



МУЛЬТИСКРИН® β -казеин А1

Набор реагентов для определения β -казеина А1 в молоке коров методом иммуноферментного анализа

Версия 1.0

РАЗРАБОТАНО
ОДО «КомПродСервис»

Анализ *in vitro*

Хранить при 2-8°C

Пожалуйста, по вопросам технической поддержки и дополнительной информации обращайтесь к производителю или официальному дистрибьютору на территории Вашей страны:



Производитель:

ОДО "КомПродСервис"

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

www.komprod.com

Техническая поддержка

support@komprod.com

+375 17 336 50 54

Официальный дистрибьютор в России:

ООО "НеоТест"

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 649 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 704 05 50



МУЛЬТИСКРИН® β-казеин А1

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Назначение данного набора – определение концентрации β-казеина А1 в цельном коровьем молоке, обезжиренном молоке и сухом восстановленном коровьем молоке с целью контроля качества молока, содержащего β-казеин А2.

В редких случаях образцы молока могут содержать иммуноглобулины и другие компоненты, которые потенциально могут мешать проведению анализа.

2 ВВЕДЕНИЕ

Казеин кодируется геном CSN2, состоит из одной полипептидной цепи из 209 аминокислот и имеет молекулярную массу около 24 кДа. В коровьем молоке казеины представлены четырьмя генными продуктами, названными αS1-, αS2-, β- и κ-казеин. Относительная концентрация этих четырех казеинов в молоке может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как порода, стадия лактации коровы и кормление. Общий β-казеин в обезжиренном молоке крупного рогатого скота составляет 9-11 г/л и характеризуется генетическим полиморфизмом. Наиболее частыми генетическими вариантами, возникающими в результате однонуклеотидных полиморфизмов в гене CSN2, у молочных пород коров являются β-казеины А1 и А2. Эти два типа β-казеина обусловлены одноточечной мутацией в положении 67 полипептидной цепи (А1 – Гистидин / А2 – Пролин).

3 ПРИНЦИП РАБОТЫ

Набор «МУЛЬТИСКРИН® β-КАЗЕИН А1 ИФА» представляет собой иммуноферментную систему сэндвич-типа и позволяет количественно определять β-казеин А1 в исследуемом коровьем молоке в результате анализа продолжительностью 3 ч. На основании полученных данных можно оценить в процентах долю β-казеина А1 по отношению к общему β-казеину.

1. Лунки пластмассового микропланшета покрыты кроличьими поликлональными антителами против общего β-казеина. При внесении в лунки исследуемых, контрольных или градуировочных проб и последующей инкубации β-казеины А1 и А2 специфически связываются с твердой фазой, а все не вступившие в иммунохимическую реакцию вещества удаляются промывкой лунок специальным буферным раствором.

2. Добавление в лунки куриных поликлональных антител, специфичных к β-казеину А1, и выдерживание системы приводят к связыванию этих антител только с определяемым β-казеином А1 на поверхности лунок.

3. На третьей стадии иммуноферментного анализа (ИФА) в промытые лунки вносится конъюгат (кроличьи анти-куриные антитела химически

присоединены к пероксидазе), метящий ферментом твердофазный трехкомпонентный сэндвич-комплекс с β -казеином А1.

4. Фермент, иммобилизовавшийся на поверхности лунок, катализирует реакцию перекисного окисления между добавленными хромогеном (3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ТМБ) и субстратом (перекись водорода, H_2O_2), которая сопровождается развитием окраски.

5. Стоп-реагент инактивирует пероксидазу, меняет цвет и фиксирует интенсивность окрашивания раствора в лунке. Чем большее количество β -казеина А1 присутствует в лунке, тем выше оптическая плотность раствора (ОП), измеряемая при длине волны 450 нм.

4 ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Диапазон измерений методики для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, молока сухого восстановленного – от 0,32 мг/мл до 5,00 мг/мл.

Предел измерения для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, молока сухого восстановленного – от 0,32 мг/мл.

Примечание: при анализе проб молока, полученных смешиванием молока А2 от разных животных, например, при дойке в общий резервуар, возможно увеличение оптической плотности смешанной пробы, не связанное с загрязнением образцов молоком А1. В связи с этим чувствительность методики для смешанной пробы составит примерно 1,5 мг/мл.

Анализ не дает перекрестной реакции с β -казеином А2 крупного рогатого скота.

5 СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят следующие компоненты, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Состав набора реагентов

Компонент	Характеристика	Подготовка
1 Микропланшетный иммуносорбент, покрытый антителами к общему β -казеину	1 планшет, разборный, 6 стрипов по 8 лунок	Готов к использованию
2 Буфер для разведения	1 флакон, 50 мл	Готов к использованию
3 Градуировочные пробы С ₁ , С ₂ , С ₃ , С ₄ и С ₅ с концентрацией β -казеина А1 – 6,3; 12,5; 25,0, 50,0 и 100,0 нг/мл	5 флаконов, лиофилизированные препараты	Растворить в 0,7 мл буфера для разведения

4 Контрольные пробы	2 флакона, лиофилизированные препараты	Растворить в 0,7 мл буфера для разведения
5 Антитела, специфичные к β -казеину А1, 100-кратный концентрат	1 флакон, 60 мкл	Развести в 100 раз буфером для разведения перед использованием
6 Раствор для разведения конъюгата	1 флакон, 7 мл	Готов к использованию
7 Конъюгат (антивидовое антитело, меченное пероксидазой), 100-кратный концентрат	1 флакон, 60 мкл	Развести в 100 раз раствором для разведения конъюгата перед использованием
8 Промывочный раствор, 10-кратный концентрат	1 флакон, 50 мл	Развести в 10 раз дистиллированной водой перед использованием
9 Хромоген-субстратный раствор	1 флакон, 3,5 мл	Готов к использованию
10 Стоп-реагент	1 флакон, 7 мл	Готов к использованию

В таблице 2 указаны условия хранения и стабильность реагентов.

Таблица 2 – Устойчивость реагентов

Реагент	Хранение и стабильность
Неоткрытый ИФА-набор	6 месяцев при 2-8 °С
Восстановленные градуировочные и контрольные пробы	Использовать в тот же день; неиспользованные восстановленные пробы храните при минус 20 °С в течение 2 недель. Допускается однократное замораживание-оттаивание
Разведенный промывочный раствор	2 недели при 2-8 °С

Внимание!

Не замораживайте конъюгат.

Не используйте компоненты из других наборов.

Необходимые, но не входящие в комплект набора оборудование и посуда:

- одно- и многоканальные дозаторы для дозирования объемов жидкости 10–1000 мкл.
- пластиковая и стеклянная посуда для отбора проб, пробоподготовки и приготовления промывочного раствора.

- шейкер для микропланшетов.
- ридер для микропланшетов, способный считывать оптическую плотность при 450 нм.

Предварительные замечания

- Внимательно ознакомьтесь с инструкцией по использованию набора реагентов.
- Перед началом анализа доведите микропланшет, все реагенты и растворы до комнатной температуры.
- Храните хромоген-субстратный раствор в темноте.
- Извлеките из упаковки только необходимое количество стрипов, верните неиспользованные стрипы в упаковку, плотно закройте.
- Перед разведением содержимого обязательно проведите мягкое центрифугирование пробирок с концентратами антител к β -казеину А1 и конъюгата (объемы по 60 мкл), чтобы собрать растворы реагентов внизу пробирок.
- Стоп-реагент в составе набора, представляет собой разбавленную кислоту, при работе с ним следует соблюдать осторожность, также, как и с раствором NaOH.

Внимание! Анализ очень чувствителен к казеину А1 коровьего молока. Поэтому крайне важно избегать загрязнения оборудования, материалов, реагентов, проб и рабочих поверхностей молоком, содержащим казеин А1. Для предотвращения контаминации необходимо проводить пробоподготовку и ИФА на разных рабочих местах. Сначала следует развести образцы, затем, вымыв руки, надев новые перчатки, перейти непосредственно к выполнению ИФА на другом рабочем месте.

Перед проведением анализа необходимо очистить рабочие поверхности 0,5 М NaOH, затем дистиллированной водой. Рекомендуется использовать одноразовую пластиковую посуду, если это невозможно, то посуду необходимо последовательно промыть 0,5 М NaOH и дистиллированной водой.

В ходе раскапывания не касайтесь наконечником дозатора лунок иммунологического планшета.

7 ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для приготовления 0,5 М раствора NaOH навеска щелочи массой 2,0 г растворяется дистиллированной водой в стакане и после охлаждения количественно переносится в мерную колбу вместимостью 100 мл, раствор доводится до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивается.

Казеины не растворяются при нейтральном pH. Поэтому первое разведение 1 : 100 в 0,5 М NaOH (например, 10 мкл молока плюс 990 мкл 0,5 М NaOH) необходимо выполнить перед дальнейшими разбавлениями. Разбавление

буфером для разведения в 500 раз проводят двумя последовательными приемами. Сперва в 100 раз (например, 10 мкл предыдущего разведения в NaOH плюс 990 мкл буфера для разведения), затем еще в 5 раз (например, 100 мкл предыдущего разведения плюс 400 мкл буфера для разведения). Таким образом, конечное разведение исследуемых образцов молока составляет 1 : 50 000. Крайне важно, чтобы образцы интенсивно встряхивались при каждом разбавлении.

Количество иммунореактивного (т.е. выявляемого в ИФА) β -казеина А1 в молоке варьируется в зависимости от процессов, которым подвергалось молоко (например, гомогенизация, распылительная сушка и т.д.).

8 СТАБИЛЬНОСТЬ ОБРАЗЦОВ МОЛОКА

В ходе испытаний этим набором тестировались образцы молока, которые хранились при 2-8 °С и при минус 20 °С, а также образцы сухого молока, восстановленные водой. Подготовленные для анализа пробы разбавленного молока должны быть свежими и использоваться в течение 2 ч после приготовления.

9 ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГРАДУИРОВОЧНЫХ И КОНТРОЛЬНЫХ ПРОБ

Лиофилизированные препараты, содержащиеся во флаконах и маркированные С1, С2, С3, С4, С5, КП1 (положительная), КП2 (отрицательная), следует растворить в 0,7 мл буфера для разведения и хорошо перемешать содержимое.

Остатки неиспользованных проб можно хранить при минус 20 °С в течение 2 недель. Допускается однократное замораживание-оттаивание.

10 ПОДГОТОВКА ДРУГИХ РЕАГЕНТОВ

Буфер для разведения проб и раствор для разведения конъюгата следует хорошо перемешать перед использованием.

Антитела, специфичные к β -казеину А1, 100-кратный концентрат, необходимо разбавить в 100 раз буфером для разведения. Приготовьте достаточный объем рабочего раствора антител, чтобы добавить в каждую лунку по 100 мкл; для каждого 8-луночного стрипа требуется около 900 мкл рабочего раствора (например, 9 мкл концентрата антител плюс 891 мкл буфера для разведения).

Конъюгат, 100-кратный концентрат, следует разбавить в 100 раз раствором для разведения конъюгата. Приготовьте достаточный объем рабочего раствора конъюгата, чтобы добавить в каждую лунку по 100 мкл; для одного 8-луночного стрипа требуется около 900 мкл рабочего раствора (например, 9 мкл концентрата конъюгата плюс 891 мкл раствора для разведения конъюгата).

Промывочный раствор, 10-кратный концентрат (на дне флакона могут образовываться кристаллы), доведите до комнатной температуры, тщательно перемешайте и разведите в 10 раз дистиллированной водой; для каждого 8-

луночного стрипа требуется около 25 мл рабочего промывочного раствора на весь анализ.

11 ВЫПОЛНЕНИЕ АНАЛИЗА

Все этапы ИФА выполняются при комнатной температуре (20-25 °С) без встряхивания.

1. Перед началом анализа доведите температуру растворов и планшета до комнатной температуры.

2. Добавьте по 100 мкл буфера для разведения (C_0 – холостая проба, бланк), готовых растворов градуировочных и контрольных проб и разведенных образцов молока в лунки микропланшета, согласно таблице 3.

Таблица 3 – Схема расположения проб в лунках

Лунка	Номер стрипа					
	1	2	3	4	5	6
A	C_0	C_0	P_1	P_1	P_9	P_9
B	C_1	C_1	P_2	P_2	P_{10}	P_{10}
C	C_2	C_2	P_3	P_3	P_{11}	P_{11}
D	C_3	C_3	P_4	P_4	P_{12}	P_{12}
E	C_4	C_4	P_5	P_5	P_{13}	P_{13}
F	C_5	C_5	P_6	P_6	P_{14}	P_{14}
G	КП1	КП1	P_7	P_7	P_{15}	P_{15}
H	КП2	КП2	P_8	P_8	P_{16}	P_{16}

Примечания

1 C_0 - C_5 – градуировочные растворы в лунках A-F стрипа №1 и A-F стрипа №2, КП1 и КП2 – контрольные пробы в лунках G-H стрипов №1 и №2, P_1 - P_{16} – растворы исследуемых проб в лунках A-H стрипов №№ 3-6.

2 Для проведения исследований рекомендуется использовать 8-канальную пипетку.

3. Закройте планшет (например, парафильмом или крышкой) и инкубируйте планшет при комнатной температуре без доступа света и без встряхивания в течение 60 минут.

4. Слейте раствор из лунок и выполните 5 промывок рабочим промывочным раствором (200 мкл на лунку). Указания, как проводить промывку, смотрите в разделе технических советов.

5. Добавьте 100 мкл рабочего раствора антител, специфичных к β -казеину A1, в каждую лунку.

6. Закройте планшет (например, парафильмом или крышкой) и инкубируйте планшет при комнатной температуре без доступа света и без встряхивания в течение 60 минут.

7. Слейте раствор из лунок и промойте их, как это описано в шаге 4.

8. Добавьте 100 мкл рабочего раствора конъюгата в каждую лунку.
9. Закройте планшет (например, парафильмом или крышкой) и инкубируйте планшет при комнатной температуре без доступа света и без встряхивания в течение 45 минут.
10. Слейте раствор из лунок и промойте, как это описано в шаге 4.
11. Добавьте 50 мкл хромоген-субстратного раствора в каждую лунку и инкубируйте планшет при комнатной температуре в течение 5-7 минут, не встряхивая, в темноте.
12. Остановите реакцию, добавив 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку. Синий цвет раствора изменится на желтый. Измерьте оптическую плотность при 450 нм. Так как цвет желтого раствора стабилизируется в течение некоторого времени и со временем же тускнеет, мы рекомендуем считывать показания с планшета в период не ранее 5 минут и не позже 15 минут после добавления стоп-реагента.
13. Смотрите Приложение А для руководства по устранению неполадок при возникновении неожиданных проблем.

12 ТЕХНИЧЕСКИЕ СОВЕТЫ

1. Не выполняйте разведения в лунке.
2. Рекомендуется как минимум двойное параллельное измерение каждого стандарта и образца (так называемые дубликаты).
3. Не прикасайтесь к внутренней поверхности лунок наконечником пипетки.
4. Правильное опорожнение и промывка планшета имеют решающее значение для обеспечения низкого фона (т.е. неспецифического связывания). Для ручной промывки планшетов мы рекомендуем следующую процедуру.
 - А. Чтобы удалить жидкость из лунок, положите планшет на ладонь и, удерживая его, быстро переверните над раковиной. С усилием опустите руку вниз и резко ее остановите, чтобы выплеснуть жидкость из лунок. Если все сделано правильно, то эта техника должна предотвратить попадание жидкости на пальцы или на внешнюю сторону лунок микропланшета.
 - Б. Промокните микропланшет и сильно постучите им по чистому бумажному полотенцу 3-5 раз.
 - В. Промойте лунки, добавив дозатором по 200 мкл рабочего промывочного раствора в каждую лунку, и опорожните лунки, как описано в шагах А и Б.
 - Г. Повторите всю эту процедуру 5 раз.
5. Полное удаление жидкости из лунок на каждом этапе важно для получения надежных результатов. Однако не позволяйте лункам просыхать в течение всего процесса анализа.

6. Добавляйте хромоген-субстратный раствор и стоп-реагент в лунки в одном и том же порядке.

7. Перед измерением оптической плотности убедитесь, что все пузырьки из лунок удалены, а нижняя часть планшета визуалью чиста.

8. Для остановки реакции окрашивания добавленным стоп-реагентом обычно достаточно примерно 5 минут.

13 ПОДСЧЁТ И ИТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для построения градуировочной зависимости и расчета концентраций β -казеина А1 в анализируемых образцах используют прилагаемый шаблон в формате Microsoft Excel.

На основании внесенных оператором в таблицу прилагаемого шаблона параллельных измерений оптической плотности для холостых и градуировочных проб строится градуировочная зависимость ОП450 (ось ординат) от значений концентраций β -казеина А1 в нг/мл (ось абсцисс), при этом значения ОП450 для каждой градуировочной пробы скорректированы с учетом фоновой абсорбции.

Программа автоматически рассчитывает на основании градуировочного графика концентрацию β -казеина А1 в мг/мл в лунках с контрольными и анализируемыми пробами с учетом фактора разведения (1 : 50 000) после внесения оператором значений оптической плотности, в о.е., в соответствующие графы таблицы прилагаемого шаблона и последующей операции вычитания фоновой абсорбции.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение, при этом результат округляют до второго десятичного знака.

Типичный градуировочный график набора реагентов «МУЛЬТИСКРИН® β -КАЗЕИН А1 ИФА» представлен на рисунке.

Проба молока, полученная от отдельной коровы, считается положительной (содержащей β -казеин А1), если, полученное значение превышает 0,32 мг/мл.

Смешанная проба молока, считается положительной (содержащей β -казеин А1), если, полученное значение превышает 1,50 мг/мл.

Градуировочный график представлен здесь только для демонстрации. Градуировочный график должен быть построен пользователем для каждого отдельного ИФА.

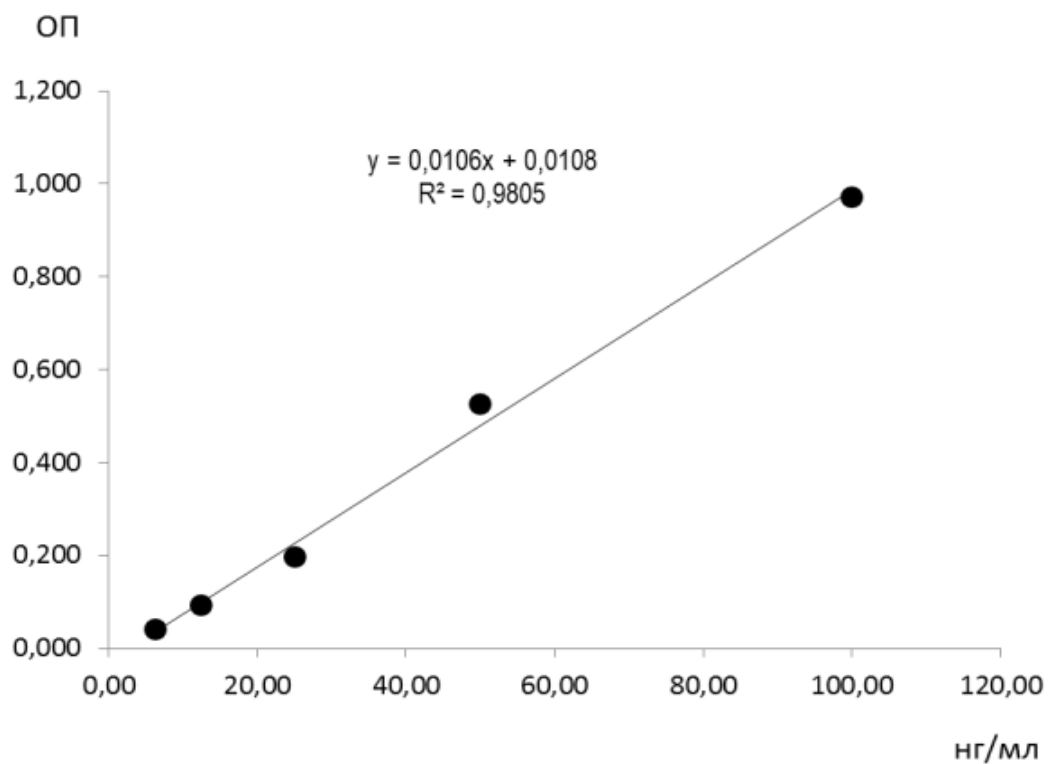


Рисунок – Градуировочный график

13 ОБЗОР ВЕРСИЙ

Номер версии	Описание
1.0	Первая версия

Приложение А

Возможные аналитические проблемы и пути их решения

Проблема	Причина	Решение
Высокий фон (ОП холостой пробы больше 0,20)	Неудовлетворительная промывка	Обязательно выполняйте 5 промывок после каждого этапа инкубации. Следуйте рекомендованной процедуре в разделе технических советов
	Избыток специфичных антител и/или конъюгата	Проверьте расчеты, выполненные для разбавления исходных концентрированных растворов. Убедитесь, что пипетки дозируют правильный объем
	Увеличенное время инкубации и повышенная температура	Пожалуйста, соблюдайте время инкубации, указанное в протоколе, и выполняйте инкубацию при комнатной температуре
	Загрязнение	Убедитесь, что вся пластиковая и стеклянная посуда чистая. Не используйте один и тот же наконечник для переноса образцов и холостых растворов в лунки
Показания низкой абсорбции (ОП градуировочной пробы C_5 меньше 0,60)	Недостаточно специфичных антител и/или недостаточно конъюгата	Проверьте расчеты, выполненные для разбавления исходных концентрированных растворов. Убедитесь, что пипетки дозируют правильный объем
	Срок годности реагентов истек	Обеспечьте правильное хранение набора и не используйте его после истечения срока годности
	Недостаточное время инкубации и пониженная температура	Пожалуйста, соблюдайте время инкубации, указанное в протоколе, и нагрейте реагенты до комнатной температуры перед использованием

Продолжение приложения А

Проблема	Причина	Решение
Показания низкой абсорбции (ОП градуировочной пробы C_5)	Высохли лунки микропланшета	Не оставляйте лунки микропланшета без раствора на длительное время
	Концентрат промывочного раствора не разбавлен	Убедитесь, что концентрат промывочного раствора разбавлен дистиллированной водой до состояния рабочего раствора
	Стоп-раствор не добавлен	Добавьте стоп-реагент, чтобы получить желтую окраску продукта реакции, которую можно измерить при 450 нм
Значения ОП выше предела микропланшетного фотометра	Чрезмерно длительная инкубация с хромоген-субстратным раствором	Сократите время инкубации, остановив ферментативную реакцию в более ранний момент времени
Высокий коэффициент вариации ($KV > 15\%$)	Хромоген-субстратный раствор и стоп-реагент добавляются не одним и тем же образом	Добавляйте хромоген-субстратный раствор и стоп-реагент в лунки в одном и том же порядке и с одинаковыми скоростями
	Разброс в пипетировании	Убедитесь, что дозаторы работают правильно и откалиброваны; пересмотрите свою технику дозирования; добавляйте стандарты и образцы в лунки с помощью одноканальной, а не многоканальной пипетки
Высокий коэффициент вариации	Недостаточное перемешивание реагентов	Кратковременно перемешайте растворы перед внесением в лунки
	Нижняя наружная поверхность микропланшета загрязнена	Очистите днище планшета перед считыванием данных