



RIDASCREEN® FAST Лизоцим

Арт. No. R6452

Иммуноферментный анализ для количественного
определения лизоцима

Анализ *in vitro*

Хранить при 2-8°C

Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

**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



**Официальный дистрибьютор
в Беларуси:**

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



RIDA® и RIDASCREEN®

являются зарегистрированными торговыми марками R-Biopharm AG.

Производитель: R-Biopharm AG, Дармштадт, Германия

R-Biopharm AG имеет сертификат ISO 9001.

RIDA® and RIDASCREEN®

are registered trademarks of R-Biopharm AG

Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

RIDASCREEN® FAST Лизоцим

Описание

RIDASCREEN® FAST Lysozym (арт. №: R6452) – это иммуноферментный анализ для количественного определения лизоцима (белка куриного яйца) в таких продуктах питания, как вино, сыр и колбаса.

Все реагенты, необходимые для иммуноферментного анализа – в том числе стандарты – содержится в наборе.

Набора достаточно для 48 определений (включая стандарты).

Для количественного определения необходим спектрофотометр для микропланшета.



Пробоподготовка:	гомогенизация, экстракция и центрифугирование
Время выполнения:	подготовка образца (для 10 образцов).....ок. 15 мин выполнение теста (время инкубации).....30 мин
Предел обнаружения: (соответствует стандартному веществу)	Вино.....0,006 мг/кг (ppm) лизоцима Сыр, колбаса.....0,016 мг/кг (ppm) лизоцима
Предел количественного определения:	Вино.....0,05 мг/кг (ppm) лизоцима Сыр, колбаса.....0,25 мг/кг (ppm) лизоцима
Специфичность:	антитела, входящие в состав набора, специфически обнаруживают лизоцим куриного яйца

Перекрестная реактивность использованных антител была определена для чистой пищи (например, кукурузной муки). В готовых/обработанных пищевых продуктах (например, кукурузном хлебе) перекрестная реактивность может быть другой. Мешающие вещества (например, полифенолы) могут быть обнаружены с помощью экспериментов с контаминированными образцами.

Сопутствующие продукты

bioavid Lateral Ei / Egg (BL608-10)

Для повышения качества оценки при выполнении процедур ИФА мы дополнительно ссылаемся на наше Руководство по надлежащей практике ИФА (GEP) в соответствующей версии. В них перечислены минимальные стандарты, касающиеся базовых условий при использовании тест-наборов R-Biopharm AG и проведении ИФА-анализа. Руководство можно найти, распечатать и загрузить с веб-сайта официального дистрибьютора:

ООО «Неотест», РФ	https://neo-test.ru/wp-content/uploads/2021/10/prakticheskoe-rukovodstvo-ifa-rus.pdf	
ОДО «КомПродСервис», РБ	https://komprod.com/wp-content/uploads/2021/10/prakticheskoe-rukovodstvo-ifa-rus.pdf	

1. Применение

RIDASCREEN® FAST Lysozym (арт. №: R6452) - это иммуноферментный анализ для количественного анализа лизоцима (белка куриного яйца) в таких продуктах питания, как вино, сыр и колбаса.

2. Общая информация

Аллерген может присутствовать в качестве ингредиента или загрязнения сырых и приготовленных продуктов. Согласно Постановлению (ЕС) № 1169/2011, яйца и продукты из них должны быть указаны на этикетках пищевых продуктов. Подобные правила существуют, например, в США, Канаде, Австралии и Новой Зеландии.

Лизоцим, благодаря своему бактериостатическому эффекту, используется для консервирования при производстве вина, а также в сырах и колбасных изделиях (E1105). Это один из аллергенных белков, который содержится в белке яйца до 3,5%.

3. Принцип метода

Лунки микротитровальных полосок покрыты специфическими антителами к лизоциму. При добавлении стандартов и образцов в лунки лизоцим будет связываться со специфическими антителами. На этапе промывки несвязанные компоненты удаляются. Затем добавляют антитело, конъюгированное с пероксидазой. Конъюгат связывается с комплексом Ab-Ag, образуя комплекс антитело-антиген-антитело (сэндвич). Затем несвязанный конъюгат удаляют на стадии промывки. Обнаружение лизоцима происходит путем добавления субстрата/хромогена. Конъюгат фермента превращает хромоген в голубой продукт. Добавление стоп-раствора приводит к изменению цвета с синего на желтый. Измерение производится фотометрически на длине волны 450 нм.

Поглощение пропорционально концентрации лизоцима в образце. Результат выражается в мг/кг лизоцима.

4. Предоставляемые реагенты

Каждый набор содержит достаточно материалов для 48 измерений (включая стандартны).

Компонент	Цвет крышки	Формат		Объём
Микротитровальный планшет	-	Готов к использованию		48 лунок
Буфер для экстракции аллергенов	Зелёный	Концентрат	10х	100 мл
Стандарт 1*	Прозрачный	Готов к использованию	0 мкг/кг	1,3 мл
Стандарт 2*	Прозрачный	Готов к использованию	0,05 мкг/кг	1,3 мл
Стандарт 3*	Прозрачный	Готов к использованию	0,1 мкг/кг	1,3 мл
Стандарт 4*	Прозрачный	Готов к использованию	0,2 мкг/кг	1,3 мл
Стандарт 5*	Прозрачный	Готов к использованию	0,4 мкг/кг	1,3 мл
Промывочный буфер	Коричневый	Концентрат	10х	100 мл
Конъюгат	Красный	Готов к использованию		6 мл
Субстрат/Хромоген Red Chromogen Pro	Коричневый	Готов к использованию		10 мл
Стоп-реагент	Жёлтый	Готов к использованию		14 мл

*) фактор разбавления 20, полученный после пробоподготовки вина, уже учтен для стандартов. Таким образом, концентрации лизоцима в образцах вина можно непосредственно определить по стандартной кривой.

В случае сыра и колбасы получается коэффициент разбавления 100. Следовательно, концентрацию, полученную по стандартной кривой, необходимо дополнительно умножить на коэффициент 5.

5. Необходимые, но не предоставленные материалы

5.1. Оборудование:

- микротитровальный планшет-спектрофотометр (450 нм)
- центрифуга + центробежные флаконы
- водяная баня (60 °C / 140 °F)
- рифленый бумажный фильтр
- микропипетки на 20 – 200 мкл и 200 – 1000 мкл

5.2. Реагенты:

- дистиллированная или деионизованная вода

6. Меры предосторожности для пользователей

Тест должен проводиться только обученными сотрудниками лаборатории. Необходимо строго соблюдать инструкцию по применению.

Набор может содержать опасные вещества. Сведения об опасности содержащихся в наборе веществ см. в соответствующих паспортах безопасности материалов (MSDS) для этого продукта, доступных на сайте www.r-biopharm.com.

7. Инструкции по хранению

Храните набор при температуре 2–8°C (35–46°F). Не замораживайте компоненты набора.

Верните неиспользованные микролунки в их оригинальный пакет из фольги, снова запечатайте их вместе с прилагаемым влагопоглотителем и храните при температуре 2–8°C (35–46° F).

Субстрат/хромоген чувствителен к свету, поэтому избегайте воздействия прямого света.

После истечения срока годности, указанного на этикетке набора, гарантия качества не принимается.

Не меняйте местами отдельные реагенты наборами с разными номерами лотов.

8. Признаки непригодности реагентов

- Окрашивание красноватого раствора субстрата/хромогена в голубой цвет ещё до проведения тестирования

- Значение оптической плотности в лунке с нулевым стандартом ниже 0,8 ($A_{450 \text{ нм}} < 0,8$) для стандарта 5.

9. Подготовка образцов

Рабочие устройства, такие как мельница, стеклянные флаконы или шпатели, необходимо очищать до и после каждой пробоподготовки, чтобы удалить любые остатки лизоцима и избежать загрязнения.

Буфер для Экстракции аллергена поставляется в виде 10-кратного концентрата. Перед разбавлением буферного концентрата полностью растворите кристаллы на водяной бане при 37° C (99 °F) и хорошо перемешайте. После этого разведите нагретый буферный концентрат 1:10 (1+9) дистиллированной водой перед использованием (например, 100 мл буферного концентрата + 900 мл дистиллированной воды). Разбавленный буфер стабилен при 20-25 ° C (68-77 ° F) в течение четырех недель.

Для экстракции образцов сыра и колбас требуется отдельный буфер для экстракции аллергенов с высоким содержанием соли. Для этого 10 г NaCl

добавляют к 100 мл буфера для экстракции аллергенов. Разбавленный буфер стабилен при температуре 20-25 °C (68-77 °F) в течение четырех недель.

Репрезентативное количество пробы (5-50 г) необходимо гомогенизировать.

9.1. Сыр и колбаса

- добавить 1 г репрезентативной гомогенной пробы в 20 мл высокосолевого буфера для экстракции аллергенов (предварительно нагретого до 60 °C/ 140°F) и перемешать

- инкубируйте образцы в течение 10 минут при 60 °C (140 °F) на водяной бане

- охладить образцы до комнатной температуры (20-25 °C/68-77 °F) (например, в ледяной бане) – центрифугировать: 10 мин, не менее 2500 g, если возможно, при 4 °C (39,2 °F) и / или отфильтровать экстракт (альтернативно 2 мл экстракта можно центрифугировать с высокой скоростью в течение 10 мин в реакционных колпачках с помощью микроцентрифуги)

- разбавить супернатант 1:5 (1+4) окончательно разбавленным буфером для экстракции аллергенов (без добавления соли)

(Примечание: используйте разбавленный супернатант непосредственно или в течение 2 часов в тесте)

- используйте в тесте 100 мкл разбавленного супернатанта на лунку

Если необходимы дальнейшие разведения, их следует проводить со смесью буфера для экстракции аллергена/буфера для экстракции аллергена с высоким содержанием соли в соотношении 5:1 (4 мл+1 мл).

9.2. Вино

- добавить 1 мл репрезентативной однородной пробы к 19 мл буфера для экстракции (предварительно нагретого до 60 °C/140 °F) и перемешайте

- инкубируйте образцы в течение 10 минут при 60 °C (140 °F) на водяной бане

- охладить образцы до комнатной температуры (20-25 °C/68-77 °F) (например, на ледяной бане), центрифугируйте образцы: 10 мин, не менее 2500 g, если возможно, при 4 °C (39,2 °F) и/или отфильтровать экстракт (альтернативно 2 мл экстракта можно центрифугировать с высокой скоростью в течение 10 мин в реакционных колпачках с помощью микроцентрифуги)

- используйте в тесте 100 мкл супернатанта на лунку

Чтобы получить нижний предел количественного определения, выполните разбавление 1:10 вместо разбавления 1:20. К 1 мл образца вина добавьте 9 мл буфера для экстракции аллергенов. В RIDA®SOFT Win необходимо учитывать коэффициент разбавления 0,5 (вместо 1).

При использовании вина с высоким содержанием полифенолов (например, красное вино) добавьте 0,25% казеина (например, SIGMA, C5890)

или 0,25% желатина (например, SIGMA, G-6144) в разбавленный буфер для экстракции аллергенов. Добавьте, например, 0,25 г казеина или желатина в 100 мл окончательно разведенного буфера для экстракции аллергенов и перемешивайте в течение 10 минут. Добавить 19 мл разбавленного буфера для экстракции аллергенов с добавкой к 1 мл вина и выдержать 10 мин при 60 °С.

Экстракты образцов можно хранить при температуре 2–8 С (35–46 F) в течение 3 дней или при -20 С (-4 F) в течение нескольких месяцев.

9.3. Белое и красное вино – экстракция при комнатной температуре

Данную экстракцию лизоцима из белого и красного вина при комнатной температуре (20–25 °С (68–77 °F)) можно применять как для 0,05 мг/кг, так и для «нижнего» предела обнаружения с добавлением меньшего количества буфера для экстракции аллергенов (АЕВ), см. указания по применению «Более чувствительный анализ аллергенов в вине».

Дополнительные реагенты, необходимые для этой процедуры:

- Казеин (например, Sigma-Aldrich, арт. № C5890) для экстракции красного вина.

Процедура:

- Белое вино: перенесите 1 мл репрезентативного однородного образца в новый флакон и добавьте 19 мл готового к использованию АЕВ.

- Красное вино: перенесите 1 мл репрезентативного однородного образца в новый флакон и добавьте 19 мл готового к употреблению АЕВ с казеином (добавьте 0,25 г казеина к 100 мл АЕВ).

- Энергично перемешайте (например, вортексером).

- Экстрагируйте в течение 10 мин при комнатной температуре 20–25 °С (68–77 °F) встряхиванием.

- Центрифугируйте в течение 10 мин при ускорении не менее 2500 g или отфильтруйте.

- Анализируйте экстракт (супернатант стадии центрифугирования или фильтрат) в соответствии с главой 10 данной инструкции по применению.

10. Проведение теста

10.1. Подготовка к тестированию

Перед использованием доведите все реагенты до комнатной температуры (20–25 С / 68–77 F).

Промывочный буфер предоставляется в виде концентрата (10-х). Перед разбавлением растворите образовавшиеся кристаллы, инкубируя буфер на водяной бане при 37 С (99 F). Перед использованием буфер необходимо разбавить 1:10 (1+9) дистиллированной водой (т.е. 100 мл концентрата буфера + 900 мл дистиллированной воды). Разбавленный буфер для промывки стабилен при 20–25 С (68–77 F) в течение четырех недель.

10.2. Выполнение 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 / 68-77 ° F).

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 (см. 10.1.) И снова слейте жидкость. Повторите еще эту процедуру трижды.

4. Добавьте по 100 мкл конъюгата в каждую лунку. Осторожно перемешайте, встряхивая планшет вручную, и инкубируйте 10 мин при комнатной температуре (20-25 ° C / 68-77 ° F).



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 трижды.

6. Добавьте 100 мкл красноватого субстрата/хромогена в каждую лунку. Осторожно перемешайте, встряхивая планшет вручную, и инкубируйте в течение 10 мин при комнатной температуре (20–25 °C/68–77 °F) 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. Результаты

Специальное программное обеспечение RIDA®SOFT Win /RIDA®SOFT Win.net (ст. №. Z9996), доступно для оценки ИФА Ридаскрин. Расчет должен выполняться с использованием функции кубического сплайна. Стандартная кривая продемонстрирована в сертификате качества, прилагаемого к набору. Программное обеспечение RIDA ® SOFT Win и инструкцию к нему Вы можете бесплатно скачать на сайте официальных дистрибьюторов:

ООО «Неотест», Россия	https://neo-test.ru/programmnoe-obespechenie/	
ОДО «КомПродСервис», Беларусь	https://komprod.com/programmnoe-obespechenie/	

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.

Пожалуйста, обратите внимание:

При работе в соответствии с правилами, установленными для вина, коэффициент разбавления равен 20. Концентрацию аллергена можно определить непосредственно по стандартной кривой - коэффициент разбавления образца 20 уже учтен для стандартных концентраций (см. 4. *).

При разведении проб более 1:20 (пробоподготовка сыра и колбасы) для расчета концентрации лизоцима необходимо учитывать фактор дальнейшего разведения. В случае сыра и колбасных изделий дополнительный коэффициент равен 5.

Общие замечания:

Образцы, получившие отрицательный результат, могут содержать контаминацию аллергенами ниже предела обнаружения анализа, или они могут содержать другие компоненты аллергена, такие как, например, липиды.

Из-за множества видов пищи нельзя исключить матричный эффект. В обработанной пище белки могут быть изменены или фрагментированы, что может повлиять на извлечение лизоцима.

Рекомендация:

Для обеспечения высокой аналитической производительности мы рекомендуем:

- анализировать каждый образец в дубле
- использовать чистые образцы без аллергенов и образцы содержащие (с добавками) аллергены в качестве контрольных образцов
- в случае очень кислых или щелочных образцов pH следует довести до нейтрального
- проводить эксперименты с добавками для соблюдения точной и правильной процедуры анализа
- для получения подробной информации об использовании ChemWell® или GEMINI automation свяжитесь с R-Biopharm AG.

Данные соответствуют нашему нынешнему состоянию технологий и предоставляют информацию о наших продуктах и их использовании. R-Biopharm не дает никаких гарантий, явных или подразумеваемых, за исключением того, что материалы, из которых изготовлены ее продукты, имеют стандартное качество. Дефектные продукты будут заменены. Нет никаких гарантий товарной пригодности этого продукта или пригодности продукта для каких-либо целей. R-Биофарм не несет ответственности за любой ущерб, в том числе фактический или косвенный ущерб, или расходы, возникшие прямо или косвенно от использования этого продукта.