

ГЛЮТЕН ИФА

5171GT[10]03.20

Конкурентный иммуноферментный анализ для
количественного определения глиадина и фрагментов глиадина
в пищевых продуктах

Только для использования *in vitro*
Хранить при температуре 2 – 8 °С



Официальный дистрибьютор
R-Biopharm в Республике Беларусь
ОДО «КомПродСервис»
+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50
www.komprod.com | info@komprod.com



Официальный дистрибьютор
R-Biopharm в Российской Федерации
ООО «Неотест»
+7 (499) 649-02-01
info@neo-test.ru | www.neo-test.ru

КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ

Gluten-Tec[®] ELISA — это конкурентный иммуноферментный анализ для количественного определения глиадина и фрагментов глиадина в пищевых продуктах. Образцы и стандарты измеряются в двух экземплярах, что позволяет проанализировать в общей сложности 40 образцов с помощью одного набора.

Набор Gluten-Tec[®] ELISA содержит все необходимые реагенты, включая стандарты, для проведения теста. Реагенты для подготовки образцов не прилагаются.

1. ВВЕДЕНИЕ

Целиакия (Ц) — это аутоиммунное заболевание, приводящее к поражению тонкого кишечника. Оно связано с реакцией на глиадин, компонент глютена, присутствующий в пшенице и других культурах, таких как ячмень и рожь. В Медицинском центре Лейденского университета (LUMC) разработаны и охарактеризованы моноклональные антитела, направленные против иммуностимулирующих эпитопов Т-клеток (токсических эпитопов), вовлеченных в Ц. Антитело против глиадина α 20 было выбрано для разработки чувствительного конкурентного ИФА, который выявляет хорошо изученный токсичный эпитоп в пшенице, ячмене, ржи и их межсортовых видах.

Медицинский центр Лейденского университета в сотрудничестве с EuroProxima разработал Gluten-Tec[®], новый конкурентный ИФА, который выявляет хорошо охарактеризованный Т-клеточный стимулирующий эпитоп глиадина и гомологичных последовательностей, присутствующих в пшенице, ячмене, ржи и их межсортовых видах. Для калибровки используются синтетические пептиды, что обеспечивает точную и воспроизводимую стандартизацию. Анализ может выявлять не только интактные, но и гидролизованные белки.

Моноклональное антитело и пептидная последовательность защищены патентами. Патент ЕС выдан под номером EP1779115.

2. ПРИНЦИПЫ ИФА GLUTEN-TEC[®]

Стандарты или образцы пептида глиадина α 20 добавляют в лунки ИФА-планшета, покрытые анти- α 20 антителом. Затем в каждую лунку добавляют конъюгат α 20 глиадин-пептид-HRP и планшет инкубируют в течение 3 часов при температуре 4°C. После этапа промывки количество связанного конъюгата визуализируется путем добавления субстрата ТМВ. Реакция останавливается добавлением серной кислоты. Интенсивность окраски измеряется фотометрически при длине волны 450 нм.

3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Моноклональное антитело, используемое в тесте, специфично для стимулирующего Т-клетки пептида на молекуле глиаина из пшеницы и родственных проламинов из ржи и ячменя. Эти эпитопы играют первостепенную роль в возникновении целиакии. Перекрестной реакции с овсом, кукурузой, рисом, просом и гречихой не наблюдается.

Результаты теста выражаются в глиадиновых эквивалентах, рассчитанных по пептидной стандартной кривой.

Чувствительность теста была определена на овсе.

Овес (бланк)	Глиадин (мг/л (ppm))
Предел обнаружения (LOD)	2.9
Предел количественного определения (LOQ)	3.6

Извлечение определялось в овсе, протравленном стандартом PWG-глиаина, пшенице, ржи и ячмене при двух различных уровнях: 5 ppm и 10 ppm.

Овес с добавлением спайка:	% извлечения	
	Спайк 5 ppm	Спайк 10ppm
Стандарт PWG-глиаина	108	96
Пшеницы	108	111
Ржи	112	97
Ячменя	125	111

Если установлено, что образец не соответствует требованиям, результаты должны быть проверены повторно с использованием подтверждающего метода.

4. УСЛОВИЯ ОБРАЩЕНИЯ И ХРАНЕНИЕ

- Набор реагентов должен храниться при температуре 2 – 8°C до и сразу же после и использования.
- После истечения срока годности набора и/или его компонентов невозможно гарантировать приемлемое качество.
- Планшет должен быть адаптирован до температуры окружающей среды перед вскрытием упаковки, чтобы избежать появления конденсата.
- Избегайте образования конденсата в лунках планшета. Перед вскрытием запечатанного планшета доведите его до температуры окружающей среды.
- Следует избегать воздействия света на субстрат ТМВ.

Признаки распада реагентов:

- Окрашивание раствора хромогена в синий цвет до его внесения в лунки.

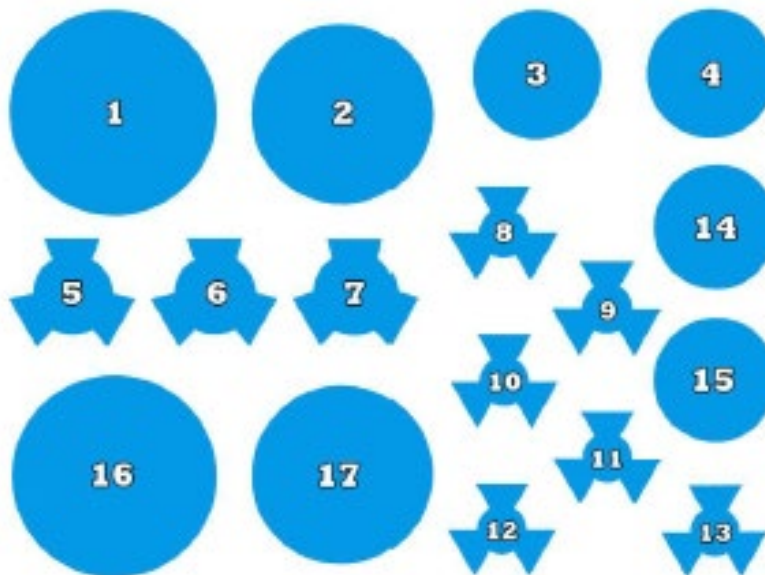
– Слабая или отсутствие цветной реакции в лунках нулевого стандарта ($E_{450} \text{ м} < 0,8$).

5. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Инструкция

Один запечатанный 96-луночный микропланшет (12 стрипов по 8 лунок), сенсibilизированный антителами. Планшет готов к использованию.

Позиции реагентов в наборе. Для приготовления реагентов смотрите раздел 9.



1. **Буфер для разведения проб** (20 мл, 4-кратно концентрированный)
2. **Буфер для промывки планшета** (30 мл, 20-кратно концентрированный)
3. **Раствор субстрата ТМВ** (12 мл, готов к использованию)
4. **Стоп-раствор** (12 мл, готов к использованию)
5. Не используется
6. Не используется
7. Не используется
8. **Конъюгат пептид-HRP** (0,1 мл, 100-кратной концентрации)
9. Не используется
10. Не используется
11. Не используется
12. Не используется
13. **Нулевой стандартный раствор** (2 мл, готов к использованию)
14. **Стандартный раствор 1** (1 мл, готов к использованию) **0,156 нг/мл α -20-пептид**
15. **Стандартный раствор 2** (1 мл, готов к использованию) **0,313 нг/мл α -20-пептид**

16. **Стандартный раствор 3** (1 мл, готов к использованию) **0,625 нг/мл α -20-пептид**
17. **Стандартный раствор 4** (1 мл, готов к использованию) **1,25 нг/мл α -20-пептид**
18. **Стандартный раствор 5** (1 мл, готов к использованию) **2,5 нг/мл α -20-пептид**
19. **Стандартный раствор 6** (1 мл, готов к использованию) **5 нг/мл α -20-пептид**

6. ОБОРУДОВАНИЕ И ТРЕБУЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ТЕСТ-НАБОРА

- пробирки с закручивающейся крышкой объемом 15 мл Greiner
- весы и емкости для взвешивания
- перчатки
- вытяжной шкаф
- гомогенизатор
- вортекс
- орбитальный шейкер
- центрифуга (2000×g)
- автоматическое устройство для промывки планшетов либо многоканальный пипет-дозатор 100 – 300 мкл
- шейкер для микротитровальных планшетов
- стеклянные пробирки объемом 4 мл
- микропланшетный фотометр с фильтром 450 нм
- пипет-дозаторы 10 – 1000 мкл
- дозатор с наконечниками 2,5 мл
- магнитная мешалка с подогревом
- дистиллированная вода
- этанол $\geq 99,5\%$ (v/v)
- рыбий желатин (Sigma G7765)

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Данный набор может содержать опасные вещества. Сведения об опасности см. в соответствующих паспортах безопасности (SDS).
- Избегайте контакта всех биологических материалов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не пипетируйте через рот.
- Не ешьте, не пейте, не курите, не храните и не готовьте продукты питания, не наносите косметику в пределах отведенной рабочей зоны.

- Не используйте компоненты с истекшим сроком годности и не используйте компоненты из разных партий.
- Каждая лунка в конечном итоге используется в качестве оптической кюветы. Поэтому не прикасайтесь к нижней поверхности лунок, не допускайте их повреждения и загрязнения.
- Перед использованием все компоненты должны быть полностью растворены. Обратите особое внимание на субстрат и промывочный буфер, которые кристаллизуются при +4°C.
- Оптимальные результаты будут получены при строгом соблюдении данного протокола. Тщательное пипетирование и промывка на протяжении всей процедуры необходимы для поддержания высокой прецизионности и точности.

8. ПРОБОПОДГОТОВКА

Из-за природы анализируемых образцов (гомогенизированные зерна и продукты из них) возможно перекрестное загрязнение между образцами, а также контаминация из лабораторной среды. Для предотвращения этого необходимо принять специальные меры предосторожности:

- во время проведения теста необходимо постоянно носить перчатки и лабораторные халаты
- используемые поверхности и оборудование должны быть очищены 60%-ным этанолом.

8.1 Продовольственные товары, за исключением продуктов, содержащих гречку, шоколад, кофе, какао или танин

- взвесьте 0,5 г репрезентативного гомогенизированного образца и добавьте 4,5 мл 60%-ного раствора этанола (глава 9)*
- встряхивайте на роторной шейкере в течение 20 минут при температуре 60°C
- центрифугируйте: 10 минут при 2000 × g при температуре 20 – 25°C
- разбавьте супернатант 1:10 буфером для разведения (т.е. 50 мкл супернатанта + 450 мкл буфера для разведения)
- используйте для анализа 50 мкл на лунку.

8.2 Продукты, содержащие гречку, пшеницу, шоколад, кофе, какао или танин

- приготовьте раствор рыбьего желатина (глава 9)**.
- взвесьте 0,5 г гомогенизированного образца в пробирке Greiner с завинчивающейся крышкой объемом 15 мл

- добавьте 4,5 мл раствора рыбьего желатина (желатиновый буфер выпадает в осадок, перемешивайте раствор во время пипетирования), перемешайте на вортексе в течение 30 секунд
- перемешивайте на роторном шейкере в течение 30 минут
- центрифугируйте 10 минут при $2000 \times g$ при 20 – 25°C
- разбавьте супернатант 1:10 буфером для разведения (т.е. 50 мкл супернатанта + 450 мкл буфера для разведения)
- используйте для анализа 50 мкл на лунку

8.3 Пиво и жидкие пищевые компоненты

- добавьте к 0,5 мл жидкого образца 4,5 мл 60%-ного раствора этанола (глава 9)*
- встряхивайте на роторном шейкере в течение 20 минут при температуре 60°C
- центрифугируйте: 10 минут при $2000 \times g$ при температуре 20 – 25°C
- разбавьте супернатант 1:10 буфером для разведения (т.е. 50 мкл супернатанта + 450 мкл буфера для разведения)
- используйте для анализа 50 мкл на лунку.

9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Перед использованием тест-системы доведите температуру всех реагентов до комнатной (20 – 30°C). Неиспользуемые реагенты должны быть немедленно помещены в оригинальную упаковку на хранение при температуре 2 – 8°C.

Готовьте реагенты непосредственно перед использованием

Микротитровальный планшет

Перед открытием планшета доведите его до температуры окружающей среды, чтобы избежать образования конденсата в лунках. Верните неиспользованные стрипы в герметичный пакет с влагопоглотителем и храните при температуре 2 – 8°C для использования в последующих анализах. Сохраните также держатель стрипов.

Буфер для промывки

Буфер для промывки поставляется в 20-кратной концентрации. Буфер необходимо приготовить непосредственно перед использованием. На один стрип необходимо 20 мл разведенного раствора (1 мл концентрированного буфера + 19 мл дистиллированной воды).

Буфер для разведения

Буфер для разведения имеет 4-кратную концентрацию. Концентрированный буфер следует довести до комнатной температуры и тщательно перемешать перед разведением (20 мл буфера + 60 мл дистиллированной воды). В концентрированном буфере может выпасть осадок. Хорошо перемешайте перед разбавлением дистиллированной водой. Разведенный в 4 раза буфер можно хранить в холодильнике (при температуре 2 – 8°C) до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.

Конъюгат (100 мкл)

Конъюгат (пептид-HRP) имеет 100-кратную концентрацию. Центрифугируйте конъюгат в пробирке 1 мин, 1000 × g, чтобы обеспечить стекание концентрата на дно пробирки. Добавьте 10 мкл концентрированного раствора конъюгата к 990 мкл буфера для разведения. На 2 × 8 лунок потребуется 0,8 мл разбавленного конъюгата. Неиспользованный концентрированный конъюгат храните при температуре 2 – 8°C.

Субстрат ТМВ

Субстрат ТМВ (готовый к использованию) имеет тенденцию выпадать в осадок при +4°C. Перед использованием убедитесь, что флакон находится при комнатной температуре (хранить в темноте) и перемешайте содержимое перед внесением в лунки.

* 60%-ный раствор этанола

Добавьте 200 мл дистиллированной воды к 300 мл этанола (абсолютного) и хорошо перемешайте.

Раствор рыбьего желатина

Добавьте в стеклянную бутылку с широким горлышком:

Добавьте 100 мл дистиллированной воды, 300 мл этанола (абсолютного) и 25 г рыбьего желатина в стеклянный флакон с широким горлышком. Доведите объем до 500 мл дистиллированной водой. Закройте бутылку крышкой и нагрейте (вращая) до 60°C, пока раствор не станет однородным и прозрачным. Хранить не более одной недели при комнатной температуре.

10.ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Протокол промывки

Несвязанные компоненты должны эффективно удаляться между каждым этапом инкубации в ИФА. Это достигается путем надлежащей промывки. Каждая

процедура промывания должна выполняться с особой тщательностью, чтобы гарантировать хорошие результаты меж- и внутрианалитических исследований.

Ручное ополаскивание или ополаскивание с помощью автоматического оборудования для промывки планшетов (вошера) может быть выполнено следующим образом:

Промывка вручную

1. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.
2. Все лунки заполняют буфером для промывания до края лунки (300 мкл)
3. Этот процесс промывки (этапы 1 и 2) повторяют трижды.
4. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета
5. После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.
6. Не допускайте высыхания лунок перед внесением следующего реагента.

Промывание с помощью автоматического вошера

При использовании автоматического вошера проверьте, чтобы из всех лунок жидкость удалялась полностью, чтобы раствор для промывания тщательно распределялся, заполняя до края каждую лунку во время каждого цикла промывания. Вошер должен быть запрограммирован на выполнение трех циклов промывки.

Протокол анализа

1. Приготовьте пробы в соответствии с разделом 8 (Пробоподготовка) и реагенты в соответствии с разделом 9 (Приготовление реагентов).
2. Внесите 100 мкл нулевого стандартного раствора в двух повторностях (лунки N1, N2, бланк)
Внесите 50 мкл нулевого стандартного раствора в двух повторностях (лунки A1, A2, максимальная ОП).
Внесите 50 мкл каждого стандартного раствора в двух повторностях (лунки от B1,2 до G1,2, т.е. 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5 и 5 нг/мл).
3. В оставшиеся лунки внесите по 50 мкл каждой пробы в двух повторностях (40 проб/ 80 лунок).

4. Внесите по 50 мкл конъюгата (пептид-HRP) во все лунки за исключением Н1 и Н2.
5. Накройте планшет и перемешайте его содержимое в течение нескольких секунд на шейкере для микропланшетов.
6. Инкубируйте в течение 3 часов в темноте при температуре 4°C).
7. Удалите раствор из микропланшета и промойте 3 раза буфером для промывания.
8. Внесите по 100 мкл раствора субстрата в каждую лунку.
9. Инкубируйте в течение 30 минут при температуре 20 – 25°C в темноте.
10. Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
11. Сразу же измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм.

11.ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычитите среднее значение оптической плотности (ОП) для лунок Н1 и Н2 (бланк) из отдельных значений ОП для лунок, содержащих стандарты и образцы.

Значения ОП для шести стандартных растворов и проб (средние значения дубликатов) делят на среднее значение ОП нулевого стандарта (V_{max}, лунки А1 и А2) и умножают на 100. Таким образом, нулевой стандарт принимается (V_{max}) за 100% (максимальная оптическая плотность), а другие значения ОП приводятся в процентах от ОП нулевого стандарта (V_{max}).

$$\frac{\text{ОП стандарта (или образца)}}{\text{ОП нулевого стандарта (V}_{\max})} \times 100 = \% \text{ от максимальной оптической плотности}$$

Калибровочная кривая:

Значения (% от максимальной оптической плотности), вычисленные для стандартных растворов, наносятся на график (по оси Y) напротив эквивалентной концентрации аналита (нг/мл) по логарифмической оси X.

Альтернативный способ построения калибровочной кривой:

По оси Y строится график значений ОП относительно концентрации по оси X. Шкала оси Y – логистическая, а оси X – логарифмическая.

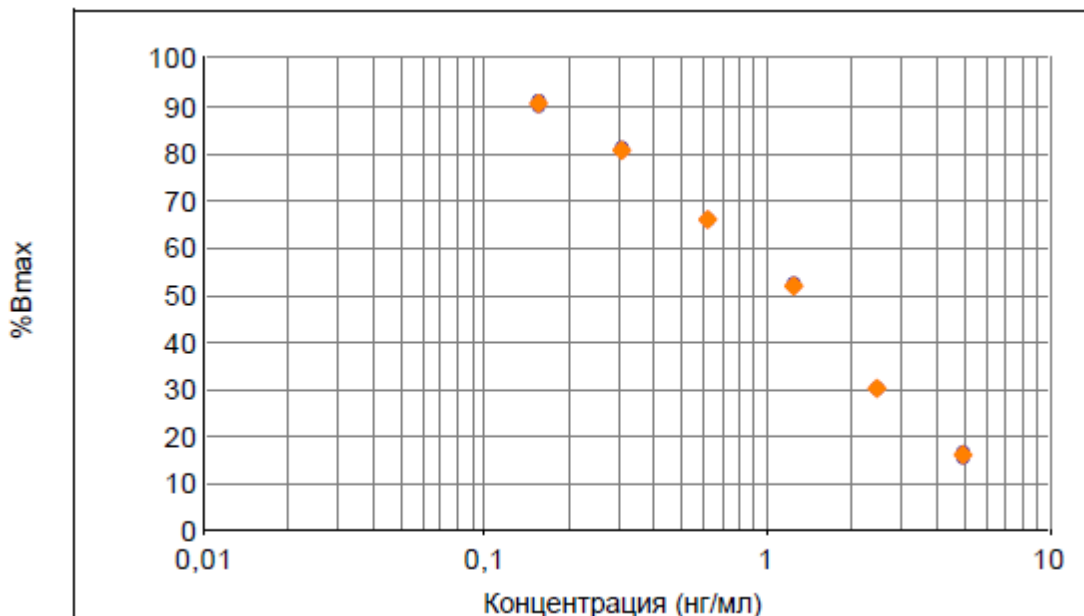


Рис. 1: Пример калибровочной кривой

Чтобы получить концентрацию α -20-пептида в образце (нг/г; ppb), концентрацию α -20-пептида, считанную из калибровочной кривой, умножают на коэффициент 100.

Количество пептида в образцах соотносится с содержанием глиадина.

концентрация глиадина = концентрация α -20-пептида \times 250

концентрация глютена = концентрация глиадина \times 2

12.ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Для размещения заказа на тест-набор GLUTEN-TEC® ELISA используйте код набора 5171GT.



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