

НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГІСТАМІНУ У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

5133-8, Histamine

Каталог. №: 5133-8

Методика від 02-04-2013

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	2 нг/мл
Відновлення (вино, риба, сир)	90 %
Час інкубації	80 хв.

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

(Див. в оригіналі інструкції).

ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Кількісний ІФА для визначення гістаміну заснований на принципі твердофазного імуноферментного аналізу. Кон'югат гістаміну зв'язаний з поверхнею мікротитраційного планшета. Зразки або стандарти, що містять отриманий гістамін та антитіла проти гістаміну, вносяться у лунки планшета. Імобілізований та вільний гістамін конкурує за зони зв'язування антитіл.

Після 30 хвилин інкубації при кімнатній температурі лунки промивають розведеним промивним розчином для видалення незв'язаного матеріалу. Кон'югат пероксидази, направлений проти антитіл гістаміну, вноситься в лунки і після 30 хвилин інкубації планшет знову промивають. Потім додають розчин субстрату і інкубують протягом 20 хвилин, що веде до утворення розчину синього кольору. Розвиток кольору припиняється додаванням стоп-розчину, а колір змінюється на жовтий. Жовтий колір вимірюється фотометрично при 450 нм. Концентрація гістаміну прямо 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 було почато, 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-зчитувач і т.д.).

ІНСТРУКЦІЇ З ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ

1. Не паліть, не їжте, не пийте і розкапуйте в лабораторії відповідними засобами.
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).
5. Реакційний розчин містить 1,4-бензохинону. При контакті зі шкірою уражена зона повинна бути промита великою кількістю води.

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 кон'югатом гістаміну.
2. Стандарти гістаміну (0, 2, 4, 10, 40 100 нг/мл): 6 флаконів 4,0 мл кожен. Перед застосуванням в дослідженні стандарти повинні бути дериватизовані (див. розділ Підготовка реагентів).
3. Реакційний розчин: 3 мл, готовий до використання.
4. Нейтралізаційний розчин: 15 мл, готовий до використання.
5. Антигістамінне антитіло (мишине): 6 мл, зафарбоване у червоний колір, готове до використання.
6. Кон'югат (анти-мишиний-IgG-пероксидаза): 15 мл, червоного кольору, готовий до використання.
7. Розчин субстрату (ТМБ): 15 мл, зафарбований у червоний колір готовий до використання.
8. Стоп-розчин (0,5 М H₂SO₄): 15 мл; готовий до використання.
9. Розчин для розведення зразків (Tris): 60 мл, готовий до використання.
10. Промивний розчин (PBS + Твін 20): 60 мл, як 10x концентрату, зафарбований синім кольором. Розвести 1+9 дистильованою водою. Якщо протягом зберігання в холоді утворилися кристали, концентрат необхідно нагріти до 37 °С протягом 15 хвилин.
11. Дві пластикові плівки для накривання стріпів під час інкубації.
12. Пластиковий пакет для зберігання невикористаних смужок.
13. Керівництво по експлуатації.

ДОДАТКОВІ ІНСТРУМЕНТИ І РЕАКТИВИ (не входять до набору)

Інструментарій

- Мікропіпетки на 25, 50, 100 та 500 мкл
- Планшетний шейкер
- Планшетний зчитувач (405 нм)
- Міксер
- Центрифуга

Реагенти

- 0,1 соляна кислота (HCl).

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Вино

- 500 мкл вина змішують з 500 мкл розріджувача зразка (1:2).
- 500 мкл реакційного розчину розкапуються в цей розведений зразок вина, який перемішується належним чином і інкубується протягом 20 хв при кімнатній температурі в темному місці.
- 200 мкл нейтралізаційного розчину вноситься до зразка, змішуються належним чином, і інкубуються протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Зразок тепер може бути внесений для дослідження.

Сир і риба

- 10 г сиру або риби гомогенізують з 50 мл 0,1 М HCl в змішувачі протягом 5 хвилин.
- Гомогенний зразок далі центрифугують протягом 10 хвилин при 3000 g. Три фази формують: верхній твердий шар жиру, середній мутний водянистий шар і осад на дні.
- 500 мкл мутного водянистого шару видаляють. Дотримуватись обережності щоб частинки жиру з верхнього твердого шару не розкапались. Якщо це відбудеться, то жир обов'язково повинен бути знятий і видалений. Отримані 500 мкл зразка змішують з 500 мкл розріджувача зразка (1:2).
- До цього розведеного зразка сиру або риби розкапується 50 мкл реакційного розчину, ретельно перемішують і інкубують протягом 20 хвилин при кімнатній температурі в темряві.
- 200 мкл нейтралізуючого розчину розкапують у зразок, змішують належним чином, і інкубують протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Зразок тепер може бути внесений для дослідження.

Примітка: по-різному високі концентрації гістаміну в різних зразках харчових продуктів можуть вимагати подальшого розбавлення зразків 1:10 або 1:100 розріджувачем зразка.

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Перед застосуванням в дослідженні стандарти повинні бути дериватизовані таким чином:

- До 500 мкл кожного стандартного розчину розкапується 25 мкл реакційного розчину, ретельно перемішують і інкубують протягом 20 хвилин при кімнатній температурі в темному місці.
- 100 мкл нейтралізуючого розчину розкапуються у відповідні стандарти, ретельно перемішують і інкубують протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Стандарти тепер можуть бути безпосередньо додані до дослідження.

ПРОЦЕДУРА

1. Підготувати зразки, як описано вище.
2. Внести 100 мкл дериватизованих стандартів або підготовлених зразків в дублях у відповідні лунки планшету. негайно додати 50 мкл антитіл гістаміну в кожну лунку.
3. Накрити планшет поліетиленовою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі на планшет-шейкері (або 45 хв. без шейкера).
4. Промити планшет три рази таким чином: Видалити вміст лунок (витрусити або аспірувати). Піпетувати 300 мкл розведеного промивного 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 кон'югату в кожну лунку.
6. Накрити планшет поліетиленовою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі на планшет-шейкері (або 45 хв. без шейкера).
7. Промити планшет як вказано в п. 4.
8. Внести 100 мкл розчину субстрату в кожну лунку.
9. Залишити в темряві (наприклад, шафа або ящик; хромоген є світлочутливим) протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
10. Зупинити ферментативну реакцію додаванням 100 мкл стоп-розчину (0,5 М H₂SO₄) у кожну лунку. Синій колір зміниться на жовтий при додаванні.
11. Після ретельного перемішування виміряти поглинання при 450 нм (референтна довжина хвилі 620 нм), використовуючи ІФА-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 гістаміну 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 для вина складає 2, 10 для сиру та риби відповідно до процедури підготовки зразків, як описано вище.

ТИПОВІ ЗНАЧЕННЯ СТАНДАРТІВ

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

Гістамін (нг/мл)	(% зв'язування 0 нг/мл)
0	100
2	90
4	84
10	51
40	15
100	7

ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чутливість

Чутливість даного набору ІФА гістаміну становить 2 нг/мл (на основі стандартної кривої).

Відтворюваність

Відтворюваність насичених зразків була визначена на рівні 90% для зразків вина, риби або сиру.

Точність

Точність між аналізами 5%

Перехресна реактивність до гістаміну = 100%

N-ацетилгістамін	6%
1-метилгістамін	0.05%
Гістидин	0%
Серотонін	0%



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