

Ridascreen® Фаст Ei/Egg белок

Иммуноферментный метод
количественного определения яичного белка

Арт. R 6402

Тест для анализа in vitro
Хранить при температуре 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

Общая информация

Тест-система Ridascreen® Фаст Ei / Egg Protein (арт. R6402) является тест-системой для иммуноферментного анализа и предназначена для количественного определения яичного белка в продуктах питания.

Все реактивы для проведения ИФА, включая градуировочные растворы, содержатся в тест-наборе. Один тест-набор рассчитан на проведение 48 определений (включая градуировочные растворы). Для оценки результатов необходим микропланшетный фотометр.

Пробоподготовка: гомогенизировать, экстрагировать, центрифугировать

Затраты времени:

Пробоподготовка (на 10 проб) – прибл. 20 мин.

Постановка анализа (время инкубации) – 30 мин.

Стандартный материал: NIST Reference Material 8445 (whole egg powder)

Предел обнаружения: 0,096 мг/кг цельного яичного белка (соответствует 0,03 мг/кг белого яичного белка).

Предел количественного определения: 0,5 мг/кг цельного яичного белка (соответствует 0,13 мг/кг белого яичного белка).

Специфичность: специфические антитела обнаруживают белки яичного белка: овальбумин и овомукоид. Не наблюдалось перекрестной реактивности к сырому или приготовленному мясу курицы, индейки, свинины и говядины.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данная инструкция описывает порядок работы с иммуноферментными наборами (тестами) серии RIDASCREEN®FAST производства «R-Biopharm AG» (Германия) предназначенными для определения содержания аллергенов в твердых и жидких продуктах питания, пищевом сырье или в пробах из окружающей среды (например, пробы с поверхности оборудования пищевых производств, промывные воды и пр.).

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Аллерген может присутствовать в качестве ингредиента или загрязнения в сырых и приготовленных продуктах. В соответствии с Постановлением (ЕС) № 1169/2011 яйца и продукты из них должны быть указаны на этикетках продуктов питания. Аналогичные правила существуют, например, в США, Канаде, Австралии и Новой Зеландии. Яичный белок содержит 9 – 11 % белка. Четыре основных аллергенных белка составляют 80 % белков яичного белка. Этими основными аллергенами являются овомукоид (11 %), овальбумин (54 %), овотрансферрин (12 %) и лизоцим (3,5 %).

3. ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

Принцип иммуноферментного определения аллергенов основан на взаимодействии специфических антител с остатками аллергенов (антигенов), предположительно содержащихся в образце. Если образец содержит целевой антиген, в реакционной среде образуется комплекс антиген-антитело. Этот комплекс впоследствии обнаруживается с помощью иммуноферментного конъюгата. Визуализация результата анализа происходит после внесения в реакционную среду субстрат-хромогена. Интенсивность окраски раствора пропорциональна содержанию аллергена в образце.

4. КОМПЛЕКТАЦИЯ

Тесты выпускаются в комплектации, рассчитанной на проведение 48 определений (включая стандарты). Компоненты, входящие в состав наборов

Компонент	Цвет крышки	Формат	Количество/Объем
Микротитровальный планшет	-	Готов к использованию	1 шт/48 лунок
Буфер для экстракции аллергенов	Зеленый	Концентрат, x10	100 мл
Промывочный буфер	Коричневый	Концентрат, x10	100 мл
Конъюгат	Красный	Концентрат, x11	0,7 мл
Субстрат/Хромоген	Коричневый	-/-	10 мл
Стоп-раствор	Желтый	-/-	14 мл

Стандартные растворы, входящие в состав наборов

Артикул набора	Стандартные растворы (1,3 мл), готовые к использованию, мг/кг (ppm)				
	1	2	3	4	5
R6402	0	0,5	1,5	4,5	13,5

Примечание: фактор разбавления, полученный после пробоподготовки, уже учтен в концентрации стандартов. Таким образом, концентрации аллергенов в образцах можно непосредственно определить по стандартной кривой. Учтенный фактор разбавления 20.

5. НЕОБХОДИМОЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 Оборудование

- перчатки
- весы (диапазон измерения не менее 50 г и точность $\pm 0,01$ г)
- лабораторная мясорубка / кофемолка, ступка, ультратурракс или гомогенизатор
- центрифуга (не менее 2500 x g) + центрифужные пробирки (например, 50 мл - центрифужные пробирки от Greiner арт.)
- шейкер
- водяная баня (60 °C / 140 °F; диапазон колебаний см. в инструкции производителя водяной бани)
- фильтр (размер пор 8 - 12 мкм)
- градуированные пипетки Градуированный цилиндр Переменные микропипетки 20 - 200 мкл и 200 - 1000 мкл
- спектрофотометр для микротитровальных планшетов (450 нм)

Дополнительно: RIDASOFT® Win.NET (арт. Z9996FF)

При необходимости: дополнительный микротитровальный планшет (например, универсальный связывающий от Thermo Fisher Scientific арт. № 95029390 или с низким связыванием Greiner bio-one арт. № 655901)

При необходимости: 8-канальная пипетка на 100 мкл

5.2 Реагенты

- дистиллированная или деионизированная вода;
- при необходимости (для образцов, содержащих гвоздику, горчицу или сельдерей): Казеин (например, Sigma, арт. C5890).

При работе с наборами допускается использование оборудования, материалов и реактивов не уступающим по качеству и техническим характеристикам вышеперечисленным.

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРАМИ

Внимательно прочитайте инструкцию перед использованием. Используйте набор только для диагностики *in vitro*. Не используйте реагенты, если их упаковка повреждена. Набор

предназначен для тестирования в условиях лаборатории, персоналом, квалифицированным для проведения иммуноферментных методов. Работа проводится только в одноразовых перчатках, с использованием одноразовых наконечников для автоматических пипеток. В зонах, где проводится работа с образцами, запрещено курить, принимать пищу и питье. Стоп реагент содержит кислоту. Избегайте контакта стоп-реагента со слизистыми и кожей. При попадании стоп-реагента на кожу и слизистые смыть необходимо промыть пораженный участок большим количеством воды, при необходимости обратитесь к врачу.

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ НАБОРОВ

Хранить реагенты необходимо при температуре 2 – 8 °С. Недопустимо замораживать компоненты тест-системы. Не используемые стрипы должны храниться с осушителем в плотно закрытом фольгированном пакете при температуре 2 – 8 °С.

Раствор хромогена светочувствителен, поэтому при работе с ним следует избегать воздействия прямых солнечных лучей. По истечении срока годности, указанного на внешней этикетке теста, производитель не несет гарантии по качеству. Замена отдельных реагентов на реагенты из наборов других партий не допускается.

8. ПРИЗНАКИ РАСПАДА РЕАГЕНТОВ

Артикул	Реагент
R6402	Голубая окраска раствора красновато окрашенного субстрата/хромогена до внесения в лунки. Оптическая плотность меньше 1,2 ($E_{450nm} < 1,2$) для градуировочного раствора 5.

9. ПОДГОТОВКА ПРОБ

Рабочие инструменты, такие как мельница, стеклянные флаконы или шпатели, должны быть очищены перед и после каждой пробоподготовки, чтобы удалить остатки яйца и избежать загрязнения.

Концентрат буфера для экстракции аллергенов (10х). При кристаллизации концентрата буфера следует растворить кристаллы на водяной бане при 37°C. Необходимое количество буфера разбавить дистиллированной или деионизированной водой в пропорции 1:10 (1+9, напр., 100 мл концентрата + 900 мл дистиллированной воды). Разбавленный буфер для экстракции аллергенов (БЭА) стабилен при 20-25 °С в течение примерно четырех недель или 12 недель при 2-8° С.

9.1 Подготовка проб

Перед извлечением образца нагрейте БЭА до 60 °С.

- тщательно измельчить 50 г пробы и хорошо перемешать;

- взвесьте 1 г образца и добавьте 20 мл разбавленного БЭА (буфер уже должен иметь температуру примерно 60 °С);
- или добавьте 19 мл БЭА к 1 мл жидкого образца (буфер уже должен иметь температуру примерно 60 °С);
- интенсивно перемешайте и инкубируйте 10 мин при 60 °С, затем охладите в течение 3-5 мин в ледяной воде;
- центрифугировать 10 мин, при не менее 2500 g, если возможно, при 4 °С и / или отфильтровать экстракт (альтернативно 2 мл экстракта можно отцентрифугировать на высокой скорости в течение 10 минут, используя микроцентрифугу);
- перенесите супернатант в чистую пробирку;
- экстракты образцов (супернатант после центрифугирования или фильтрат) можно хранить до одного дня в хорошо закрытой пробирке при температуре 2 - 8 °С. Неиспользованные экстракты можно хранить при температуре -20 °С в течение нескольких месяцев.

Примечания:

1. При работе с образцами, содержащими пажитник, гвоздику, горчицу или сельдерей, а также при работе с образцами неизвестного состава добавьте 1 г казеина к 1 г или 1 мл образца, чтобы избежать побочных эффектов.

10. ВЫПОЛНЕНИЕ ТЕСТА

10.1 Подготовка к тесту

Перед работой набор необходимо подогреть до температуры (20-25)⁰С в течение 30 мин.

Перед началом и во время анализа надевайте перчатки. Аллергены, переносимые по воздуху, и грязное лабораторное оборудование могут привести к загрязнению проб. Также следует убедиться в том, что вода, используемая для приготовления реактивов, не контаминирована аллергенами.

Конъюгат антител (флакон с красной крышкой) в концентрированном виде (11х). Поскольку разбавленный препарат конъюгата имеет ограниченную стабильность, перед анализом следует разбавлять буфером только требуемое количество конъюгата. Перед разбавлением осторожно перемешайте конъюгат. Для приготовления рабочего раствора конъюгата необходимо разбавить концентрат дистиллированной водой в соотношении 1:11 (1+10) (например, 200 мкл концентрата конъюгата + 2 мл дистиллированной воды - достаточно для 2-х стрипов).

Концентрат моющего буфера (10х). Необходимое количество буфера разбавить дистиллированной водой в пропорции 1:10 (1+9) (напр., 100 мл концентрата + 900 мл дистиллированной воды). При кристаллизации буфера следует растворить кристаллы на водяной бане при 37°С. Раствор буфера хранить в течение 4 недель при 2-8°С.

10.2 Проведение теста

Тщательно соблюдайте рекомендованную процедуру промывки. Не допускайте высыхания микролунок между рабочими этапами.

Не используйте в анализе одновременно более 3 стрипов (24 лунки). В случае использования более трех стрипов, второй несенсибилизированный планшет (например, планшет Greiner bio-one, кат. № 655101 или Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) следует использовать в качестве дополнительного планшета, чтобы избежать потери времени. Все стандарты и образцы переносятся пипеткой в дополнительный планшет (не менее 150 мкл на лунку), а затем быстро переносятся на планшет для анализа с помощью 8-канальной пипетки.

Рекомендуется пипетировать конъюгат, субстрат/хромоген и стоп-раствор с помощью многоканальной или шаговой пипетки, чтобы избежать временного сдвига.

1. Вставьте достаточное количество лунок в держатель микролунок, чтобы все стандарты и образцы можно было анализировать в двух экземплярах. Запишите позиции стандарта и образца.
2. Добавьте 100 мкл каждого стандарта или подготовленного образца в отдельные лунки-дубликаты и инкубируйте в течение 10 минут при комнатной температуре (20-25 ° C).
3. Вылейте жидкость из лунок и энергично постучите перевернутым планшетом (три раза подряд) по впитывающей бумаге, чтобы обеспечить полное удаление жидкости из лунок. Заполните все лунки 250 мкл разбавленного промывочного буфера и снова слейте жидкость. Повторите еще эту процедуру еще два раза.
4. Добавьте по 100 мкл разведенного конъюгата в каждую лунку. Осторожно перемешайте, встряхивая планшет вручную, и инкубируйте 10 мин при комнатной температуре (20-25 ° C).
5. Вылейте жидкость из лунок и энергично постучите перевернутым планшетом (три раза подряд) по впитывающей бумаге, чтобы обеспечить полное удаление жидкости из лунок. Заполните все лунки 250 мкл разбавленного промывочного буфера (см. 10.1.) и снова слейте жидкость. Повторите еще эту процедуру еще два раза.
6. Добавьте 100 мкл субстрата/хромогена в каждую лунку. Осторожно перемешайте, встряхивая планшет вручную, и инкубируйте в течение 10 мин при комнатной температуре (20–25 °C) в темноте.
7. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку. Осторожно перемешайте, встряхивая планшет вручную, и измерьте оптическую плотность при 450 нм. Оцените результат в течение 10 минут после добавления стоп-раствора.

11. РЕГИСТРАЦИЯ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТА

Специальное программное обеспечение RIDA®SOFT Win /RIDA®SOFT Win.net (ст. Nr. Z9996), доступно для оценки ИФА Ридаскрин. Расчет должен выполняться с использованием функции кубического сплайна. Стандартная кривая продемонстрирована в сертификате качества, прилагаемого к набору.

По сравнению с сертификатом более высокие значения оптической плотности для калибровочной кривой, особенно для нулевого стандарта, могут быть результатом недостаточной промывки или загрязнения лизоцимом.

Дальнейшее разбавление и новое определение оптической плотности в образцах рекомендуется при оптической плотности меньше 5 стандарта.

Примечания:

Пожалуйста, обратите внимание:

Фактор разбавления, полученный после пробоподготовки, уже учтен в концентрации стандартов. Таким образом, концентрации аллергенов в образцах можно непосредственно определить по стандартной кривой. Учтенный фактор разбавления 20.

При дополнительном разведении проб для расчета концентрации аллергена необходимо учитывать фактор дополнительного разведения. С примерами расчетов содержания отдельных аллергенов можно ознакомиться в инструкциях к соответствующим наборам, предоставляемых дистрибьютором R-Biopharm.

Пробы с оптической плотностью ($E_{450\text{ нм}}$) > градуировочный раствор 5 необходимо развести и провести повторный анализ. Разведение проб следует осуществлять таким образом, чтобы их значение можно было определить по линейной части графика. Концентрация аллергена, определенная по градуировочной кривой, должна быть умножена на соответствующий фактор разведения.

12. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Тест откалиброван по эталонному материалу NIST 8445 (цельный яичный порошок). Результат выражается в мг/кг яичного порошка. Стандартный образец 8445 содержит 48% +/- 1% общего белка. Если результат умножить на 0,49, то результат можно выразить как мг/кг (ppm) общего белка. Если результат умножить на 0,263, получится белок яичного белка мг/кг (ppm).

Результаты между LOD и LOQ указывают на низкую концентрацию аллергена в образце. Рассчитанные результаты показывают высокую неопределенность в этой области из-за высокой вариабельности метода ниже LOQ. Поэтому о таких результатах следует сообщать не количественное значение, а качественное - "< LOQ". Результат ниже LOD не исключает

загрязнения аллергеном ниже предела обнаружения анализа, или того, что в образце могут присутствовать другие компоненты аллергена, например, липиды. Результат должен быть представлен соответствующим образом. При значениях абсорбции ($A_{450 \text{ нм}}$) > стандарта 5 рекомендуется дальнейшее разведение и новое определение образцов. В случае дополнительного разведения при расчете концентрации аллергена необходимо учитывать дополнительный коэффициент разведения. По сравнению с сертификатом, более высокие значения абсорбции ($A_{450 \text{ нм}}$) для стандартной кривой, особенно для нулевого стандарта, могут быть результатом недостаточной промывки или загрязнения аллергеном.

Пример расчета. По стандартной кривой считывают 10 мг/кг цельного яичного порошка. Если умножить на 0,49, получится 4,9 мг/кг (ppm) цельного яичного белка. Если умножить на 0,263, получится 2,63 мг/кг (частей на миллион) яичного белка.

13. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Результаты тестирования могут отличаться в зависимости от матрицы образца, фактической процедуры тестирования и лабораторных условий. Пределы обнаружения и количественного определения зависят от соответствующей матрицы образца, степени обработки и метода экстракции. Неправильный вес анализируемого образца влияет на результат измерения (например, при взвешивании +10% измеряется концентрация на 10% выше). Достаточная точность обеспечивается при колебаниях не более $\pm 1\%$. Кроме того, данные по отдельным продуктам питания могут быть получены в результате сравнительных лабораторных испытаний и межлабораторных сравнений. Для настоящего ИФА из-за большого количества продуктов можно было валидировать только отдельные, образцовые продукты из различных категорий. При анализе не валидированной матрицы рекомендуется проверить полученные результаты с помощью экспериментов со спайками. При необходимости необходимо провести валидацию интересующей матрицы образца. Из-за множества типов продуктов питания нельзя исключить влияние матрицы. Они могут привести к ложноположительным / повышенным результатам, а также снизить или подавить реакцию. Такие матричные эффекты не зависят от специфичности антитела, используемого в тесте, и могут быть выявлены в ходе экспериментов с проливом. Добавление чужеродного белка (в зависимости от теста, например, BSA, желатина, сухого обезжиренного молока) во время экстракции или процедуры тестирования может подавить матричные эффекты.

В обработанных продуктах питания (например, при термической обработке, обезвоживании и т.д.) белки могут быть изменены или фрагментированы, что может повлиять на восстановление и результаты анализа. Перекрестные реакции – это побочные реакции антител, используемых для приготовления тест-набора, с антигеном, имеющим схожие эпитопы с исследуемым анализом. Они проявляются особенно при использовании антигенов

близкородственных видов. В отличие от матричных эффектов, это специфическая реакция антигена с антителом. Структуры антигена подвержены тем же воздействиям (например, нагреванию или высушиванию), что и реальный аналит. Поэтому перекрестная реактивность может также появляться после обработки пищевых продуктов в единичных случаях или пропадать. Для оценки перекрестной реактивности был проанализирован только один репрезентативный образец, другие образцы могут показать другой результат. Образцы, содержащие яйца, которые были подвергнуты термической обработке, показывают пониженное извлечение, поскольку белки денатурируют и больше не распознаются антителом, используемым в ИФА RIDASCREEN®FAST Ei/Egg Protein (арт. R6402). Извлечение сильно зависит от температуры и продолжительности термообработки. Если образцы подвергаются термообработке при высоких температурах, извлечение может значительно снизиться. Для термообработанных образцов мы рекомендуем использовать RIDASCREEN® Egg (арт. R6411).

14. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

Для обеспечения высокой аналитической производительности мы рекомендуем:

- для соблюдения общих требований по обеспечению качества выполняйте определение в дублях;
- перед пипетированием предварительно промойте наконечники пипеток стандартом или экстрактом образца.
- используйте контрольные тесты для контроля качества и обеспечения точной и правильной процедуры тестирования. Следует использовать образцы без яичного белка и содержащие белок яйца.
- в случае чрезвычайно кислых или основных образцов может потребоваться корректировка значения pH образца (pH 6,5 - 7,5) до нейтрального перед экстракцией.
- при использовании автоматов (например, ThunderBolt®) обращаться по адресу sales@r-biopharm.de.



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