

НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЯЄЧНОГО БІЛКА У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

5138-8, Egg White ELISA

Каталог. №: 5138-8

Методика від 05-29-2013

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 співпадатим.

Кількість тестів	96 тестів
Тест	Egg White ELISA
Метод	Імуносорбентний аналіз ІФА
Принцип	Кількісний
Зразок	5 г
Загальний час	~ 60 хвилин
Чутливість	0.05 ppm (мільйонна доля)
Термін придатності	12-18 місяців

ПРИЗНАЧЕННЯ

DAI Egg White ІФА являє собою високочутливу систему для виявлення яєчного білка на основі овомукоїда і особливо здатна кількісно визначити залишки яєчного білка в макаронних виробках, хлібобулочних виробках, ковбасних виробках і шоколаді.

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

DAI Hen's Egg (Gallus gallus) дуже багатий білками і являє собою важливе джерело їжі для людини. У той час як білки яєчного жовтка мають тільки незначну алергенність, протеїни яєчного білка, як відомо, є алергенними. На додаток до овальбуміну, овотрансферину, лізоциму та ліветину, овомукоїд являє собою найбільш важливий алерген. На відміну від інших алергенів, Овомукоїд є термостійким і може витримувати такі процеси приготування, як випічка. Для осіб, які страждають алергією, споживання яєчного білка представляє собою критичну проблему. Навіть дуже низькі кількості алергену можуть викликати алергічні реакції, які можуть призвести до анафілактичного шоку у важких випадках. Тому, особам, які мають алергію на яйце, необхідно уникати споживання яєць або їжі, яка містить яйця. Продукти, які не містять інформації про додавання яйця в їжу, є небезпечними для людей, які страждають алергією. Перехресне забруднення, яке відбувається в основному в результаті виробничого процесу, часто є помітним. Процес виробництва шоколаду є типовим прикладом. Для виявлення залишків білкових яєчних протеїнів необхідні чутливі системи виявлення.

ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Кількісний DAI Egg White ІФА для визначення яєчного білка заснований на принципі твердофазного імуноферментного аналізу. Антитіло, направлене проти *ovomucoid*, зв'язане з поверхнею мікрититраційного планшета. Зразки або стандарти, що містять яєчний білок (*ovomucoid*), 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 *ovomucoid*, 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 яєчного білка 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 °С. Дані експірації знаходяться на етикетках флашок і зовнішній упаковці.

1. **Мікропланшет**, що складається з 12 смужок по 8 лунок кожна, покритих антитілами анти-*ovomucoid*.
2. **Стандарти протеїнів яєчного білка** (0, 0.4, 1, 4, 10 ppm): 5 флаконів 1.0 мл кожен, готові до використання. Зафарбовані червоним.

3. **Кон'югат (анти-*ovomucoid*-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. Зберігати при температурі 4 °С, 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 °С.
7. **Промивний розчин (PBS + Твін 20)**: 60 мл, як 10x концентрату. Розвести 1+9 дистильованою водою. Зберігати при температурі 4 °С, розведений буфер стабільний принаймні 4 тижні. Якщо протягом зберігання в холоді утворилися кристали, концентрат необхідно нагріти до 37 °С протягом 15 хвилин.
8. Пластиковий пакет для зберігання невикористаних смужок.
9. Керівництво по експлуатації.

Додаткові інструменти і реагенти (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 гірчичі дуже сильно пристають до різних поверхонь. Щоб визначити можливе перехресне забруднення, викликане попередніми екстракціями, наполегливо рекомендується звернути увагу на послідовність екстракції.

1. Слід застосовувати наступну підготовку проб для всіх видів зразків:
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 водній бані при 60 °С. Для забезпечення хорошої однорідності, зразки слід струшувати кожні дві хвилини.
3. Зразки центрифугують протягом 10 хвилин при 2000 g. Якщо неможливо відокремити супернатант від осаду повністю, суспензію слід фільтрувати, якщо необхідно.
4. 100 мкл розчину без частинок вносять в кожен 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.

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 зразків і один раз після 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 міючого розчину в кожен лунку. Видалити вміст лунок, повернувши 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 кожен 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 ррм 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 Яєчного білка в ррм 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 10 ррм. Ці значення є лише прикладом і не повинні використовуватись замість стандартної кривої, яка повинна бути виміряна в кожному новому випробуванні.

Протеїн яєчного жовтка (ppm)	(% зв'язування 10 ppm)
10	100
4	74
1	34
0.4	17
0	3

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чутливість

Межа виявлення даного тесту становить 0.05 ррм.

Межа кількісного визначення становить 0.4 ррм.

У зв'язку з різноманітністю матриць зразків та їхнім впливом на бланк, результати менше межі кількісного визначення повинні розглядатися як негативні.

Перехресна реактивність

Для наступних продуктів перехресної реактивності не було виявлено:

Молоко коров'яче	Мак	Каштан
Молоко вівці	Кунжут	Австралійський горіх
Пшениця	Кедровий горіх	Лецитин
Жито	Кешью	Персик
Овес	Арахіс	Слива
Ячмінь	Фундук	Абрикос
Рис	Пекан	Вишня
Кукурудза	Бразильський горіх	Какао
Гречана крупа	Кокос	Яловичина
Соя	Волоський горіх	Свинина
Насіння соняшнику	Фісташки	Цукор
Риб'ячий желатин	Риб'ячий клей	

Були виявлені наступні перехресні реакції:

Реагент	Перехресна реактивність, %
Овальбумін	0,25
Овомукоїд	614
Conalbumin	2,6
Лізоцим	< 0,0003
Куряче м'ясо	< 0,001

Точність

Точність в аналізі	4-9 %
Точність між аналізами	3-7 %
Точність між лотами	5-11 %

Лінійність

Серійне розбавлення насичених зразків (макаронні вироби, печиво, торти, ковбаси і шоколад) призвело до лінійності розбавлення 93% - 112%.

Відновлення

Середнє відновлення визначалося насиченням зразків різними кількостями протеїну Яєчного білка:

Макаронні вироби	91%
Торти	83%
Печиво	85%
Ковбаси	98%
Чорний шоколад	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 окремі 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