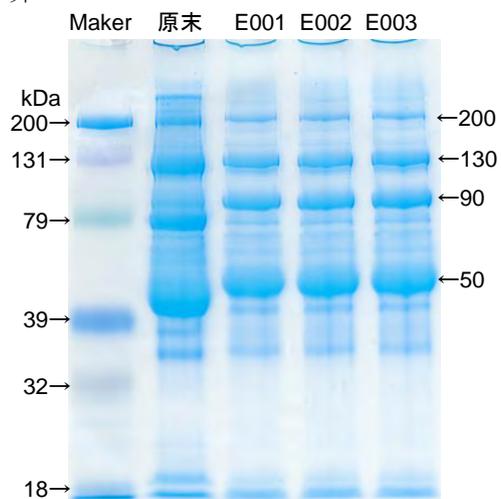
2-D Quant kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) により、タンパク質を定量するとき、その濃度は 2.7～4.1mg/mL である。

参考 以下に示す値は参考値とする。

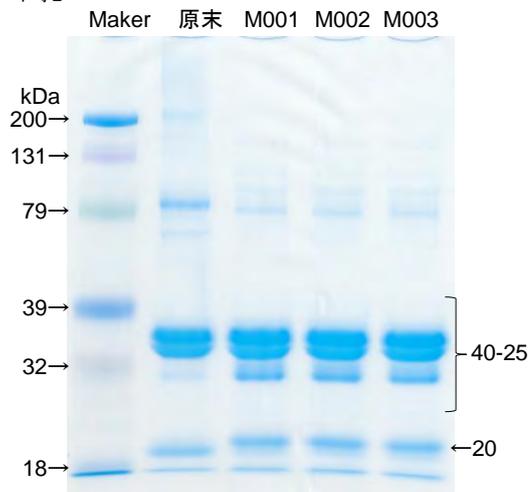
甲殻類一次希釈液調製のタンパク質を 2-D Quant kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) により定量するとき、その濃度は甲殻類標準品原液のタンパク質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。甲殻類標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、7. に示すような泳動像が得られる。

7. 各標準品原液の SDS-PAGE 電気泳動像

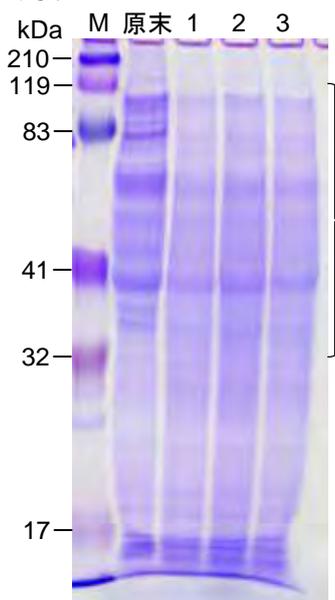
卵



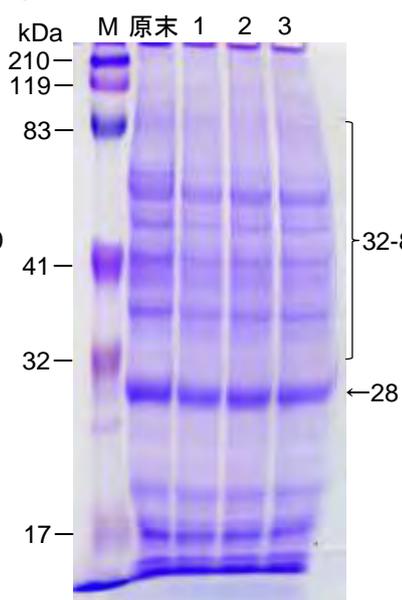
牛乳



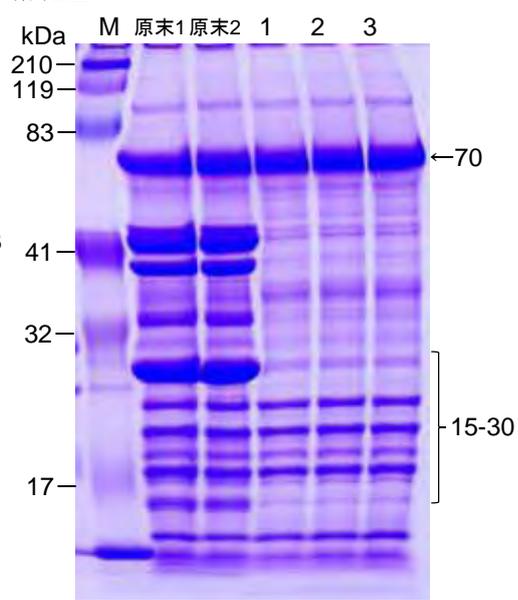
小麦



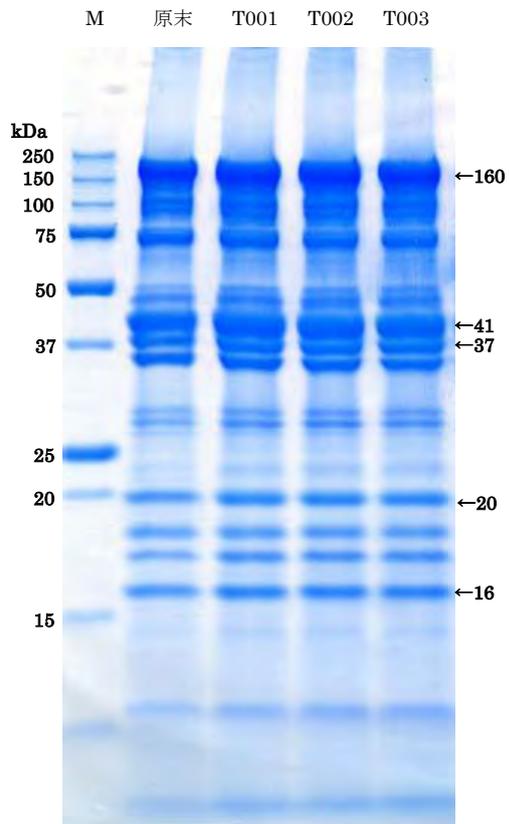
そば



落花生



甲殻類



原末：卵・牛乳・小麦・そば・甲殻類標準粉末

原末 1：落花生脱脂前粉末

原末 2：落花生脱脂後粉末

E001-003, M001-003, 1-3, T001-003 : ロット番号