

НАБІР ІФА
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
БЕТА-ЛАКТОГЛОБУЛІНУ В ХАРЧОВИХ
ПРОДУКТАХ

5136-8, β -Lactoglobulin ELISA

Каталог. №: 5136-8

Методика від 01-07-2013

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.

Кількість тестів	96 тестів
Тест	β -Lactoglobulin ELISA
Метод	Імуносорбентний аналіз ІФА
Принцип	Кількісний
Зразок	5 г
Загальний час	~ 60 хвилин
Чутливість	1.5 ppb (мільярдна доля)
Термін придатності	12-18 місяців

ПРИЗНАЧЕННЯ

DAI Бета-лактоглобулін ІФА являє собою високочутливу систему виявлення та особливо здатний до ідентифікації і кількісної оцінки залишків коров'ячого молока в печиві, крупах, ковбасних виробках, апельсиновому соці, вині, соєвих продуктах і шоколаді.

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Коров'яче молоко відноситься до найбільш важливих алергенних харчових інгредієнтів, особливо для дітей. Навіть дуже низькі кількості коров'ячого молока можуть викликати алергічні реакції, які можуть призвести до анафілактичного шоку у важких випадках. Через це, алергічні до молока особи повинні строго уникати споживання молока або їжі, що містить молоко. Зокрема, присутність прихованих молочних білків, наприклад, в ковбасних виробках, печиві, напівфабрикатах або напоях, представляють критичну проблему для молочних алергіків. Відповідно до директиви ЄС 2003/89/EG додавання коров'ячого молока підлягає обов'язковому маркуванню. Для виявлення коров'ячого молока в харчових продуктах необхідні чутливі системи виявлення. Приблизно 20% білків коров'ячого молока є білками молочної сироватки. Основна фракція сироваткових білків складається з термостабільного алергену β -Lactoglobulin.

ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Кількісний DAI β -Lactoglobulin ІФА для визначення β -Lactoglobulin заснований на принципі твердофазного імуноферментного аналізу. Антитіло, направлене проти β -Lactoglobulin, зв'язане з поверхнею мікротитраційного планшета. Зразки або стандарти, що містять β -Lactoglobulin, вносяться у лунки планшета. Після 20 хвилин інкубації при кімнатній температурі лунки промивають розведеним промивним розчином для видалення незв'язаного матеріалу. Кон'юговане з пероксидазою друге антитіло, спрямоване проти β -Lactoglobulin, вноситься в лунки і після 20 хвилин інкубації планшет знову промивають. 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 β -Lactoglobulin прямо пропорційна інтенсивності кольору зразка.

МАТЕРІАЛИ І КОМПОНЕНТИ

Матеріали, що постачаються в наборі

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

1. **Мікропланшет**, що складається з 12 смужок по 8 лунок кожна, покритих антитілами анти- β -Lactoglobulin.
2. **Стандарти β -Lactoglobulin**: (0, 10, 40, 100, 400 ppb β -Lactoglobulin) 5 флаконів 1.0 мл кожен, готові до використання. Зафарбовані червоним.
3. **Кон'югат (анти- β -Lactoglobulin-пероксидаза)**: 15 мл, червоного кольору, готовий до використання.
4. **Розчин субстрату (ТМБ)**: 15 мл; готовий до використання.

5. **Стоп розчин (0.5 M H₂SO₄)**: 15 мл; готовий до використання.
6. **Буфер для екстракції/розведення зразків (Tris)**: 2x120 мл 10x концентрат, червоного кольору. Розвести 1+9 з дистильованою водою. Зберігаючи при температурі 4 °C, розведений буфер стабільний принаймні 1 тиждень. При зберіганні в холодильнику, кристали можуть випадати в осад, який можна повторно розчинити нагріваючи протягом 15 хвилин до 37 °C.
7. **Промивний розчин (PBS + Твін 20)**: 60 мл, як 10x концентрату. Розвести 1+9 дистильованою водою. Зберігаючи при температурі 4 °C, розведений буфер стабільний принаймні 4 тижні. Якщо протягом зберігання в холоді утворилися кристали, концентрат необхідно нагріти до 37 °C протягом 15 хвилин.
8. Пластиковий пакет для зберігання невикористаних смужок.
9. Керівництво по експлуатації.

Додаткові інструменти і реактиви (не входять до набору)

- Мікропіпетки на 100 - 1000 мкл
- Мірна колба
- Лабораторна вага
- Ступка, міксер
- Водяна баня
- Центрифуга
- Планшетний зчитувач (450 нм)

Реагенти

- Двічі дистильована вода

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

У зв'язку з високим ризиком перехресного забруднення всі застосовувані інструменти, такі як аплікатор, ступка, скляні пробірки і т.д. повинні бути **ретельно очищені** до і після кожного зразка. Білки гірчиці дуже сильно пристають до різних поверхонь. Щоб визначити можливе перехресне забруднення, викликане попередніми екстракціями, наполегливо рекомендується звернути увагу на послідовність екстракції.

Слід застосовувати наступну підготовку проб для твердих зразків:

1. Щоб максимізувати однорідність і репрезентативність зразка, мінімум 5 г зразка слід максимально подрібнити в ступці, ударному млинку і т.д.
2. Один грам однорідної суміші суспендується в 20 мл **попередньо розведеного буферу** для екстракції. Потім суспензію інкубують протягом 15 хвилин у попередньо нагрітій водянній бані при 60 °C. Для забезпечення хорошої однорідності, зразки слід струшувати кожні дві хвилини.
3. Зразки центрифугують протягом 10 хвилин при 2000 г. Якщо неможливо відокремити супернатант від осаду повністю, суспензію слід фільтрувати, якщо необхідно.
4. 100 мкл розчину без частинок вносять в кожну лунку. Якщо результати проби знаходяться поза діапазоном вимірювань, необхідно провести подальше розведення з **попередньо розведеним** буфером для екстракції та розведення зразка. Додаткове розведення необхідно враховувати при розрахунку концентрації.

Слід застосовувати наступну підготовку проб для рідких зразків:

1 мл рідкого зразка розвести в 19 мл **попередньо розведеного** буферу для екстракції. Потім суспензію інкубувати протягом 15 хвилин у попередньо нагрітій водянній бані при 60 °C. Щоб забезпечити однорідність, зразки слід струшувати кожні дві хвилини. Процес продовжити від пункту 3 в процедурі для твердих зразків.

ПРОЦЕДУРА

Промивний розчин поставляється у вигляді 10-кратного концентрату і повинен бути **розведений** 1+9 з двічі дистильованою водою перед використанням.

У кожному разі надані **готові до використання** стандарти повинні визначатись подвійно. Коли зразки визначаються у великих кількостях, стандарти повинні піпетуватись один раз до додавання зразків і один раз після додавання зразків. Для остаточної інтерпретації використовується середнє арифметичне для розрахунку.

За рекомендацією GLP та вимог контролю якості зразки слід вимірювати в дублях.

Процедура проводиться за наступною схемою:

1. Підготувати зразки, як описано вище.
2. Внести 100 мкл **готових до використання** стандартів або підготовлених зразків в дублях у відповідні лунки планшета.
3. Інкубувати протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
4. Промити пластини три рази таким чином: Видалити вміст лунок (витрусити або аспірувати). 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.

- Внести 100 мкл кон'югату в кожну лунку.
- Інкубувати протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Промити планшет як вказано в п. 4.
- Внести 100 мкл розчину субстрату в кожну лунку.
- Залишити в темряві (наприклад, шафа або ящик; хромоген є світлочутливим) протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупинити ферментативну реакцію додаванням 100 мкл стоп-розчину (0,5 M H₂SO₄) у кожну лунку. Синій колір зміниться на жовтий при додаванні.
- Після ретельного перемішування виміряти поглинання при 450 нм (референтна довжина хвилі 620 нм), використовуючи ІФА-рідер. Забарвлення залишається стабільним протягом 30 хвилин.

РЕЗУЛЬТАТИ

Підрахунок результатів

Готові до використання стандарти розробляються для прямого визначення концентрацій зразків. Розбавлення зразків у процесі екстракції, як описано у зазначеній вище процедурі підготовки зразка, вже враховані. Додаткове розбавлення через високу концентрацію зразка повинно бути враховано.

- Розрахувати середнє значення оптичної щільності (OD 450 нм) для кожного набору стандартів або зразків.
- Побудувати стандартну криву, відкладаючи середню оптичну щільність, отриману для кожного стандарту, проти його концентрації в ppb на напівлогарифмічному міліметровому папері з оптичною щільністю на вертикальній (Y) вісі і концентрацією на горизонтальній (X) вісі.
- Використовуючи середнє значення оптичної щільності для кожного зразка, визначити відповідну концентрацію β -Lactoglobulin в ppb за стандартною кривою. Залежно від досвіду і/або можливостей комп'ютера, можуть бути використані інші методи обробки даних.

Типові значення стандартів

У наступній таблиці наведено приклад для типової калібрувальної кривої. Зв'язування розраховують як відсоток поглинання стандарту 400 ppb. Ці значення є лише прикладом і не повинні використовуватись замість стандартної кривої, яка повинна бути виміряна в кожному новому випробуванні.

β -Lactoglobulin (ppb)	(% зв'язування 400 ppb)
400	100
100	61
40	36
10	15
0	5

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чутливість

Межа виявлення даного тесту становить 1.5 ppb.

Межа кількісного визначення становить 10 ppb.

Оціночні експерименти з молоком (молочними продуктами) показали, що це відповідає приблизно 0.6 ppb незбираного молока, 0.1 ppb порошок обезжиреного молока (NIST RM1549) і 0.5 ppb сухого незбираного молока (NIST RM8435).

У зв'язку з різноманітністю вибірових матриць та їхнього впливу на бланк, результати зі значеннями, менше LOQ, повинні розглядатися як негативні.

Перехресна реактивність

Для наступних продуктів перехресної реактивності не було виявлено:

Яйце	Горіх Кеш'ю	Лецитин
Пшениця	Арахіс	Сахароза
Овес	Фундук	Какао
Жито	Волоський горіх	Апельсин
Ячмінь	Горіх Пекан	Вино
Рис	Бразильський горіх	Персик
Кукурудза	Кокос	Абрикос
Гречка	Мигдаль	Вишня
Соя	Фісташки	Слива
Макові зерна	Горіх Макадамський	Яловичина
Сезам	Каштан	Свинина
Соняшникові зерна	Турецький горіх	Курятина
Насіння гарбуза	Горіх	Бичачий альбумін
Кедровий горіх	Квасоля	

Були виявлені наступні перехресні реакції:

Реагент	Перехресна реактивність, %
Овече молоко	< 0.2 %
Козяче молоко	< 0.002 %
Казеїн	< 0.02 %

Точність

Точність в аналізі	7 %
Точність між аналізами	9-12 %

Лінійність

Серійне розбавлення насичених зразків (печиво, крупи, шоколад, ковбаса, соєве молоко, апельсиновий сік і біле вино) призвело до лінійності розбавлення 72% - 127%.

Відновлення

Середнє відновлення визначалось насиченням зразків різними кількостями β -Lactoglobulin:

Печиво	88 %
Крупи	94 %
Шоколад	86 %
Ковбаса	107 %
Соєве молоко	70 %
Апельсиновий сік	98 %
Біле вино	82 %

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

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

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

ІНСТРУКЦІЇ З ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ

- Не паліть, не їжте, не пийте і розкапуйте в лабораторії відповідними засобами.
- Використовуйте одноразові рукавички при роботі із зразками пацієнтів.
- 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.
- Робота та утилізація хімічних продуктів має проводитись відповідно до принципів роботи належної лабораторної практики (GLP).



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