НАБОР РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИАДИНА В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
«ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин»
Инструкция по применению

РАЗРАБОТАНО

Институт биоорганической химии НАН Беларуси

ОДО "КомПродСервис"

Официальный дистрибьютор
ОДО "КомПродСервис"
ул. Филимонова, 25 "Г"
220114, Минск
+375 (17) 336-50-54
+7 (499) 704-05-50
www.komprod.com
info@komprod.com

КомПродСервис

Введение

Глютен (клейковина) – собирательный термин, используемый для обозначения белков эндосперма зерен злаков. Глютен включает две фракции: белки, растворимые в кислотах и щелочах (глютелины) и белки, растворимые в этаноле (проламины). Спирторастворимая фракция глютена включает глиадины пшеницы и родственные белки ржи (секалины) и ячменя (гордеины).

Целиакия ─ непереносимость глютена, приводящая к повреждению тонкого кишечника. Единственным способом лечения целиакии сегодня является строгое соблюдение безглютеновой диеты. В этой связи необходимы методы определение концентрации глютена в продуктах питания, заявленных как не содержащие глютен. Согласно Кодексу алиментариус (CODEX STAN 118/1979), безглютеновыми являются продукты, содержание глютена в которых не превышает 20 мг/кг. Продукты, обозначенные как продукты с очень низким содержанием глютена, могут содержать этот белок в диапазоне концентраций (20–100) мг/кг.

Современные технологии производства мясных, кисломолочных и других продуктов часто используют пшеничную клейковину в качестве стабилизатора и загустителя. В этой связи необходим контроль продуктов, присутствие глютена в которых является неочевидным и носит технологический характер. Эта группа продуктов включает колбасные изделия, консервы из мяса и рыбы, молоко, молочные коктейли, жидкие молочные каши, мороженое, кисломолочные продукты и соки, конфеты и т.п. Не исключено также присутствие контаминаций в основных заменителях пшеничной и ржаной муки – рисовой, кукурузной, гречневой, которые могут возникать в процессе сбора, транспортировки и хранения. Ряд продуктов (например, специи, кофе, чай) могут содержать глютен из-за недобросовестности производителя.

Данный набор предназначен для количественного определения глиадина в продуктах питания. Концентрация глютена рассчитывается на основании данных о том, что глиадин составляет 50% общего глютена.

1 Краткая характеристика набора

Подготовка проб	Механическая гомогенизация, химическая гомогенизация, экстракция
Затраты времени	Пробоподготовка (на 10 проб) ─ приблизительно 2,5 ч Общая продолжительность анализа – 2 ч, в том числе время инкубации ─ 1 ч первая стадия, 15 мин вторая стадия
Предел обнаружения	0,5 мг/кг глиадина, что соответствует 1 мг/кг глютена
Предел количественного определения	2,5 мг/кг глиадина, что соответствует 5 мг/кг глютена
Специфичность	Используемые моноклональные антитела распознают глиадин пшеницы и родственные белки ржи и ячменя.

2 Назначение

Набор предназначен для количественного определения концентрации глютена в продуктах питания методом иммуноферментного анализа (ИФА). Набор рассчитан на 96 определений и обеспечивает анализ в дубликатах 42 неизвестных проб и 6 калибровочных проб при использовании всех стрипов одновременно. Набор может быть разделен на 2 или 3 независимые части с различным количеством определяемых проб.

3 Принцип работы

3.1 Набор «ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин» представляет собой иммуноферментную систему сэндвич-типа, основанную на одновременном взаимодействии глиадина с двумя специфическими антителами. Анализ включает две стадии.

3.2 Лунки пластмассового микропланшета покрыты специфическими антителами к первому эпитопу глиадина («нижние антитела»). На первой стадии анализа в лунки вносят исследуемые и калибровочные пробы. В ходе инкубации глиадины, находящиеся в составе указанных выше проб, образуют иммунный комплекс с «нижними антителами». Все не вступившие в иммунохимическую реакцию вещества удаляются промывкой лунок специальным буферным раствором.

3.3 На второй стадии анализа в лунки вносят антитела к второму эпитопу глиадина, меченые ферментом пероксидазой («верхние антитела»). В результате инкубации на твердой фазе образуется трехкомпонентный комплекс, содержащий «сэндвич» из антигена и двух антител.

3.4 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.

3.5 Стоп-реагент инактивирует пероксидазу и меняет цвет раствора в лунке с синего на желтый. Интенсивность окрашивания раствора в лунках, прямо пропорциональная количеству антигена в образце, измеряется фотометрией при 450 нм.

4 Специфичность анализа

Используемые моноклональные антитела распознают фракцию глиадина в пшенице и родственные белки ржи и ячменя.

5 Меры предосторожности при работе с набором

5.1 Компоненты набора, за исключением коктейля для химической гомогенизации образцов и хромогена, являются нетоксичными.

5.2 При работе с набором следует соблюдать правила работы с токсичными веществами.

5.3 Стоп-раствор содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

6 Состав набора

В состав набора входят компоненты, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Состав набора реагентов

Компонент	Характеристика	Подготовка
1 Микропланшетный иммуносорбент, покрытый антителами к глиадину	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок, 3 упаковки по 4 стрипа	Готов к использованию
2 Калибровочные пробы, 25-кратные концентраты, C_1, C_2, C_3, C_4, C_5 и C_6 с концентрациями глиадина 0; 5; 10; 20; 40 и 80 нг/мл (ppb)	3 серии по 6 флаконов, 40 мкл в каждом	Развести в 25 раз ИФА-буфером непосредственно перед использованием. После разведения хранению не подлежат.
3 Конъюгат (антитело к глиадину, меченое пероксидазой), 61-кратный концентрат	1 флакон, 250 мкл	Развести в 61 раз раствором для разведения конъюгата непосредственно перед использованием. После разведения хранению не подлежит.
4 Раствор для разведения экстрактов и калибровочных проб (25-кратных концентратов) (ИФА-буфер)	1 флакон, 100 мл	Готов к использованию
5 Раствор для разведения концентрата конъюгата	1 флакон, 16 мл	Готов к использованию
6 Коктейль для химической гомогенизации образцов	1 флакон, 100 мл	Готов к использованию
7 Промывочный раствор, 10-кратный концентрат	1 флакон, 55 мл	Развести в 10 раз дистиллированной водой перед использованием. После разведения можно хранить 2 недели при 4 – 8 ºС.
8 Хромоген	1 флакон,0,7 мл	Непосредственно перед использованием смешать хромоген и субстратный раствор в пропорции 1 : 20
9 Субстратный раствор	1 флакон, 14 мл	Непосредственно перед использованием смешать хромоген и субстратный раствор в пропорции 1:20
10 Стоп-реагент	1 флакон, 14 мл	Готов к использованию
11 Пленка для заклеивания планшета	2 штуки	Готова к использованию
12 Паспорт контроля качества «ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин»		

Примечания:

1. Раствор для разведения экстрактов и калибровочных проб (25-кратных концентратов) (компонент 4) может быть расфасован в 2 флакона по (50±0,5) мл;

3. Концентрат промывочного раствора (компонент 7) может быть расфасован в 2 флакона по (25±0,5) мл;

4. Хромоген и субстратный раствор могут поставляться в одном флаконе – хромоген-субстратный раствор, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию.

7 Реактивы и материалы, не включенные в набор, но необходимые для проведения анализа

7.1 Дистиллированная вода.

7.2 Этиловый спирт 80%. В случае наличия этилового спирта 96% предварительно развести его водой в 1,2 раза. Например, поместить в цилиндр вместимостью 100 мл 83 мл 96% этилового спирта, добавить дистиллированную воду до отметки 100 мл. Перелить в стакан вместимостью 100 мл, перемешать с использованием магнитной мешалки.

7.3 Бумага фильтровальная.

7.4. Перчатки одноразовые.

8 Оборудование и посуда, необходимые для пробоподготовки и проведения анализа

8.1 Пробоподготовка

- весы лабораторные, позволяющие взвешивать от 0,05 г до 50 г;
- устройство для механической гомогенизации образцов (гомогенизатор, мельница, блендер и т.п.);
- ротатор для перемешивания пробирок Thermo Fisher Scientific или другой прибор аналогичного назначения с тем же принципом работы;
- термостат, поддерживающий температуру 50±5 ºС и позволяющий установить указанный выше ротатор;
- центрифуга, позволяющая центрифугировать пробы при 2000 g;
- пробирки для центрифуги вместимостью не менее 15 мл с герметично закрывающимися пробками;
- цилиндр мерный на 100 мл (1 шт);
- пипетка полуавтоматическая одноканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объем жидкости 1 мл;
- флаконы или пробирки с герметично закрывающими пробками вместимостью не менее 1 мл для хранения экстрактов;
- перчатки одноразовые, резиновые или пластиковые.

8.2 Проведение анализа

- Фотометр для микропланшетов, способный проводить измерения при длине волны 450 нм в диапазоне от 0 до 3,0 единиц оптической плотности (ОП);
- магнитная мешалка типа ММ-5;
- вихревой смеситель типа «Vortex»;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости (0,02–0,2) мл и (0,2–1) мл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости (0,1–0,25) мл;
- кюветы для дозирования жидких реагентов при использовании многоканальной пипетки – 3 штуки;
- цилиндры мерные вместимостью 10 мл и 0,2 л (для промывки планшета в ручном режиме);
- цилиндры мерные вместимостью 50 мл, 0,5 л и 1 л (для промывки планшета в автоматическом режиме);

- цилиндр мерный вместимостью (15–20) мл (для разведения концентрата конъюгата);
- стакан химический мерный вместимостью 1000 мл (1 шт.) (для промывки планшета в автоматическом режиме);
- стакан стеклянный вместимостью 200 мл (1 шт.) (для промывки планшета в ручном режиме);
- флакон из стекла или пластмассы вместимостью 15 мл с завинчивающейся крышкой (для хранения рабочего раствора конъюгата в ходе анализа);
- пробирки пластиковые одноразовые;
- штатив для пробирок;
- бумага фильтровальная;
- вода дистиллированная,
- перчатки одноразовые, резиновые или пластиковые.

9 Проведение анализа

9.1 Важные замечания по хранению реагентов и выполнению анализа

9.1.1 Запечатанный набор можно хранить 12 месяцев при (2–8) ºС. По истечении срока годности набора производитель не несет гарантии по качеству.

9.1.2 Ни в коем случае нельзя замораживать набор и его компоненты.

9.1.3 Промывочный раствор, подготовленный к анализу разведением в 10 раз дистиллированной водой, можно хранить 2 недели при (2–8) ºС. В случае помутнения раствора следует считать его непригодным к использованию.

9.1.4 Конъюгат, подготовленный к анализу (разведенный в 61 раз раствором для разведения концентрата конъюгата), хранению не подлежит и должен быть использован в течение не более 1 ч.

9.1.5 Калибровочные пробы, подготовленные к анализу (разведенные в 25 раз ИФА-буфером), хранению не подлежат и должны быть использованы в течение не более одного рабочего дня.

9.1.5 Нельзя использовать в одном анализе компоненты наборов «ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин» разных серий.

9.1.6 Нельзя использовать в анализе компоненты из других наборов, включая промывочный раствор из набора, предназначенного для определения другого аналита.

9.1.7 Следует ставить в анализ столько калибровочных проб, сколько предусмотрено инструкцией к набору. Произвольное уменьшение их количества искажает вид калибровочной кривой.

9.1.8 Микропланшетный иммуносорбент поставляется в виде трех упаковок по 4 стрипа; в одной из упаковок находится рамка. В первую очередь следует вскрывать упаковку, содержащую рамку, и в дальнейшем использовать рамку для установки стрипов из двух других упаковок. После вскрытия упаковки стрипы хранению не подлежат и должны быть использованы в тот же день.

9.1.9 Во время первой и второй стадии анализа заклеивайте рамку со стрипами пленкой для заклеивания планшета или закрывайте крышкой. Не допускайте пересыхания лунок в период между стадиями анализа.

9.1.10 Все исследуемые пробы и калибровочные пробы необходимо ставить в двух параллелях.

9.1.11 После использования каждого реагента немедленно закрывайте крышку флакона или пробирки. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

9.1.12 Реакция взаимодействия антигена с антителом начинается в тот момент, когда в лунку попадает первая калибровочная проба или образец. В этой связи заполняйте лунки планшета аккуратно, но как можно быстрее для уменьшения влияния на результаты анализа разницы в длительности инкубации между первой и последней заполненными лунками. В связи с малой продолжительностью второй стадии анализа вносите в лунки планшета концентрат конъюгата, предварительно разбавленный буфером для разведения концентрата конъюгата, только с использованием многоканальной полуавтоматической пипетки.

9.1.13 Промывка планшета может проводиться как вручную, так и с использованием автоматических устройств. Вносите не менее 250 мкл промывочного раствора в лунку при каждой промывке. Задержка при промывке («замачивание») не требуется. Нельзя уменьшать указанное в инструкции число стадий промывки. После окончания ручной промывки постучите перевернутым кверху дном планшетом по фильтровальной бумаге для удаления остатков промывочного раствора из лунок. Не используйте фильтровальную бумагу многократно.

9.1.14 Хромоген и субстратный раствор смешиваются в пропорции 1:20 непосредственно перед внесением хромоген-субстратной смеси в лунки. Хромоген-субстратный раствор является светочувствительным, поэтому на стадии проведения ферментативной реакции пероксидазы планшет должен быть прикрыт листом плотной бумаги или находиться в тумбочке.

9.1.15 Голубая окраска хромоген-субстратного раствора до его внесения в лунки планшета является признаком непригодности данного раствора. Одна из возможных причин такого явления – загрязнение хромоген-субстратного раствора раствором конъюгата. Желательно использовать два разных лотка для многоканальной полуавтоматической пипетки на стадиях внесения в лунки планшета раствора конъюгата и хромоген-субстратного раствора.

9.1.16 Измеряйте ОП в лунках планшета не позже, чем через 15 минут после остановки ферментативной реакции.

9.2 Подготовка образцов для анализа

ВНИМАНИЕ! Процедуру пробоподготовки нельзя проводить в помещении, предназначенном для выполнения ИФА, в связи с возможным загрязнением воздуха и предметов продуктовой пылью, содержащей глиадины. Тщательно промывайте устройство для измельчения образцов и обрабатывайте поверхности после работы с каждым образцом для предотвращения кросс-контаминации! С этой целью рекомендуется использовать 70% этанол или 2-пропанол. При работе с каждым образцом используйте перчатки одноразовые, резиновые или пластиковые, или тщательно мойте руки.

9.2.1 Пробоподготовка включает механическую гомогенизацию, химическую гомогенизацию и экстракцию.

9.2.1.1 Механическая гомогенизация. Используйте для механической гомогенизации количество образца, достаточное для последующего взвешивания 0,25 г твердого образца или отбора 0,25 мл жидкого образца. Распределение глиадина в некоторых продуктах может быть очень неравномерным (колбасные изделия, рыбные и мясные консервы и т.д.); в этих случаях следует гомогенизировать 50 г продукта для последующего взвешивания 0,25 г.

9.2.1.1.1 Жидкие образцы перемешайте встряхиванием в упаковке. Полужидкие образцы перенесите в соответствующую тару и перемешайте доступным способом

(шпателем, блендером и т.п.). Твердые образцы измельчайте с помощью ступки, гомогенизатора или мельницы до получения однородной массы.

9.2.1.1.2 Взвесьте твердые образцы (0,25 г) или отмерьте жидкие образцы (0,25 мл) и поместите их в предварительно маркированные пробирки для центрифуги объемом не менее 15 мл, снабженные герметично закрывающимися пробками.

9.2.1.1.3 Разделите образцы на группы 1 и 2 в зависимости от консистенции препарата, полученного в результате механической гомогенизации. Группа 1 – образцы, в результате механической гомогенизации которых получен плотный пластилинообразный препарат (колбасные изделия, паштеты, глазированные сырки, конфеты, шоколад и т.п.). Группа 2 – жидкие и полужидкие образцы (напитки, сметана, кетчуп, горчица и т.п.), а также твердые образцы, в результате механической гомогенизации которых получен рыхлый сыпучий препарат (специи, крупы, макаронные изделия, нежирные чипсы и т.п.).

9.2.1.2 Химическая гомогенизация. Эта процедура необходима только для образцов группы 1.

9.2.1.2.1 Проведите химическую гомогенизацию образцов группы 1. Для этого добавьте к навеске каждого образца 2,5 мл коктейля для химической гомогенизации образцов (таблица 1, компонент 6). Эту процедуру следует выполнять в вытяжном шкафу. Закройте пробирки герметично. Перемешайте с использованием вихревого смесителя типа «Vortex». Инкубируйте 40 мин при температуре (50±5) ºС, используя ротатор для перемешивания пробирок Thermo Fisher Scientific или другой прибор аналогичного назначения с тем же принципом работы. Охладите пробирки до комнатной температуры (18–25) ºС.

9.2.1.2.2 Образцы группы 2 не требуют химической гомогенизации. К навеске/отмеренному объему каждого образца группы 2 добавьте 2,5 мл дистиллированной воды. Закройте пробирки герметично. Перемешайте с использованием вихревого смесителя типа «Vortex».

9.2.1.3 Экстракция. Проведите экстракцию глиадина из всех образцов, подвергнутых подготовке в соответствии с п.п. 9.2.1.1 и 9.2.1.2. Для этого внесите в каждую пробирку с образцом 7,5 мл 80% этилового спирта, подготовленного в соответствии с п. 7.2. Эту процедуру следует выполнять в вытяжном шкафу. Закройте пробирки герметично. Перемешайте с использованием вихревого смесителя типа «Vortex». Инкубируйте 1 ч при температуре (20–25) ºС, используя ротатор для перемешивания пробирок Thermo Fisher Scientific или другой прибор аналогичного назначения с тем же принципом работы.

9.2.2 Центрифугируйте экстракты при 2000 g в течение 5 мин для удаления нерастворимых частиц. Отберите надосадочную жидкость в маркированные пробирки или флаконы с герметично закрывающимися пробками для использования в анализе и хранения. Эту процедуру следует выполнять в вытяжном шкафу. 1 мл экстракта достаточно для 50 анализов данной пробы в дубликатах. Полученные экстракты могут храниться при комнатной температуре (18–25) ºС в течение 1 месяца.

9.3 Подготовка реагентов для анализа

9.3.1 Вынуть все компоненты набора их холодильника и выдержать при комнатной температуре (18–25) ºС в течение 30 мин.

9.3.2 Подготовить одноразовые пластиковые пробирки в количестве, соответствующем количеству исследуемых образцов. Маркировать пробирки и установить их в штативе.

9.3.3 Развести экстракты исследуемых образцов в 12,5 раз, используя раствор для разведения экстрактов и калибровочных проб (ИФА-буфер) (таблица 1, компонент 4). Для этого в соответствующую пробирку внести 920 мкл ИФА-буфера и 80 мкл экстракта.

Перемешать содержимое пробирок, используя вихревой смеситель. Экстракт образца, разведенный в нужное число раз, далее по тексту называют **исследуемой пробой.**

ВНИМАНИЕ! Для приготовления каждой исследуемой пробы используйте индивидуальный наконечник пипетки! Исследуемые пробы хранению не подлежат и должны быть использованы в течение не более одного рабочего дня.

9.3.4 Если предполагаемая концентрация глютена в исследуемой пробе превышает верхний предел определения, разведите пробу дополнительно ИФА-буфером в 10 и 100 раз (например, 0,1 мл пробы и 0,9 мл ИФА-буфера = проба 1/10; 0,1 мл пробы 1/10 и 0,9 мл ИФА-буфера = проба 1/100). Все дополнительные разведения должны учитываться при расчетах концентрации глютена в исследуемых пробах.

9.3.5 Подготовить калибровочные пробы. Для этого вынуть из упаковки одну из трех серий калибровочных проб (25-кратные концентраты, (C_1–C_6) (таблица 1, компонент 2)). Центрифугировать при 2000 g в течение 1 мин для перемещения жидкости с внутренней поверхности крышки на дно пробирки. Аккуратно перенести пробирки в штатив. В каждую пробирку внести 960 мкл раствора для разведения экстрактов и калибровочных проб (ИФА-буфера) (таблица 1, компонент 4). Закрыть пробирки (C_1–C_6), каждую своей пробкой. Перемешать содержимое пробирок, используя вихревой смеситель. Калибровочные пробы, подготовленные к анализу (разведенные в 25 раз ИФА-буфером), хранению не подлежат и должны быть использованы в течение не более одного рабочего дня.

9.3.6 Подготовить промывочный раствор. Выбрать способ промывки планшета (в автоматическом режиме или в ручном режиме) с учетом наличия или отсутствия прибора для автоматической промывки планшетов.

9.3.6.1 Промывка в автоматическом режиме.

При использовании всех стрипов одновременно в стакан химический мерный вместимостью 1000 мл внести 950 мл дистиллированной воды. Добавить 50 мл содержимого флакона с концентратом промывочного раствора (таблица 1, компонент 7). Тщательно перемешать, избегая пенообразования, с использованием магнитной мешалки.

При использовании части стрипов следует готовить промывочный раствор в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

Количество стрипов, шт.	4	8	12
Промывочный раствор, 20-кратный концентрат, мл	15	35	50
Дистиллированная вода, мл	285	665	950

9.3.6.2 Промывка в ручном режиме.

При использовании всех стрипов одновременно в стакан химический мерный вместимостью 200 мл внести 190 мл дистиллированной воды. Добавить 10 мл содержимого флакона с концентратом промывочного раствора. Тщательно перемешать, избегая пенообразования, с использованием магнитной мешалки.

При использовании части стрипов следует готовить промывочный раствор в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3

Количество стрипов, шт.	4	8	12
Промывочный раствор, 20-кратный концентрат, мл	4	7	10
Дистиллированная вода, мл	76	133	190

Разбавленный промывочный раствор можно хранить при (2–8) ºС до 2 недель. В случае помутнения разбавленного промывочного раствора в ходе хранения считать его непригодным к использованию.

ВНИМАНИЕ! Нельзя использовать промывочный раствор из других наборов, предназначенных для определения других аналитов.

9.3.7 Подготовить конъюгат посредством разведения 61-кратного концентрата конъюгата (таблица 1, компонент 3) раствором для разведения концентрата конъюгата (таблица 1, компонент 5).

ВНИМАНИЕ! Подготовка конъюгата проводится непосредственно перед проведением второй стадии анализа. Подготовленный к анализу раствор конъюгата хранению не подлежит и должен быть использован в течение не более 1 ч. Разводите только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки анализа!

При использовании всех стрипов одновременно в стеклянный или пластмассовый флакон с завинчивающейся крышкой вместимостью 15 мл внести 12 мл содержимого флакона с буфером для разведения концентрата конъюгата и добавить 200 мкл содержимого флакона с 61-кратным концентрата конъюгата**.** Закрыть флакон крышкой и тщательно перемешать, избегая пенообразования, с использованием вихревого смесителя типа «Vortex».

При использовании части стрипов следует готовить раствор конъюгата в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4

Количество стрипов, шт.	4	8	12
Конъюгат, 61-кратный концентрат, мкл	67	133	200
Буфер для разведения концентрата конъюгата, мл	4	8	12

9.3.8 Подготовить хромоген-субстратный раствор посредством смешивания хромогена и субстратного раствора (таблица 1, компоненты 7 и 8) в пропорции 1:20.

При использовании всех стрипов одновременно в стеклянный или пластмассовый флакон с завинчивающейся крышкой вместимостью 15 мл внести 13 мл содержимого флакона с субстратным раствором и добавить 650 мкл содержимого флакона с хромогеном**.** Закрыть флакон крышкой и тщательно перемешать, избегая пенообразования, с использованием вихревого смесителя типа «Vortex».

При использовании части стрипов следует готовить хромоген-субстратный раствор в соответствии с таблицей 5.

ВНИМАНИЕ! Готовить хромоген-субстратный раствор непосредственно перед его внесением в лунки планшета. Голубая окраска хромоген-субстратного раствора до его внесения в лунки планшета является признаком непригодности данного раствора.

Таблица 5

Количество стрипов, шт.	4	8	12
Хромоген, мкл	230	450	650
Субстратный раствор, мл	4,6	9	13

9.4 Процедура анализа

9.4.1 Перед началом анализа следует внимательно ознакомиться с инструкцией по использованию набора реагентов.

9.4.2 Определить число стрипов иммуносорбента (таблица 1, компонент 1), необходимое для анализа, из расчета: 12 лунок для калибровочных проб и n лунок для

исследуемых проб, где n – количество исследуемых проб, умноженное на 2 (таблица 6). Учтите, что для каждого дополнительного разведения исследуемой пробы (п. 9.3.4) используются две дополнительные лунки.

Таблица 6

Количество стрипов, шт.	4	8	12
Количество исследуемых проб	10	26	42

В зависимости от рассчитанного числа стрипов, вскрыть 1, 2 или 3 упаковки со стрипами. Оставшиеся стрипы из вскрытой упаковки хранению не подлежат.

ВНИМАНИЕ! В первую очередь следует использовать ту упаковку со стрипами, в которой находится рамка. В дальнейшем использовать рамку для установки стрипов из двух других упаковок.

9.4.3 Нарисовать на бумаге схему планшета, отметив лунки, предназначенные для калибровочных и исследуемых проб, используемых в дубликатах (пример в таблице 7).

Таблица 7

Примерная схема расположения на планшете калибровочных проб (C_0–C_6) и исследуемых проб ($П_1$–$П_n$).

Лунка	Номер стрипа			
	1	2	3	4
A	C_1	C_1	$П_3$	$П_3$
B	C_2	C_2	$П_4$	$П_4$
C	C_3	C_3	$П_5$	$П_5$
D	C_4	C_4	$П_6$	$П_6$
E	C_5	C_5	$П_7$	$П_7$
F	C_6	C_6	$П_8$	$П_8$
G	$П_1$	$П_1$	$П_9$	$П_9$
H	$П_2$	$П_2$	$П_{10}$	$П_{10}$

9.4.4 В лунки, предназначенные для калибровочных проб, внесите по 100 мкл соответствующих проб, приготовленных в соответствии с п. 9.3.5 , в дублях.

9.4.5 В лунки, предназначенные для исследуемых проб, внесите по 100 мкл исследуемых проб, приготовленных в соответствии с пп. 9.3.3 и 9.3.4, в дублях. Совершайте заполнение лунок ритмично и как можно быстрее.

9.4.6 Заклейте стрипы пленкой для заклеивания планшета (таблица 1, компонент 11) или закройте их крышкой.

9.4.7 Инкубируйте 1 ч при комнатной температуре (18–25) °С без встряхивания. Избегайте попадания света на планшет. С этой целью накройте планшет листом плотной бумаги или поместите его в тумбочку.

9.4.8 После окончания инкубации откройте планшет, резко переверните вверх дном над раковиной и стряхните для удаления содержимого лунок. Отмойте стрипы 3 раза промывочным раствором, приготовленным в соответствии с п. 9.3.6, из расчета 250 мкл на лунку при каждой промывке. После каждой стадии промывки удаляйте содержимое лунок переворачиванием планшета, как указано выше. Избегайте попадания брызг промывочного раствора на дно планшета (внешняя поверхность). После окончания промывки удалите

остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге. Не допускается многократное использование фильтровальной бумаги. Необходимо избегать длительного пребывания промывочного раствора в лунках планшета и высыхания лунок после промывки.

В случае промывки планшета с использованием промывочного оборудования, ранее использовавшегося для промывки планшетов из других наборов, оборудование предварительно тщательно промыть дистиллированной водой.

9.4.9 Внесите в лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, подготовленного в соответствии с п. 9.4.6, используя многоканальный полуавтоматический дозатор. Совершайте заполнение лунок ритмично и как можно быстрее. Инкубируйте 15 мин при комнатной температуре (18–25) °С. Учтите, что увеличение или сокращение продолжительности этой стадии анализа даже на 5 мин может исказить результаты.

9.4.10 Промойте стрипы 5 раз промывочным раствором из расчета 250 мкл на лунку при каждой промывке. Промывку нужно проводить и завершать как указано в п. 9.4.8. Нельзя уменьшать число стадий промывки.

9.4.11 Переверните планшет кверху дном и убедитесь в отсутствии капель, царапин, отпечатков пальцев и других загрязнений на дне лунок (внешняя поверхность). В случае обнаружения загрязнений аккуратно удалите их мягкой нетканой салфеткой.

9.4.12 Внесите в лунки планшета по 100 мкл хромоген-субстратного раствора, приготовленного в соответствии с п. 9.3.8, используя многоканальный полуавтоматический дозатор. Совершайте заполнение лунок ритмично и как можно быстрее. Инкубируйте при комнатной температуре (18–25) °С в темноте в течение 10–15 мин.

ВНИМАНИЕ! Ни в коем случае не наливайте хромоген-субстратный раствор в ту кювету для многоканальной пипетки, в которой прежде находился конъюгат. Убедитесь в том, что на многоканальной пипетке не находятся те одноразовые наконечники, которые были использованы для внесения в лунки конъюгата.

9.4.13 Внесите в лунки планшета по 100 мкл стоп-реагента (таблица 1, компонент 9) используя многоканальный полуавтоматический дозатор. Заполняйте лунки с той же скоростью и в той же последовательности, что и при внесении хромоген-субстратного раствора. Перемешайте содержимое лунок пятью-шестью круговыми движениями планшета по поверхности стола.

9.4.14 Измерьте на фотометре ОП в лунках при длине волны 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 15 мин.

10 Расчеты и графические построения

10.1 Предварительно провести контроль качества проведения анализа. Перейти к п. 10.2 только в том случае, если анализ соответствует указанным ниже критериям качества.

10.1.1 Критерии качества анализа:

- значения фона (ОП в лунках с калибровочной пробой C_1) не выше 0,2;
- значения сигнала в лунках с калибровочной пробе C_6 не ниже 1,0;
- разброс в парах лунок с каждой калибровочной пробой (C_1 - C_6) не выше 15%;

Если эти условия не выполняются, калибровочный график строить нельзя. Следует переделать анализ, предварительно прочитав раздел "Приложение А. Возможные проблемы анализа и пути их решения".

10.1.2 В случае разброса значений ОП в парах лунок с одной или несколькими исследуемыми пробами игнорировать результаты, относящиеся к этим пробам. Переделать анализ таких проб.

10.1.3 В том случае, если значения ОП в парах лунок с одной или несколькими исследуемыми пробами выше значений ОП в парах лунок с калибровочной пробой C_6 (80 нг/мл (ppb)), игнорировать результаты, относящиеся к этим пробам. Переделать анализ таких проб, предварительно разведя их в 10 и 100 раз сверх того, что было сделано в выполненном анализе.

10.2 Определение концентраций глиадина, в нг/мл (ppb), в исследуемых пробах и последующий расчет концентраций глютена, в мг/л или мг/кг (ppm), в продуктах питания могут быть выполнены методом графических построений или с использованием шаблона в формате Microsoft Excel.

10.2.1 Метод графических построений

10.2.1.1 Рассчитать среднее арифметическое значение ОП для каждой пары лунок.

10.2.1.2 Построить калибровочный график в линейных координатах, откладывая на оси ординат значения ОП при длине волны 450 нм, в ОЕ, а по оси абсцисс – значения концентраций глиадина, в нг/мл (ppb), в соответствующих калибровочных пробах.

Типичный калибровочный график набора реагентов ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин» представлен на рисунке. ВНИМАНИЕ! Калибровочный график представлен только для демонстрации. Калибровочный график должен быть построен пользователем для каждой отдельной процедуры анализа.

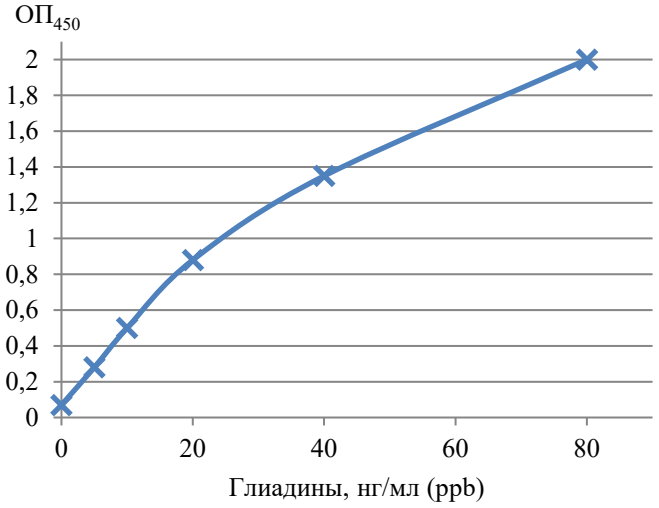

Рисунок. Типичный калибровочный график набора«ПРОДОСКРИН® ИФА-Глиадин».

10.2.1.3 По калибровочному графику определить содержание глиадина, в нг/мл (ppb), в исследуемых пробах.

10.2.1.4 Для определения содержание глютена, в мг/кг (ppm), в исследуемых образцах продуктов произвести расчеты как указано ниже.

Содержание глютена, ppm = Концентрация глиадина (полученная по калибровочному графику), ppb × 2* × 500 / 1000*****

* Глиадин составляет в среднем 50% глютена;

** Общий фактор разведения 500 (факторы разведения 40 (40 = 10 × 4) и 12,5 при приготовлении экстрактов и исследуемых проб, соответственно);

*** коэффициент пересчета ppb в ppm.

10.2.1.5 Для тех образцов, экстракты которых подвергались дополнительным разведениям (п. 9.3.4), в ходе расчетов производить умножение на дополнительный фактор разведения, например, 10.

10.2.1.6 Интерпретировать результаты анализа с учетом того, что безглютеновыми являются продукты, содержание глютена в которых не превышает 20 мг/кг (ppm).

10.2.2 Использование шаблона в формате Microsoft Excel

10.2.2.1 Внести в соответствующие графы таблицы прилагаемого шаблона значения ОП в калибровочных и исследуемых пробах.

10.2.2.2 Программа автоматически строит график зависимости $ОП_{450}$ в калибровочных пробах (ось ординат) от значений концентраций глиадина, нг/мл (ppb) (ось абсцисс).

10.2.2.3 Программа автоматически определяет на основании калибровочного графика концентрацию глиадина, нг/мл (ppb), в лунках с исследуемыми пробами.

10.2.2.4 Программа автоматически рассчитывает содержание глютена, в мг/кг (ppm), в исследуемых продуктах с учетом общего фактора разведения (500 раз) и информации о том, что глиадин составляет 50% глютена.

10.2.2.5 Отметить образцы, экстракты которых подвергались дополнительным разведениям, и вручную провести умножение значения, полученного в результате использования программы, на дополнительный фактор разведения, например, 10. Полученное значение представляет собой искомое содержание глютена, в мг/кг (ppm), в исследуемых образцах.

10.2.2.6 Интерпретировать результаты анализа как указано выше в п. 10.2.1.6.

Возможные проблемы анализа и пути их решения

Проблема	Причина	Решение
1. Высокий фон (ОП пробы C_1 больше 0,20)	1.1 Неудовлетворительная промывка	Обязательно выполняйте указанное в инструкции (пп. 9.4.8 и 9.4.10) число промывок после каждой стадии анализа
	1.2 Избыток конъюгата	Проверьте расчеты, выполненные при разведении 61-кратного концентрата конъюгата (п. 9.3.7). Убедитесь, что полуавтоматические дозаторы отмеряют правильный объем
	1.3 Увеличение продолжительности инкубации сверх указанного в инструкции времени; повышенная температура	Соблюдайте указанные в инструкции продолжительность первой и второй стадии анализа (пп. 9.4.7 и 9.4.9), а также продолжительность ферментативной реакции, в ходе которой происходит окрашивание раствора в лунках (п. 9.4.12). Выполняйте анализ при комнатной температуре (18–25) ºС
2. Показания низкой абсорбции (ОП калибровочной пробы C_6 ниже 1,0)	2.1 Недостаточно конъюгата	Проверьте расчеты, выполненные при разведении 61-кратного концентрата конъюгата (п. 9.3.7). Убедитесь, что полуавтоматические дозаторы отмеряют правильный объем
	2.2 Срок годности реагентов истек	Обеспечьте правильное хранение набора и не используйте его после истечения срока годности. Обеспечьте правильное хранение компонентов набора, подготовленных к анализу (п. 9.1)
	2.3 Недостаточная продолжительность первой и (или) второй стадии анализа, пониженная температура	Соблюдайте время инкубации, указанное в инструкции. Выдерживайте компоненты набора при комнатной температуре (18–25) ºС не менее 30 минут перед проведением анализа
	2.4 Концентрат промывочного раствора не разбавлен	Убедитесь, что 10-кратный концентрат промывочного раствора разбавлен дистиллированной водой в 10 раз перед использованием (п. 9.3.6)
	2.5 Стоп-раствор не добавлен	Добавьте стоп-реагент, чтобы получить желтую окраску продукта реакции, которую можно измерить при 450 нм

Проблема	Причина	Решение
3. Значения ОП выше предела измерения микропланшетного фотометра (ОП > 3,0)	3.1 Избыток конъюгата	Проверьте расчеты, выполненные при разведении 61-кратного концентрата конъюгата (п. 9.3.7). Убедитесь, что полуавтоматические дозаторы отмеряют правильный объем
	3.2 Избыточная продолжительность первой и (или) второй стадии анализа, повышенная температура	Соблюдайте время инкубации, указанное в инструкции (пп. 9.4.7 и 9.4.9). Проводите анализ при комнатной температуре (18–25) ºС
	3.3 Чрезмерно длительная инкубация с хромоген-субстратным раствором	Сократите время проведения ферментативной реакции более ранним внесением стоп-реагента
	3.4 Неудовлетворительная промывка	Обязательно выполняйте указанное в инструкции (пп. 9.4.8 и 9.4.10) число промывок после каждой стадии анализа
	3.5 Голубая окраска хромоген-субстратного раствора до его внесения в лунки	Одна из возможных причин данного явления – загрязнение хромоген-субстратного раствора раствором конъюгата. Необходимо использовать два разных лотка для многоканальной полуавтоматической пипетки на стадиях внесения в лунки планшета раствора конъюгата и хромоген-субстратного раствора
4. Высокий разброс значений ОП в парах лунок (коэффициент вариации (КВ) > 15 %)	4.1 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, используя многоканальный дозатор
	4.2 Неточность пипетирования	Убедитесь, что дозаторы работают правильно и откалиброваны; пересмотрите свою технику дозирования
	4.3 Недостаточное перемешивание раствора конъюгата	Тщательно перемешайте рабочий раствор, полученный в результате разведения 61-кратного концентрата конъюгата раствором для разведения концентрата конъюгата (п. 9.3.7)

Проблема	Причина	Решение
4. Высокий разброс значений ОП в парах лунок (коэффициент вариации (КВ) > 15 %)	4.4 Нижняя наружная поверхность микропланшета загрязнена	Перед внесением в лунки хромоген-субстратного раствора переверните планшет кверху дном и убедитесь в отсутствии капель, царапин, отпечатков пальцев и других загрязнений на дне лунок (внешняя поверхность). В случае обнаружения загрязнений аккуратно удалите их мягкой нетканой салфеткой.