

## ***Broad Check***

I. はじめに	3
II. 特徴	4
III. キットの構成	5
IV. サンプルの前処理法	6
V. 操作法	7 ~ 8
VI. 操作上の注意	9
VII. 基本性能	10
VIII. 貯蔵法および有効期限	11

# **『New Quinolone』 Kit**

**Ver.2**



Research & Development

株式会社 フロンティア研究所

## I. はじめに

抗菌剤（抗生物質）は細菌性の炎症を抑えるために広く使用されている薬剤ですが、抗菌剤の多用に伴って耐性菌が出現し、その抗菌剤が効かなくなることが近年大きな問題となっています。

また、抗菌剤は畜産業や水産養殖業においても幅広く使われており、残留したまま食品として人間の体内に取り込まれるということは、耐性菌ができやすくなる大きな問題が発生してきます。

さまざまな抗菌剤のなかでも、ニューキノロン系抗菌剤は抗菌スペクトルが広いため、近年さまざまな誘導体が開発・使用されており、食品中のニューキノロン系抗菌剤の汚染が問題となってきております。

今回、我々はこのニューキノロン系の抗菌剤に広く反応するモノクローナル抗体を使用し、食品中の残留ニューキノロン抗菌剤を簡便かつ多数の検体を同時に測定できるキットを開発しました。

### New Quinolone ELISA キット

- ▼ 0.4–300 ng/mL の範囲で測定できます。  
A) 固相化プレート
- ▼ 40 検体を二重測定でアッセイできます。  
B) 標準液
- ▼ プレートは一列（8 ウエル）ずつ取り外しができますので、キットの分割使用が可能です。  
C) 標識体溶液
- ▼ 検体量は 50 μL です。  
D) 標識体希釈液
- ▼ 反応時間は 1 時間 10 分です。  
E) 抗体溶液
- A) 固相化プレート
- B) 標準液
- C) 標識体溶液
- D) 標識体希釈液
- E) 抗体溶液
- F) 酵素基質液
- G) 反応停止液
- H) 濃縮洗浄液
- I) プレート密閉用カバー

#### 保存と安定性

2～8 °Cで保存してください。

製造日より 6 ヶ月は安定です。

## II. 特徴

本キットは、食品中に含まれるニューキノロン系抗菌剤を定量するためのキットです。本キットによるニューキノロン系抗菌剤の測定は簡便でしかも特異性・定量性に優れ、共存する他の生理活性物質や体液成分の影響を受けにくいなど多くの利点を備えております。

また、本キットに使用している抗体はメタノール・エタノール等の有機溶剤中でも抗原と反応できる有機溶剤耐性抗体を使用しているので、組織からの抽出後、直ちに ELISA で測定が可能です。

#### 特異性

本 ELISA キットはニューキノロン系抗菌剤に特異的であり、他のサルファ系やニトロフラン系の抗菌剤との交叉反応を認めません。（基本性能を参照）

#### 測定原理

本 ELISA キットは、ニューキノロン系抗菌剤の共通骨格を認識する特異性の高いニューキノロン モノクローナル抗体を用い、直接競合反応を使用した測定法です。

96 ウエルプレートの各ウエルには、抗マウス IgG 捕捉抗体 (anti mouse IgG capture antibody) が固定化されています。この各ウエルに HRP 標識ニューキノロンを加え、次に標品のエンロフロキサシンまたは検体、最後に抗ニューキノロン抗体を順次加えて競合反応させます。1 時間の反応中にウエル内で抗菌剤の濃度に依存して HRP-ニューキノロン-抗体複合体が形成されます。最後にこの複合体中の酵素 (HRP) 活性を測定することにより、検体中のニューキノロン濃度を求めることができます。

### III. キットの構成

試 薬	規 格	内 容 物
A IgG 固相化プレート	96 ウエルプレート 1枚	抗マウス IgG 固定化プレート
B 標準液	B0 ~ B7 各濃度 /Vial 8本	エンロフロキサシン 含有 50% メタノール
C 標識体溶液	60 $\mu$ L 1本	HRP 標識ニューキノロン
D 標識体希釈液	6 mL 1本	0.2% Tween 20 を含む リン酸緩衝生理食塩水
E 抗体溶液	6 mL 1本	抗ニューキノロンマウス IgG 含有 リン酸緩衝 生理食塩水
F 酵素基質液	12 mL 1本	3,3',5,5'-tetramethyl 1benzidine (TMB)
G 反応停止液	6 mL 1本	1N $\text{H}_2\text{SO}_4$
H 濃縮洗浄液	50 mL 1本	0.2% Tween 20 を含む 10倍濃縮リン酸緩衝 生理食塩水
I プレート密閉用 カバー	1枚	Aに付属

### IV. サンプルの前処理法

#### 1) 公定法

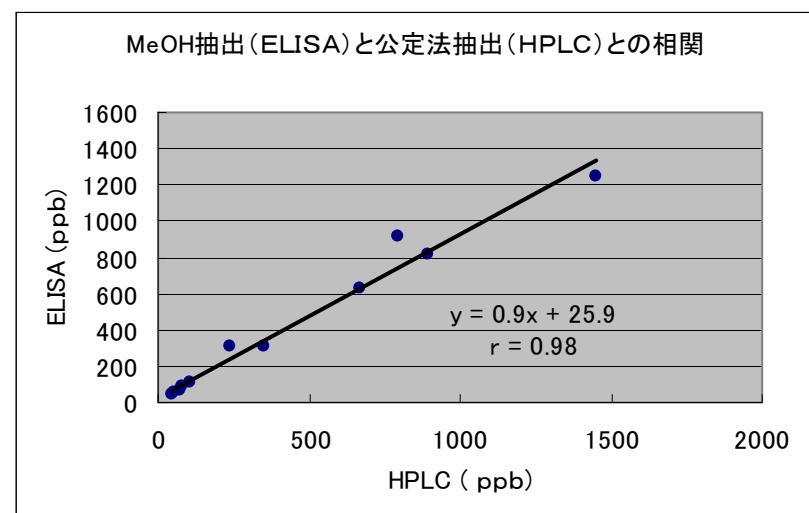
サンプルの前処理法は、公定法とよばれるアセトニトリルによる抽出により行い、最終的には 50% メタノールに溶解後 ELISA で測定する。

#### 2) メタノールによる簡便な抽出法

試料 (5 g) を 100% 冷メタノール (5 mL) で抽出し、遠心機 (3000 r.p.m. 5 ~ 10 分) で遠心し、上清 1 mL を蒸留水 1 mL と混合し、50% メタノール溶液とした後に、ELISA 法のサンプルに供する。残りの沈殿に再度冷メタノールを添加し同様に抽出して ELISA で測定する。測定値はそれぞれの測定値の総和で示す。

抽出のプロトコールは別表に示した。

以下に公定法で抽出したサンプルを HPLC で測定した測定値とメタノール法で抽出したサンプルを ELISA 法で測定した値の相関を示した。



## V. 操作法

### 使用器具および装置

- マイクロタイタープレートの吸光度計（プレートリーダー）、波長450 nmで測定できる装置。
- マイクロタイタープレート用振とう器。
- マイクロタイタープレート洗浄器、用手法の場合は洗浄ビン。
- マイクロピペットおよびチップ（50及び100 μLサンプリングできるもの）。
- メスシリンダー（1000mL）。
- 蒸留水または脱イオン水。

### 試薬の調製

- 標準液（B-0からB-7）は下記の濃度に調整済みなので、そのまま使用する。  
B0（0濃度）、B1（0.4 ng/mL）、B2（1.2 ng/mL）、B3（3.7 ng/mL）、B4（11.1 ng/mL）、B5（33.3 ng/mL）、B6（100 ng/mL）、B7（300 ng/mL）
- Cの標識ニューキノロン溶液は使用直前時に60 μL全量を標識ニューキノロン希釈液Dに加え、十分攪拌してから使用する。
- Eの抗ニューキノロン抗体溶液は調整済みなので、そのまま使用する。
- Fの酵素基質液は使用時に室温に戻してから使用する。
- Gの反応停止液は調整済みなのでそのまま使用する。
- Hの濃縮洗浄液は50 mL全量を精製水450 mLにて希釈し、プレート洗浄用に使用する。

### 測定操作

- キットの各バイアルを室温にもどす。
- 初めに希釈液Dで希釈した標識ニューキノロン溶液を各ウェルに50 μL入れる。
- 続いて、各ウェルに標準液または測定する検体50 μL加える。
- 次にニューキノロン抗体溶液Eを各ウェルに50 μLを加える。
- プレートを指で軽く叩き振動させ攪拌する。（プレート振とう器がある場合はそれを使用する）。
- プレートカバーをし、室温（20～25°C）で1時間反応を行う。
- 各ウェル中の液を除き、各ウェルに350 μLの洗浄液を満たした後、液を捨てる。これを3回繰り返した後、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして完全に液を除く。  
自動洗浄器を使用する場合は、洗浄液量を350 μLに、洗浄回数は3回に設定して使用する。
- 各ウェルに酵素基質溶液F 100 μLを入れ、室温で10分間反応させる。
- 各ウェルに酵素反応停止液G 50 μLを入れる。
- マイクロタイタープレート吸光度計にて波長450 nmを測定する。エンロフロキサシン標準液の各濃度（8ポイント）の測定値から標準曲線を作成し、検体中のニューキノロン測定値を標準曲線に当てはめ、濃度を算出する。

## VI. 操作上の注意

- 1) 採取後の検体は有機溶媒で抽出後、有機溶媒を留去したのち、必ず 50%メタノールに溶解してください。
- 2) 試薬は用時調製（希釀）を原則とし、また調製ごとに新しい容器をお使いください。ただし、洗浄液は希釀した状態で4°Cで6カ月間保存できます。
- 3) 濃縮洗浄液Hは保存中に沈殿を生ずることがあります、この沈殿は希釀調製時に溶解します。
- 4) 各ウエルの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行ってください。また各検体ごとに新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。
- 5) 100 ng/mLを超える高値検体の場合は、検体を50%メタノールで希釀してから測定してください。
- 6) 測定はすべて2重測定で行ってください。
- 7) 発色反応停止後は速やかに吸光度測定を行ってください。
- 8) 酵素基質の発色レベルは、反応温度、時間、プレートの振とうの程度などでわずかに影響を受けることがありますので、必ず測定毎に検量線を作成してください。
- 9) キット使用時、もしくは保存時には強い光が当たらないように注意してください。

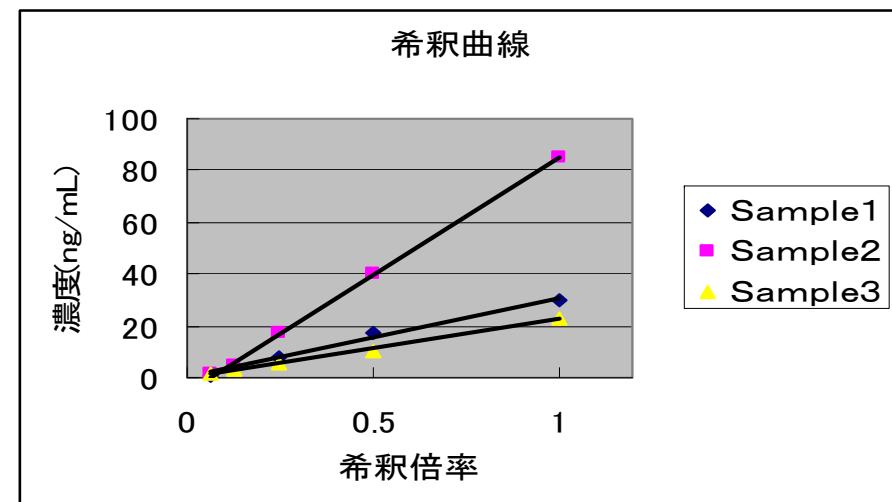
### 留意事項

- a. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせて使用しないこと。
- b. 試験・研究用にのみ使用し、診断等には使用しないこと。

## VII. 基本性能

### 他の抗菌剤との交差反応性

抗菌剤	反応率 (%)
Enrofloxacin	100
Norfloxacin	100
Ciprofloxacin	100
Danofloxacin	80
Enoxacin	20
Cinoxacin	18
Sarafloxacin	16
Oxolinic acid	5
Flumequin	1.4
Ofloxacin	1.4
Nalidixic acid	0.9
Nitoroflazone	0.02>
Sulfadimethxine	0.02>



添加回収試験 (うなぎ抽出液)

Sample No	added ng/mL	Observed ng/mL	Expected ng/mL	%Recovery
				%
1	0	0.6		
2	5.0	5.3	5.6	94
3	10.0	10.6	10.6	100
4	30.0	30.8	30.6	101

同時再現性 CV(%) 3. 5~5, 6

日差再現性 CV(%) 6. 1~8. 0

VII. 貯蔵法および有効期限

- 2~8°C遮光下で保存して下さい。
- 製造日より6ヶ月間は安定です。

製造: (株) フロンティア研究所

住所 〒061-3241 北海道石狩市新港西1丁目 777-12

販売・お問い合わせ先:



〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル

URL: <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)

TEL: (03) 5632-9610 FAX: (03) 5632-9619

TEL: (03) 5632-9620