

(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有する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。

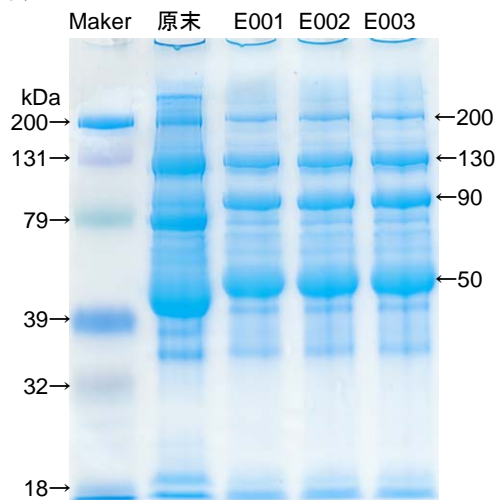
参考 以下に示す値は参考値とする。

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。

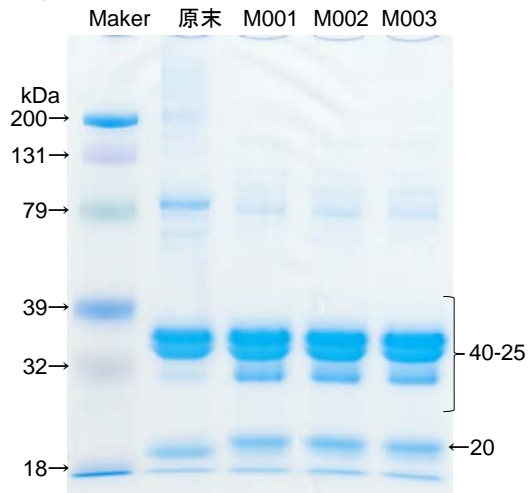


## 7. 各標準品原液の SDS-PAGE 電気泳動像

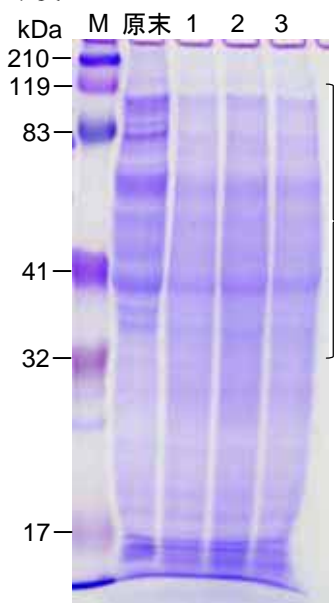
卵



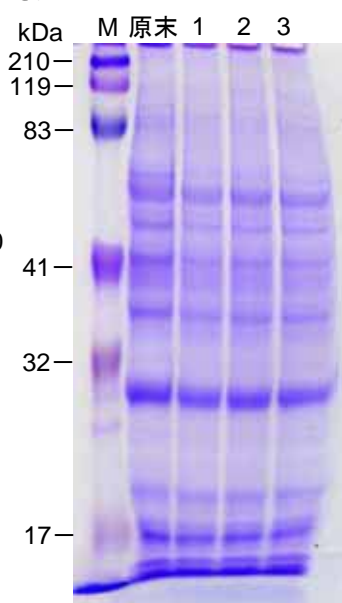
牛乳



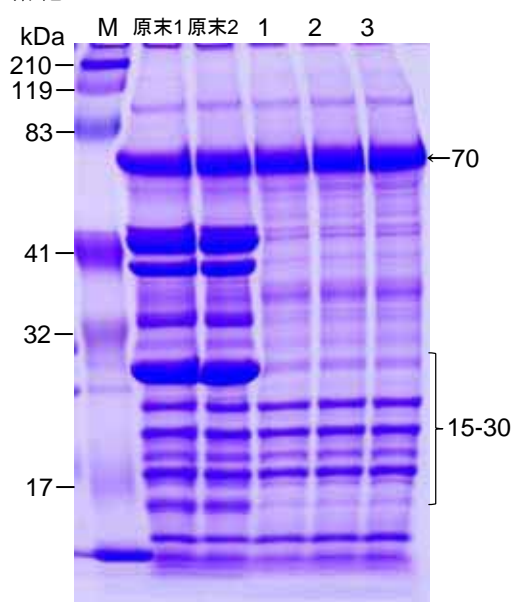
小麦



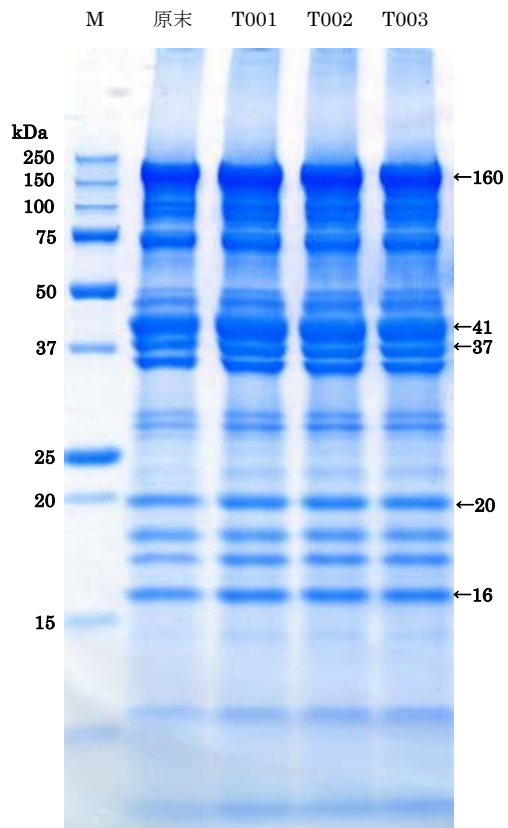
そば



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