

# НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЛЮПИНУ У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

## 5141-8, Lupine

Каталог. №: 5141-8

Методика від 04-10-2010

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                    | 0,2 ppm  |
| Відновлення (насичені зразки) | 98-113 % |
| Час інкубації                 | 60 хв.   |

### ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

(Див. в оригіналі інструкції).

### ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Кількісний ІФА для визначення люпину заснований на принципі твердофазного імуноферментного аналізу. Антитіло, направлене проти білків люпину, зв'язане з поверхнею мікротитраційного планшета. Люпин, що містить зразки або стандарти, вноситься 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 білків люпину, 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 люпину 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 °C).
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).

### РЕАГЕНТИ

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

1. Мікропланшет, що складається з 12 смужок по 8 лунок кожна, покритих антитілами до люпину.
2. Стандарти люпину (0, 2, 5, 15, 30 ppm): 5 флаконів 1,0 мл кожен, готові до використання. Зафарбовані червоним.
3. Кон'югат (анти-люпин-пероксидаза): 15 мл, червоного кольору, готові до використання.
4. Розчин субстрату (ТМБ): 15 мл; готовий до використання.
5. Стоп розчин (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): 15 мл; готовий до використання.
6. Буфер для екстракції/розведення зразків (Tris): 2x120 10x концентрат, червоного кольору, готовий до використання. 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 тиждень. 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)

#### Інструментарій

- Мікропіпетки на 100 - 1000 мкл
- Мірна колба
- Лабораторна вага
- Ступка, міксер
- Водяна баня
- Центрифуга
- Планшетний зчитувач (405 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 люпина 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 всіх видів 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 розведеному буфері для екстракції. Потім суспензію інкубують протягом 15 хв 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 g. Якщо неможливо відокремити супернатант від осаду повністю, суспензію слід фільтрувати, якщо необхідно.
4. 100 мкл розчину без частинок вносить в кожен лунку. Якщо результати проби знаходяться поза діапазоном вимірювань, необхідно провести подальше розведення попередньо розведеного буферу 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 використовуйте 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.
2. Внести 100 мкл стандартів або підготовлених зразків в дублях у відповідні лунки планшета.
3. Інкубувати протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
4. Промити планшет три рази таким чином: Видалити вміст лунок (витрусити або аспірувати). Піпетувати 300 мкл розведеного мийного 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.

5. Внести 100 мкл кон'югату в кожну лунку.
6. Інкубувати протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
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 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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

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.

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 люпину в ррт 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 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.

| Люпин (ррт) | (% зв'язування 30 ррт) |
|-------------|------------------------|
| 30          | 100                    |
| 15          | 75                     |
| 5           | 38                     |
| 2           | 21                     |
| 0           | 5                      |

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### Чутливість

Межа виявлення ІФА люпину становить 0,2 ррт для стандартної кривої.

Контрольні дослідження із загальними матрицями вилилися в наступні межі ррт].

|                  |     |
|------------------|-----|
| Ковбаса          | 0.2 |
| Хліб             | 0.3 |
| Апельсиновий сік | 0.7 |
| Кетчуп           | 0.1 |
| Фрикадельки      | 0.2 |

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.

##### Точність

|                        |      |
|------------------------|------|
| Точність в аналізі     | 6-9% |
| Точність між аналізами | 5-9% |

#### Лінійність

Серійне розбавлення насичених зразків (ковбаса, хліб, апельсиновий сік, кетчуп та фрикадельки) призвело до лінійності розбавлення 78% - 126 %.

#### Перехресна реактивність

Для наступних продуктів перехресної реактивності не було виявлено:

|           |                      |                        |
|-----------|----------------------|------------------------|
| Молоко    | Соняшникове насіння  | Сосоа                  |
| Яйце      | Гарбузове насіння    | Картопля               |
| Пшениця   | Кш'ю                 | Цибуля-порей           |
| Жито      | Арахіс               | Горох                  |
| Овес      | Лісовий горіх        | Квасоля                |
| Ячмінь    | Мигдаль              | Помідор                |
| Рис       | Пекан                | Персик                 |
| Кукурудза | Кокос                | Черешня                |
| Гречка    | Американський горіх  | Апельсин               |
| Сезам     | Волоський горіх      | Полуниця               |
| Свинина   | Фісташки             | Слива                  |
| Яловичина | Австралійський горіх | Ріжкового дерева смола |
| Курятина  | Каштан               | Гуарова смола          |

Були виявлені наступні перехресні реакції:

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Турецький горох       | 0.0003% |
| Сочевиця              | 0.0004% |
| Соева мука, несмажена | 0.07%   |
| Соева мука, смажена   | 0.0009% |

#### Відновлення

Середнє відновлення визначалось насиченням зразків різними кількостями люпину:

|                  |      |
|------------------|------|
| Ковбаса          | 99%  |
| Хліб             | 113% |
| Апельсиновий сік | 104% |
| Кетчуп           | 98%  |
| Фрикадельки      | 111% |



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)