

**НАБІР ІФА**  
**ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ**  
**БІОТИНУ (ВІТАМІН Н) У ХАРЧОВИХ**  
**ПРОДУКТАХ**

**1741-8, Vitamin H (Biotin)**

Каталог. №: 1741-8

Методика від 10-21-2010

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



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

<b>Чутливість</b>	<b>0.5 нг/мл</b>
<b>Відновлення (насичені зразки)</b>	<b>98 %</b>
<b>Загальний час</b>	<b>90 хвилин</b>

**ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ**

Біотин (вітамін Н) служить в якості простетичної групи ферментів, які каталізують карбоксилювання в організмі. Для цього біотин пов'язаний через свою карбоксильну групу з карбоксилазними залишками лізину, і передача вуглекислого газу відбувається після приєднання до атому азоту біотину, утворюючи так званий активний діоксид вуглецю.

Інформованість населення для хороших стан здоров'я і його інтерес до здорового харчування значно зросла в останні роки. Після того, як вміст вітамінів в харчуванні набув значення для споживача, продукти харчування частково були вітамінізовані виробником.

Коли існує брак біотину, себорея, дерматит, анорексія, болі в м'язах, втома і нервові розлади можуть з'явитися. Так як біотин синтезується кишковою флорою людини, симптоми дефіциту є рідкісними, і з'являються вони після надмірного вживання сирого яєчного білка, що можна пояснити вмістом у ньому біотин-зв'язуючого авідину.

**ПРИНЦИП ТЕСТУ**

**Кількісний тест DAI Біотин (Вітамін Н)** заснований на принципі твердофазного імуноферментного аналізу. Авідин, який показує високу спорідненість до біотину, нанесений на поверхні планшета для мікротитування. Зразки або стандарти, що містять Біотин, і кон'югат біотин-лужна фосфатаза додаються в лунки планшета для мікротитування. Ферментно-мічений і вільний Біотин конкурують за місце 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 30 хвилин, в результаті чого відбувається розвиток жовтого забарвлення. Розвиток кольору інгібується додаванням стоп-розчину. Жовтий колір вимірюється фотометрично при 405 нм. Концентрація біотину 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 мийте 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 авідином.
2. Стандарти Біотину (0, 1, 2.5, 5, 10, 25 нг/мл): 6 флаконів 0.5 мл кожен, готові до використання. При зберіганні в холодильнику, кристали можуть випадати в осад, який можна повторно розчинити на протязі 15 хвилин інкубації на водяній бані до 37 °С.
3. Кон'югат (Біотин-Лужна фосфатаза): 15 мл, містить 0.1 % азиду натрію, червоного кольору, готові до використання.
4. Розчин субстрату (PNPP): 15 мл; готовий до використання.
5. Стоп розчин (1 М NaOH): 15 мл; готовий до використання.
6. Стандарт/Розчин для розведення зразків (PBS): 2x50 мл, містить 0.1 % азиду натрію, готовий до використання. При зберіганні в холодильнику, кристали можуть випадати в осад, який можна повторно розчинити на протязі 15 хвилин інкубації на водяній бані до 37 °С.
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 50, 100 і 1000 мкл
- Мірна колба
- Ступка, міксер
- Центрифуга
- Планшетний зчитувач (405 нм)

**Реагенти**

- Potassiumhexacyanoferrate (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 витягується 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. Приготовлені розчини повинні бути розведені таким чином, щоб концентрації знаходились в межах лінійного діапазону калібрувальної кривої.

**Полівітамінні Таблетки і Капсули**

2 грами подрібнених таблеток або капсул розчиняють у 50 мл двічі дистильованої води і значення рН доводять до 6-7. Потім по 0.5 мл кожного з Carrez I і Carrez II додаються, і розчин доводять до 100 мл двічі дистильованою водою. Тверді речовини відокремлюють центрифугуванням, і 100 мкл верхньої фази розбавляють 900 мкл Розчинника для зразків (загальний коефіцієнт розбавлення 500) і використовують в тесті. Для розчинення капсул рекомендується нагрівання до 30-40 °С.

**Мультивітамінний та Апельсиновий Соки**

10 мл соку розбавляють в хімічному стакані з 20 мл двічі дистильованої води і доводять рН до 6-7. Додати 0.5 мл кожного з Carrez I і Carrez II, і розчин довести до 50 мл двічі дистильованою

водою. Тверді речовини відокремити центрифугуванням, і 100 мкл верхньої фази розбавити 900 мкл Розчинника для зразків (загальний коефіцієнт розбавлення 50) і використовувати в тесті.

#### Мультивітамінне Варення

5 грамів варення помістити в мензурку і гомогенізувати з 30 мл двічі дистильованої води в змішувачі. Значення рН довести до 6-7 і додати по 0.5 мл кожного з Sagez I і Sagez II. Потім розчин довести до об'єму 50 мл з двічі дистильованою водою. Відокремити тверду речовину центрифугуванням, і розбавити 100 мкл верхньої фази з 900 мкл Розчинника для зразків (загальний коефіцієнт розбавлення 100) і використовувати в тесті.

#### Зернові Продукти (Кукурудзяні пластівці і Мюслі)

5 грам зразка гомогенізувати в ступці або міксері і екстрагувати з 50 мл двічі дистильованої води. Після центрифугування 20 мл надосадової рідини довести до рН 6-7, і додати по 0.5 мл кожного з Sagez I і Sagez II. Після цього розчин довести до 25 мл двічі дистильованою водою. Відокремити тверду речовину центрифугуванням, і розбавити 100 мкл верхньої фази з 900 мкл Розчинника для зразків (загальний коефіцієнт розбавлення 100) і використовувати в тесті.

#### Полівітамінні Солодощі

2 грами подрібнених солодощів розчиняють обережним нагріванням (при необхідності) в 50 мл двічі дистильованої води. Значення рН доводять до 6-7, і додають по 0.5 мл кожного з Sagez I і Sagez II. Після цього розчин доводять до 100 мл з двічі дистильованою водою. Тверду речовину відокремлюють центрифугуванням, і 50 мкл верхньої фази розбавляють з 950 мкл Розчинника для зразків (загальний коефіцієнт розбавлення 1000) і використовують в тесті.

#### Ізотонічний порошок

2 грами ізотонічного порошку розчиняють в 50 мл двічі дистильованої води. Значення рН доводять до 6-7, і додають по 0.5 мл кожного з Sagez I і Sagez II. Після цього розчин доводять до 100 мл з двічі дистильованою водою. Тверду речовину відокремлюють центрифугуванням, і 100 мкл верхньої фази розбавляють з 900 мкл Розчинника для зразків (загальний коефіцієнт розбавлення 500) і використовують в тесті.

#### ПРОЦЕДУРА

1. Підготувати зразки, як описано вище.
2. Внести 50 мкл стандартів або підготовлених зразків в двох примірниках у відповідні лунки планшета. Відразу додати 100 мкл кон'югату біотин-АР 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 30 хвилин при кімнатній температурі.
7. Зупинити ферментативну реакцію додаванням 100 мкл стоп-розчину (1M NaOH) у кожну лунку. Жовтий колір темніє при додаванні.
8. Після ретельного перемішування виміряти поглинання при 405 нм (референтна довжина хвилі 620 нм), використовуючи ІФ-рідер. Забарвлення залишається стабільним протягом 30 хвилин.

#### ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Розрахувати середнє значення оптичної щільності (OD 405 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 Біотину (Вітамін Н) 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.

Біотин (нг/мл)	(% зв'язування 0 нг/мл)
0	100
1.0	91
2.5	77
5.0	38
10	12
25	4

#### РОБОТА АНАЛІЗУ

##### Чутливість

Чутливість DA1 Біотин (Вітамін Н) ELISA складає 0.5 нг/мл (на основі стандартної кривої).

##### Відновлення

Відновлення насичених зразків складає 98%.

##### Внутрішньосерійна Точність

Внутрішньосерійна Точність складає 3%.



#### 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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)