

НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ В₁₂ У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

1739-8, Vitamin B12

Каталог. №: 1739-8

Методика від 12-06-2012

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

Чутливість	0.3 нг/мл
Відновлення (насичені зразки)	98 %
Загальний час	80 хвилин

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Кількісний тест DAI В₁₂ заснований на принципі твердофазового імуноферментного аналізу. Антитіло до Вітаміну В₁₂ нанесене на поверхню мікротитраційного планшета. Зразки або стандарти, що містять Вітамін В₁₂, і кон'югат Вітамін В₁₂-пероксидаза додаються в лунки планшета для мікротитрування. Ферментно-мічений і вільний Вітамін В₁₂ конкурують за місця зв'язування. Після однієї години інкубації при кімнатній температурі лунки промиваються розведеним миючим розчином для видалення незв'язаного матеріалу. Додають розчин субстрату і інкубують протягом 20 хвилин, в результаті чого відбувається розвиток синього забарвлення. Розвиток кольору інгібується додаванням стоп-розчину і колір змінюється на жовтий. Жовтий колір вимірюється фотометрично при 405 нм. Концентрація Вітаміну В₁₂ обернено пропорційна інтенсивності кольору зразка.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Повна відповідність наступним принципам належної лабораторної практики (GLP) визначатиме достовірність результатів:

1. Перед початком процедури аналізу доведіть все реагенти до кімнатної температури (20-25 °С).
2. Всі реагенти повинні бути змішані шляхом обережного перевертання або прокручування перед використанням. Не приводити до утворення піни.
3. Після того, як аналіз був запущений, всі наступні кроки мають бути завершені без перерви і в межах рекомендованих термінів.
4. Закрити кришками всі реагенти відразу ж після використання. Не міняйте пробки на флаконах.
5. Використовуйте окремий одноразовий наконечник для кожного зразка, щоб запобігти перехресного забруднення.
6. Всі зразки і стандарти мають бути запущені одночасно, так, щоб всі умови випробувань були однаковими.
7. Не змішуйте компоненти з різних партій.
8. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
9. Перевірте як точність, так і достовірність лабораторного обладнання, що використовується під час процедури (мікропіпетки, ІФА читач і т.д.).

ІНСТРУКЦІЇ З ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ

1. Не паліть, не їжте, не пийте і не піпетуйте ротом в лабораторії.
2. Використовуйте одноразові рукавички при роботі із зразками пацієнтів.
3. Уникайте контакту субстрату і стоп-розчину зі шкірою і слизовою оболонкою (можливе подразнення, опіки або токсична небезпека). У разі контакту, промийте уражену зону з великою кількістю води.
4. Робота та утилізація хімічних продуктів має проводитись відповідно до принципів роботи належної лабораторної практики (GLP).

РЕАГЕНТИ

Набір містить реагенти для 96 визначень. Вони повинні зберігатися при температурі 2-8 °С. Дані експірації знаходяться на етикетках пляшок і зовнішній упаковці.

1. Мікропланшет, що складається з 12 смужок по 8 лунок кожна, покритих анти- Вітамін В₁₂.

2. Стандарти Вітамін В₁₂ (0, 0.4, 1, 4, 10, 40 нг/мл): 6 флаконів 0.5 мл кожен, червоного кольору, готові до використання.
3. Кон'югат (Вітамін В₁₂-Пероксидаза): 6 мл, червоного кольору, готовий до використання.
4. Розчин субстрату (ТМБ): 15 мл; готовий до використання.
5. Стоп розчин (0.5 М Н₂SO₄): 15 мл; готовий до використання.
6. Розчин для розведення зразків (PBS): 2x60 мл, червоного кольору, готовий до використання.
7. Промивний Розчин (PBS + Твін 20): 30 мл, як 10x концентрату, синього кольору. Розвести 1+9 дистильованою водою. Якщо протягом зберігання в холоді утворилися кристали, концентрат необхідно нагріти до 37 °С протягом 15 хвилин.
8. Дві пластикові плівки для покриття смужок під час інкубації.
9. Пластиковий пакет для зберігання невикористаних смужок.
10. Керівництво по експлуатації.

ДОДАТКОВІ ІНСТРУМЕНТИ І РЕАКТИВИ (НЕ ВХОДЯТЬ ДО НАБОРУ)

Вимірювальні прилади

- Мікропіпетки на 10 - 1000 мкл
- Мірна колба
- Ступка, міксер
- Центрифуга
- Планшетний зчитувач (450 нм)

Реагенти

- Potassium hexacyanoferrate (II)-3-гідрат (150 г/л; Carrez I)
- Zincsulfate-7-водний гідрат (300 г/л; Carrez II)
- Двічі дистильована вода
- 1 М розчин каустичної соди
- 1 М соляної кислоти

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Вітамін екстрагується зі зразка двічі дистильованою водою. Після розчинення рівень рН регулюється 1 М розчином Каустичної соди або 1 М Соляною кислотою до 6-7. Потім потенційно мутна речовина осаджується за допомогою Carrez I (150 г/л Potassium hexacyanoferrate (II)-3-гідрат) та Carrez II (300 г/л Zincsulfate-7-водний гідрат). Екстракт заповнюється до певного обсягу і центрифугується. Зразки, які важко розчиняються у холодній воді, можуть бути приведені в стан рідини обережним нагріванням. Після центрифугування зразки додатково розбавляють за допомогою доданого Розчинника зразків. Щоб виключити втручання матричних або рН ефектів, рекомендується мінімальне розбавлення 1:5. Ми рекомендуємо розбавлення до 1-10 нг/мл, з тим щоб отримати оптимальну точність під час вимірювання.

Зернові продукти зазвичай містять низькі концентрації вітаміну В₁₂. Щоб уникнути високих розведень, зразок може бути екстрагований безпосередньо за допомогою Розріджувача зразка замість двічі дистильованої води. Кількість розріджувача зразка в набір не є достатньою в даному випадку. Буфер може, однак, бути замовлений окремо у DAI.

Полівітамінні Таблетки і Капсули

Таблетки і капсули розчиняють у двічі дистильованій воді і значення рН доводять до 6-7. Потім по 0.5 мл кожного з Carrez I і Carrez II додаються, і розчин доводять до необхідного об'єму двічі дистильованою водою. Тверді речовини відокремлюють центрифугуванням, і верхню фазу розбавляють Розчинником для зразків. Для розчинення капсул рекомендується нагрівання до 30-40 °С.

Мультивітамінний та Апельсиновий Соки

Рівень рН соку довести до 6-7, додати 0.5 мл кожного з Carrez I і Carrez II, і розчин довести до необхідного об'єму двічі дистильованою водою. Тверді речовини відокремлюють центрифугуванням, і верхню фазу розбавляють Розчинником для зразків.

Мультивітамінне Варення

Варення гомогенізувати в змішувачі, і приблизно 8 грам екстрагувати двічі-дистильованою водою. Значення рН довести до 6-7 і додати по 0.5 мл кожного з Carrez I і Carrez II. Потім розчин довести до необхідного об'єму двічі дистильованою водою. Тверді речовини відокремлюють центрифугуванням, і верхню фазу розбавляють Розчинником для зразків.

Зернові Продукти (Кукурудзяні пластівці і Мюслі)

3-5 грам зразка гомогенізувати в ступці або міксері і екстрагувати з двічі дистильованою водою. Значення рН довести до 6-7 і додати по 0.5 мл кожного з Carrez I і Carrez II. Потім розчин довести до необхідного об'єму двічі дистильованою водою. Тверді речовини відокремлюють центрифугуванням, і верхню фазу розбавляють

Розчинником для зразків. Зернові продукти зазвичай містять низькі концентрації вітаміну В₁₂. Щоб уникнути високих розведень, зразок може бути екстрагований безпосередньо за допомогою Розриджувача зразка замість двічі дистильованої води.

Полівітамінні Солодощі

Солодощі розчиняють обережним нагріванням (при необхідності) в двічі дистильованій воді. Значення рН доводять до 6-7, і додають по 0.5 мл кожного з Carrez I і Carrez II. Потім розчин довести до необхідного об'єму двічі дистильованою водою. Тверді речовини відокремлюють центрифугуванням, і верхню фазу розбавляють Розчинником для зразків.

ПРОЦЕДУРА

1. Підготувати зразки, як описано вище.
2. Внести 50 мкл стандартів або підготовлених зразків в двох примірниках у відповідні лунки планшета. Відразу додати 50 мкл кон'югату Вітамін В₁₂-пероксидаза в кожну лунку.
3. Накрити планшет з пластиковою плівкою і інкубувати протягом 60 хвилин при кімнатній температурі на шейкері (або 90 хвилин без шейкера).
4. Промити пластини три рази таким чином: Піпетувати 300 мкл розведеного миючого розчину в кожну лунку. Видалити вміст лунок, перевернувши планшет і постукати ним по паперовому рушнику. Повторіть описану вище процедуру три рази. Процедура промивання є критичною. Недостатня промивка призводить до низької точності і завищеним значенням абсорбції.
5. Внести 100 мкл розчину субстрату в кожну лунку.
6. Залишити в темряві (наприклад, шафа або ящик; хромоген є світлочутливим) протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
7. Зупинити ферментативну реакцію додаванням 100 мкл стоп-розчину (0.5M H₂SO₄) у кожну лунку. Синій колір змінюється на жовтий при додаванні.
8. Після ретельного перемішування виміряти поглинання при 450 нм (референтна довжина хвилі 620 нм), використовуючи ІФ-рідер. Забарвлення залишається стабільним протягом 30 хвилин.

ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Розрахувати середнє значення оптичної щільності (OD 450 нм) для кожного набору стандартів або зразків.
2. Побудувати стандартну криву, відкладаючи середню оптичну щільність, отриману для кожного стандарту, проти його концентрації в нг/мл на напівлогарифмічному міліметровому папері з оптичною щільністю на вертикальній (Y) вісі і концентрацією на горизонтальній (X) вісі.
3. Використовуючи середнє значення оптичної щільності для кожного зразка, визначити відповідну концентрацію Вітаміну В₁₂ в нг/мл за стандартною кривою. Залежно від досвіду і/або можливостей комп'ютера, можуть бути використані інші методи обробки даних.
4. Розведені зразки повинні бути надалі перетворені з використанням відповідного коефіцієнта розведення. Коефіцієнт залежить від процедури підготовки зразків, яка використовується.

ТИПОВІ СТАНДАРТНІ ЗНАЧЕННЯ

У наступній таблиці наведено приклад для типової калібрувальної кривої. Зв'язування розраховують як відсоток поглинання стандарту 0 нг/мл. Ці значення є лише прикладом і не повинні використовуватись замість стандартної кривої, яка повинна бути виміряна в кожному новому випробуванні.

Вітамін В ₁₂ (нг/мл)	(% зв'язування 0 нг/мл)
0	100
0.4	86
1.0	70
4.0	24
10	10
40	4

РОБОТА АНАЛІЗУ

Чутливість

Чутливість DAI Вітамін В₁₂ ELISA складає 0.3 нг/мл (на основі стандартної кривої).

Відновлення

Відновлення насичених зразків складає 98%.

Внутрішньосерійна Точність

Внутрішньосерійна Точність складає 3%.

Перехресна реактивність по відношенню до вітаміну В₁₂ (= 100%)

Hydroxycobalamine 29%



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com