

RIDASCREEN® β -Lactoglobulin

Кат. No: R4901

Набор для количественного определения β -лактоглобулина методом иммуноферментного анализа

Для использования In vitro
Хранить при 2 - 8 °C



Официальный дистрибьютор
R-Biopharm в Беларуси
ОДО "КомПродСервис"
+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50
www.komprod.com, info@komprod.com



Официальный дистрибьютор
R-Biopharm в России
ООО "Неотест"
+7 (499) 649-02-01
info@neo-test.ru, www.neo-test.ru

Краткое описание

RIDASCREEN® β -лактоглобулин (Кат. No.: R4901) представляет собой набор для количественного определения β -лактоглобулина методом конкурентного иммуноферментного анализа в гидролизованных молочных продуктах, в том числе в гипоаллергенном детском питании.

Для определения нативного и обработанного β -лактоглобулина в напитках, содержащих сыворотку, молоко или сухое молоко, а также в соках, вине, пиве; в продуктах типа соусов, выпечке, мороженом, шоколаде, йогурте и т.п. рекомендуется использовать набор RIDASCREEN® FAST β -лактоглобулин (Кат. No.: R4902). Для определения казеина или казеинатов в пищевых продуктах рекомендуется использовать набор RIDASCREEN® FAST Казеин (Кат. No.: R4612).

Все необходимые для иммуноферментного анализа реагенты, включая стандарты, входят в комплектацию набора. Набор предназначен для 96 определений (включая стандарты). Для работы с набором необходим микропланшетный ИФА-анализатор (ридер).

Пробоподготовка	Гомогенизация и экстракция
Затраты времени:	пробоподготовка (для 10 проб) – примерно 30 мин проведение анализа (время инкубации) – 2 часа 45 мин
Предел обнаружения	2,1 мг/кг β -лактоглобулина
Предел количественного определения	5 мг/кг β -лактоглобулина
Специфичность:	устанавливалась путем определения кросс-реактивности с соответствующими веществами: β -лактоглобулин – 100% α -, β -, κ -Казеин < 1% α -Лактальбумин < 1% бычий сывороточный альбумин < 1%

Для определения кросс-реактивности использовали необработанные пищевые продукты (например, кукурузную муку), в обработанных или смешанных пищевых продуктах (например, кукурузном хлебе), кросс-реактивность антител может быть другой. Влияние мешающих определению субстанций (например, полифенолов) можно установить в экспериментах со спайками.

С целью повышения качества выполнения иммуноферментного анализа, мы рекомендуем обратиться к нашему пособию – Good ELISA Practice (GEP), в соответствующей версии. В нём приведены минимальные требования предъявляемые

к работе с тестами R-Biopharm AG и проведению ИФА. Пособие может быть загружено с сайта www.rbiopharm.com/products/food-feed-analysis.

Смежные продукты

RIDASCREEN® FAST Milk (Art. No.: R4652).

RIDASCREEN® FAST Casein (Art. No.: R4612).

RIDASCREEN® FAST β -Lactoglobulin (Art. No.: R4902).

RIDASCREEN® Extractor 2 (Art. No.: R4613).

Bioavid Lateral Flow Milch/Milk (Art. No.: BL613-10/BL613-25).

1. Назначение набора

RIDASCREEN® β -лактоглобулин представляет собой набор для количественного определения β -лактоглобулина методом конкурентного иммуноферментного анализа в гидролизованных молочных продуктах, в том числе в гипоаллергенном детском питании. Калибровка набора проведена на контрольных образцах гидролизованного β -лактоглобулина; стандарты состоят из нативного β -лактоглобулина. Анализ обнаруживает нативный и обработанный белок, а также его фрагменты (при нагревании молока нативный β -лактоглобулин частично денатурируется).

2. Общая информация

Коровье молоко содержит около 3,2% белков (2,6% казеинов и 0,6% сывороточных белков). Приблизительно половина сывороточной фракции состоит из β -лактоглобулина. Аллерген может присутствовать как ингредиент или как загрязнитель в сырых и приготовленных продуктах. В соответствии с постановлением ЕС № 1169/2011 присутствие в продуктах питания молока и его компонентов должно быть указано на этикетках. Существуют аналогичные правила, например, в США, Канаде, Австралии и Новой Зеландии. В соответствии с Директивой Комиссии 2006/141/ЕС содержание иммунореактивного белка в детском питании должно составлять менее 1%.

3. Принцип работы теста

В основе работы теста лежит реакция антиген-антитело. Лунки микропланшета покрыты β -лактоглобулином. В состав набора входят стандарты, необходимые растворы и антитела к β -лактоглобулину. Свободный и иммобилизованный β -лактоглобулин конкурируют за сайты связывания антител. После промывки добавляют

вторичные антитела, меченные пероксидазой (ферментный конъюгат). Они связываются с комплексом антитело-β-лактоглобулин. Несвязанный конъюгат затем удаляется на этапе промывки. Ферментный субстрат и хромоген добавляют в лунки и инкубируют. Связанный конъюгат превращает бесцветный хромоген в синий продукт. Добавление стоп-раствора вызывает изменение цвета с синего на желтый. Измерение оптической плотности раствора проводится фотометрически при 450 нм. Оптическая плотность раствора обратно пропорциональна концентрации β-лактоглобулина в образце.

4. Реагенты, входящие в состав набора

Каждый набор содержит достаточно реагентов для выполнения 96 определений (включая анализ стандартов).

Компонент	Цвет крышки	Формат	-	Количество
Микропланшет	-	Готов к работе		96 лунок
Стандарт 1	Прозрачная	Готов к работе	0 нг/л	1.3 мл
Стандарт 2	Прозрачная	Готов к работе	10 нг/л	1.3 мл
Стандарт 3	Прозрачная	Готов к работе	30 нг/л	1.3 мл
Стандарт 4	Прозрачная	Готов к работе	90 нг/л	1.3 мл
Стандарт 5	Прозрачная	Готов к работе	270 нг/л	1.3 мл
Стандарт 6	Прозрачная	Готов к работе	810 нг/л	1.3 мл
Промывочный буфер	Коричневый	Концентрат	10x	100 мл
Конъюгат	Красный	Готов к работе		12 мл
Антитела	Белый	Концентрат	11x	0,7 мл
Субстрат	Зеленый	Готов к работе		7 мл
Хромоген	Синий	Готов к работе		7 мл
Стоп-раствор	Жёлтый	Готов к работе		14 мл

5. Необходимые, но не поставляемые реагенты

5.1. Оборудование:

- микропланшетный спектрофотометр (450 нм);
- шейкер;
- микропипетки 20 – 200 мкл и 200 – 1000 мкл;
- градуированные пипетки;
- лабораторная мясорубка/измельчитель, ступка или гомогенизатор;
- центрифуга + центрифужные пробирки;
- водяная баня.

5.2. Реагенты:

- дистиллированная или деионизированная вода.

6. Предупреждения и меры предосторожности

Тест должен выполняться только хорошо подготовленным и обученным персоналом. Необходимо строго соблюдать требования инструкции.

В состав набора могут входить опасные вещества. Для ознакомления с мерами безопасности при работе с опасными веществами, пожалуйста, изучите соответствующие паспорта безопасности – material safety data sheets (MSDS), доступные online на сайте www.r-biopharm.com.

7. Рекомендации по хранению

Набор должен храниться при 2 - 8 °С. **Не замораживайте набор и его компоненты.**

Неиспользованные микролунки необходимо поместить назад в оригинальную упаковку из фольги, плотно закрыть её и хранить с десикантом при 2 - 8 °С.

Раствор хромогена светочувствителен, поэтому следует избегать попадания на него прямых солнечных лучей.

Качество набора не гарантировано по окончании срока годности, указанного на этикетке.

Не следует заменять или комбинировать отдельные реагенты из наборов разных серий.

8. Признаки непригодности или порчи реагентов

– появление голубоватого окрашивания в бесцветном растворе хромогена до проведения тестирования;

– значение абсорбции меньше 0.8 оптических единиц ($A_{450\text{ нм}} < 0.8$) для стандарта 1.

9. Подготовка образцов

Рабочие устройства, такие как мельница, стеклянные флаконы или шпатели, необходимо очищать от остатков молока до и после каждой пробоподготовки, чтобы избежать загрязнения образцов.

Промывочный буфер для разведения образцов, разведения антител и промывки предоставляется в виде 10-кратного концентрата. Перед использованием буферный концентрат должен быть разбавлен 1:10 (1 + 9) дистиллированной водой (т.е. 100 мл

буферного концентрата + 900 мл дистиллированной воды). Разбавленный буфер можно хранить в течение четырех недель при 20 - 25 ° С.

Пробоподготовка:

- взвесить 2 г образца во флаконе для центрифугирования;
- добавить дистиллированную воду до конечного объема 50 мл и перемешивать содержимое флакона в течение 10 мин при комнатной температуре (20 - 25 ° С);
- разбавить экстракт 1:20 (1 + 19) разведенным буфером (например, 50 мкл образца + 950 мкл буфера); итоговое разведение образца составляет 1 : 500;
- в анализе использовать 50 мкл полученного раствора на лунку;

Экстракты образцов можно хранить при температуре 2 - 8 ° С в течение 1 дня.

10. Проведение теста

10.1. Подготовка к проведению теста

Перед началом работы доведите все реагенты до комнатной температуры (20 – 25°C).

Антитело (флакон с белой крышкой) поставляется в виде концентрата. Поскольку разбавленный раствор антител обладает ограниченной стабильностью, следует восстанавливать только то количество антител, которое действительно необходимо. Перед восстановлением раствор антител следует осторожно встряхнуть. Для восстановления концентрат антител разводят 1:11 (1 + 10) в разбавленном буфере (см. выше), например, 200 мкл концентрата антител + 2 мл буфера, готового к использованию, достаточно для 4-х стрипов микропланшета.

10.2. Процедура теста

Тщательно следуйте рекомендуемой процедуре промывки планшета. В процессе выполнения анализа не допускайте высыхания микролунок. Рекомендуется пипетировать антитела, конъюгат, субстрат/хромоген и стоп-раствор многоканальной пипеткой, чтобы избежать временного сдвига по планшету.

1. Вставьте в рамку планшета микролуночки в количестве, достаточном для всех стандартов и исследуемых образцов для проведения анализа в дубликатах. Запишите порядок расположения лунок со стандартами и исследуемыми образцами на планшете.
2. Внесите по 50 мкл стандартов или исследуемых образцов в соответствующие лунки для проведения анализа в дубликатах.

3. Добавьте в каждую лунку по 50 мкл разведенных антител. Аккуратно перемешайте планшет вручную и инкубируйте в течение 2 часов при комнатной температуре (20 - 25 °C).
4. Удалите жидкость из лунок, перевернув рамку планшета и тщательно выбив капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Убедитесь, что в лунках не содержится жидкости. Заполните все лунки 250 мкл разведенного моющего буфера (см. п. 10.1), затем удалите жидкость из лунок. Повторите процедуру промывки лунок еще два раза.
5. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл конъюгата. Аккуратно перемешайте планшет вручную и инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °C).
6. Удалите жидкость из лунок, перевернув рамку планшета и тщательно выбив капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Убедитесь, что в лунках не содержится жидкости. Заполните все лунки 250 мкл разведенного моющего буфера (см. п. 10.1), затем удалите жидкость из лунок. Повторите процедуру промывки лунок еще два раза.
7. Внесите по 50 мкл субстрата и 50 мкл хромогена во все лунки. Аккуратно перемешайте планшет вручную и инкубируйте в течение 15 мин при комнатной температуре (20 - 25 °C) в темноте.
8. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора. Аккуратно перемешайте планшет вручную. В течение 10 минут после добавления стоп-реагента измерьте оптическую плотность при 450 нм.

11. Результаты

Для обработки результатов иммуноферментных тестов RIDASCREEN® компанией R-Biopharm было разработано специальное программное обеспечение: программа RIDA@SOFT Win.net, (Кат. № Z9996). Обработка результатов должна проводиться с использованием функции кубического сплайна. Пример стандартной кривой дан в сертификате качества на тест-систему.

Концентрация β -лактоглобулина в нг/мл (ppb), соответствующая абсорбции каждого образца, считывается из калибровочной кривой. Эта концентрация должна быть дополнительно умножена на коэффициент разбавления 500, концентрация β -

лактоглобулина, фактически содержащегося в образце, выражается в мг/кг (ppm).

Пример расчета:

β -лактоглобулин 150 нг/мл считывают с калибровочной кривой. После умножения на коэффициент разбавления 500 полученная концентрация составляет 75000 нг/г (75 мг/кг) β -лактоглобулина.

Общие замечания:

Образцы с отрицательным результатом могут содержать аллерген в концентрации ниже предела обнаружения метода. Также образцы могут содержать другие аллергены, такие как, например, казеин или лактоза.

Из-за множества видов пищи матричные эффекты не могут быть исключены. В пищевых продуктах, подвергнутых обработке (например, термообработка, дегидратация и т. д.) белки могут быть изменены или фрагментированы, что может оказывать влияние на результаты анализа.

Чувствительность набора по отношению к интактному β -лактоглобулину несколько ниже чем к гидролизованному β -лактоглобулину (в гидролизованных продуктах для связывания антител доступно больше эпитопов).

Перекрестная реактивность антител может варьировать в зависимости от образца. Все перекрестные реактивности и проанализированные матрицы описаны в валидационном отчете.

Рекомендации:

Для того, что бы обеспечить высокие аналитические качества набора мы рекомендуем:

- каждый образец анализировать в дубликатах;
- в качестве контрольных образцов использовать образцы свободные от аллергена и образцы контаминированные аллергеном;
- если pH образцов резко кислое или щелочное необходимо довести pH до нейтральных значений;
- вследствие большого количества видов пищевых продуктов не следует исключать матричные эффекты;
- проводить эксперименты с контаминированными образцами для повышения качества выполнения анализа;
- образцы с оптической плотностью меньше чем оптическая плотность 6 стандарта необходимо развести и повторить анализ (обратите внимание, что в данном случае, в

вычислениях, необходимо использовать дополнительный фактор разведения образцов).

Дополнительная информация о продукте доступна по запросу у местного дистрибьютора или R-Biopharm AG.

Дополнительные замечания по применению:

- анализ глютена или β -лактоглобулина в ферментных добавках.



Техническая поддержка и прием заявок:
+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50, +7 (499) 649-02-01
info@komprod.com, support@komprod.com, info@neo-test.ru