

# НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮТЕНУ/ГЛІАДИНУ У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

## 5139-8, Gluten/Gliadin

Каталог. №: 5139-8

Методика від 04-12-2012

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 співпадатим.

Чутливість	0,3 ppm
Метод	кількісний ІФА
Час інкубації	60 хв.

### ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

(Див. в оригіналі інструкції).

### ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Кількісний ІФА для визначення глютену/гліадину заснований на принципі твердофазного імуноферментного аналізу. Антитіло, направлене проти гліадину – розчинної фракції глютену - зв'язане з поверхнею мікротитраційного планшета. Пов'язані з гліадином зразки або стандарти 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 гліадину, 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 гліадину прямо пропорційна інтенсивності кольору зразка. Через рівні кількості гліадин і глютену в пшеничній клейковині, концентрація клейковини зразка обчислюється шляхом множення на коефіцієнт 2.

### 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.).

### ІНСТРУКЦІ 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).

### 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 гліадином.
2. Стандарти гліадину (0, 2, 6, 20, 60 ppm): 5 флаконів 1,0 мл кожен, готові до використання. Зафарбовані червоним.
3. Кон'югат (анти-гліадин-пероксидаза): 15 мл, червоного кольору, готові до використання.
4. Розчин субстрату (ТМБ): 15 мл; готовий до використання.
5. Стоп розчин (0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): 15 мл; готовий до використання.
6. Буфер для розведення зразків (Tris): 2x120 10x концентрат, червоного кольору, готовий до використання. Зберігаючи 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. Зберігаючи при температурі 4 °С розведений буфер стабільний принаймні 4 тиждень. 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 РЕАКТИВИ (НЕ ВХОДЯТЬ ДО НАБОРУ)

#### Інструментарій

- Мікропіпетки на 5 - 1000 мкл
- Мірна колба
- Лабораторна вага
- Міксер
- Водяна баня
- Центрифуга
- Планшетний зчитувач (405 нм)

#### Реагенти

- Двічі дистильована вода
- 40% етанол
- Сухе обезжирене молоко

### 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. Щоб визначити можливе перехресне забруднення, викликане попередніми екстракціями, наполегливо рекомендується звернути увагу на послідовність екстракції.

Слід застосовувати наступну підготовку проб для всіх видів зразків:

1. Щоб максимізувати однорідність і репрезентативність зразка, мінімум 5 г зразка слід максимально подрібнити в ступці, ударною млинку і т.д.
2. Один грам однорідної суміші суспендується в 10 мл етанолу 40%. При екстрагуванні продуктів, які містять танін, типу шоколад, додається 1 г обезжиреного сухого молока. Потім суспензію перемішують впродовж 5 хвилин для забезпечення хорошої однорідності.
3. Зразки центрифугують протягом 10 хвилин при 2000 g. Якщо неможливо відокремити супернатант від осаду повністю, суспензію слід фільтрувати, якщо необхідно.
4. Після цього, розчин без частинок розбавляють 1:50 в попередньо розведеному буфері для розведення зразка (наприклад 20 мкл розчину в 980 мкл буфера для розведення зразків). Якщо результати проби знаходяться поза діапазоном вимірювання, необхідне подальше розбавлення попередньо розведеного буферу екстракції та розведення. Додатковий розбавлення 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 відбувається за наступною схемою:

1. Підготувати зразки, як описано вище.

- Внести 100 мкл стандартів або підготовлених зразків в дублях у відповідні лунки планшета.
- Інкубувати протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Промити планшет три рази таким чином: Видалити вміст лунок (витрусити або аспирувати). Піпетувати 300 мкл розведеного миючого розчину в кожен 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 кожен лунку.
- Інкубувати протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Промити планшет як вказано в п. 4.
- Внести 100 мкл розчину субстрату в кожен 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) у кожен 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.

#### ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

- 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 нг/мл 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 глютену/гліадину в ррт за стандартною кривою. Залежно від досвіду і/або можливостей комп'ютера, можуть бути використані інші методи обробки даних.
- Для розрахунку відповідної концентрації глютену результат гліадину має бути помножений на коефіцієнт 2.

#### ТИПОВІ ЗНАЧЕННЯ СТАНДАРТІВ

У наступній таблиці наведено приклад для типової калібрувальної кривої. Зв'язування розраховують як відсоток поглинання стандарту 60 ррт. Ці значення є лише прикладом і не повинні використовуватись замість стандартної кривої, яка повинна бути виміряна в кожному новому випробуванні.

Гліадин (ррт)	(% зв'язування 0 нг/мл)
60	100
20	62
6	27
2	13
0	6

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### Чутливість

Межа виявлення ІФА глютену/гліадину становить 0,3 ррт.

Межа кількісного визначення становить 2 ррт.

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	Рис	Щириця
Яйце	Кукурудза	Квіноа
Свинина	Гречка	Теф
Яловичина	Просо	Какао
Соя	Овес	

Концентрація глютену в різних продуктах харчування може помітно відрізнятися. Крім того, концентрація різних зернових що визначається залежить від перехресної реактивності проламіну відносно антитіл до гліадину пшениці. Наступна таблиця дає орієнтир щодо перехресної реактивності різних злаків.

Злаки	Перехресна реактивність %
Пшениця	100
Жито	100
Ячмінь	5
Тритікале	40

#### Точність

Точність в аналізі	4-5%
Точність між аналізами	2-3%
Точність між партіями	5-13%

#### Лінійність

Серійне розбавлення насичених зразків (рисові вафлі, кукурудзяна крупа, темний шоколад, ковбаса і дитяче харчування) призвело до лінійності розбавлення 95% - 115%.

#### Відновлення

Середнє відновлення визначалось насиченням зразків різними кількостями гліадину:

Рисові вафлі	97%
Кукурудзяна крупа	98%
Чорний шоколад	97%
Дитяче харчування	88%
Ковбаса	85%



#### 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)