

GLUTEN Quick ELISA KIT (anticorps R5)

Référence LIBIOS : GLU-Q-R5-96P

Dosage immuno-enzymatique de type sandwich pour l'analyse quantitative du gluten dans les matrices alimentaires

Dernière révision : 02-06-2014

GLUTEN Quick ELISA KIT (anticorps R5) GLU-Q-R5-96P

Composition du kit :

Réactif	1 coffret (8x12 puits)	
	Qté	Volume
Plaque de 96 puits coatés aux anticorps monoclonaux spécifiques de la gliadine, la sécaline, et l'hordéine.	1	
Solutions standards européens de Gliadine à 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.25 ng/ml and 3.12 ng/ml, prêt à l'emploi.	5	1,5 ml
Contrôle négatif, prêt à l'emploi.	1	1,5 ml
Conjugué enzymatique : anticorps monoclonal anti-(gliadine, sécaline et hordéine) couplé à la peroxydase, prêt à l'emploi.	1	15 ml
Tampon d'extraction, prêt à l'emploi.	1	110 ml
Solution de lavage (concentré 25x).	1	65 ml
Diluant (DE12-05) (concentré 5x).	1	65 ml
Substrat (TMB).	1	15 ml
Solution Stop (H ₂ SO ₄ 0,5M).	1	15 ml

MATERIEL ET REACTIFS NECESSAIRES NON FOURNIS DANS LE KIT :

Ethanol
Eau distillée

I. PRINCIPE DU TEST :

Ce kit est basé sur une méthode immuno-enzymatique de type double sandwich (DAS ou ELISA capture). La technique est brièvement décrite ci-dessous :

La plaque est coâtée avec un anticorps monoclonal spécifique de l'épitope commun des gliadines, des sécralines et des hordéines. Lors de l'ajout de l'échantillon dans les puits, les gliadines présentes de l'échantillon se fixent aux anticorps monoclonaux de capture.

Après une étape de lavage, un conjugué enzymatique (anticorps monoclonal couplé à la peroxydase) est ajouté.

Ce conjugué se fixe alors aux gliadines préalablement capturés par la plaque.

Après une seconde étape de lavage, l'action de la peroxydase sera révélée par l'ajout du substrat TMB.

Le changement de couleur de la solution substrat au bleu et ensuite au jaune par l'addition de la solution stop, sera mesuré à 450nm par un lecteur de plaques.

Le taux de gliadines de l'échantillon sera déterminé par interpolation de sa valeur d'absorbance par rapport à une courbe de calibration réalisée à l'aide des étalons fournis dans le kit.

La sensibilité du dosage est de 3 ppm de gluten.

II. PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE POUR L'UTILISATEUR :

1. Lire attentivement la notice technique.
2. Porter tous les réactifs à température ambiante avant utilisation (+22°C/25°C).
3. Ne pas mélanger les réactifs ou les notices techniques de différents kits.
4. Eviter toute contamination des réactifs du kit.
5. Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration et ne pas mélanger les composants de différents lots.
6. Ne pas manger, boire ou fumer lors de la manipulation des réactifs ou des échantillons.
7. Ne pas pipeter à la bouche.
8. Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque nouvel échantillon.
9. Inclure systématiquement les contrôles et la courbe d'étalonnage pour toute nouvelle série d'analyses.
10. **IMPORTANT** : Le substrat TMB est sensible à la lumière et aux contaminations, il doit être manipulé avec précaution. Avant l'étape de développement de couleur : préparer dans un flacon teinté une quantité suffisante de substrat pour le dosage.
11. La solution stop est un acide fort et doit être manipulée avec précaution.

III. CONSERVATION DES COMPOSANTS DU KIT :

Tous les composants doivent être conservés entre +2°C et +8°C.

IV. INFORMATION SUR LES ÉTAPES DE LAVAGE :

Ces étapes peuvent être réalisées par le biais d'un laveur automatique de plaques ou à l'aide une pipette de prélèvement multicanaux adaptée au prélèvement de 300µL.

Après chaque temps d'incubation, les étapes de lavage doivent être effectuées en respectant les instructions suivantes :

- Vider le contenu des puits d'un mouvement rapide de retournement afin d'éviter les contaminations possibles entre les puits.
- Remplir chaque puits avec 300µL de solution de lavage.
- Effectuer une homogénéisation douce en évitant les contaminations entre les puits.
- Vider le contenu des puits d'un mouvement rapide de retournement.
- Répéter l'opération autant de fois que préconisé par les instructions.
- Avant de vider le contenu des puits lors de la dernière étape de lavage, vérifier que le réactif suivant est prêt à être utilisé. Ne pas laisser sécher la plaque plus que nécessaire.
- Après la dernière étape de lavage, tourner et tapoter la plaque sur du papier absorbant afin d'éliminer toute la solution de lavage.

V. PRÉPARATION DES RÉACTIFS :

Solution de lavage :

Diluer un volume de la solution de lavage concentrée avec 24 volumes d'eau distillée ou désionisée. Après préparation, cette solution est stable si conservation à +4°C.

Tampon de dilution :

Diluer un volume du tampon de dilution concentré avec 4 volumes d'eau distillée ou désionisée. Après préparation, cette solution est stable si conservation +2°C / +8°C.

Conjugué enzymatique, Contrôle négatif et Etalons :

Fournis prêts-à-l'emploi.

Déposer directement 100µL de chaque flacon dans les puits.

VI. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS :

IMPORTANT : Une procédure d'extraction spéciale doit être utilisée pour les échantillons contenant du chocolat ou pour les prélèvements environnementaux (écouvillons). Merci de contacter votre distributeur.

Procédure d'extraction pour les produits traités thermiquement ou les produits contenant du soja.

1. Peser 0,25g d'échantillon broyé et le déposer dans un tube de 10mL.
2. Ajouter 2,5mL de tampon d'extraction.
3. Fermer bien le tube avec son bouchon et avec du parafilm afin d'éviter toute évaporation.
4. Mélanger vigoureusement au vortex (5-10 secondes). Placer les tubes sur un rack.
5. Incuber les tubes entre 20 et 60 minutes à température ambiante. Au cours de cette incubation, vortexer les tubes 2-3 fois.
6. Ouvrir les tubes, ajouter 7,5mL d'éthanol à 80%. Mélanger vigoureusement au vortex (10-60 secondes). Incuber les tubes entre 20 et 60 minutes à température ambiante sous agitation. (Un agitateur rotatif à 45 rpm est recommandé).
7. Centrifuger les tubes 10 minutes à température ambiante et à 2000-2500g.
8. Transférer le surnageant dans des tubes propres de 10mL. L'extrait est prêt pour le test ELISA.

Procédure d'extraction pour les produits non traités thermiquement ou les produits ne contenant pas de soja.

1. Peser 0,25g d'échantillon broyé et le déposer dans un tube de 10mL.
2. Ajouter 10mL d'éthanol à 60% et incuber 20 à 60 minutes à température ambiante sous agitation.
3. Transférer le surnageant dans des tubes propres de 10mL. L'extrait est prêt pour le test ELISA.

NOTE : L'extrait échantillon peut être conservé 7 jours à température ambiante avant l'analyse ELISA. Fermer hermétiquement les tubes à l'aide de parafilm lors de la conservation afin d'éviter toute évaporation.

Avant d'être déposés dans les puits, les échantillons doivent être dilués selon les recommandations suivantes :

1. Concentration en gluten estimée <10ppm : Dilution au 1/12,5 à l'aide du diluant fourni.
2. Concentration en gluten estimée comprise entre 10-100ppm : Dilution au 1/25 à l'aide du diluant fourni.
3. Concentration en gluten estimée >100ppm : Dilution au 1/50 à l'aide du diluant fourni.

Procédure de dilution :

1/12,5 = 920µL de diluant +80µL d'échantillon.

1/25 = 960µL de diluant +40µL d'échantillon.

1/50 = 980µL de diluant +20µL d'échantillon.

Recommandation générale : Pour les échantillons de concentration inconnue, une dilution au 1/25 est recommandée.

VII. PROCÉDURE D'ANALYSE :

1. Avant de démarrer le test, porter tous les réactifs à température ambiante (+22°C/25°C).
2. Déposer 100µL des échantillons dilués. Il est recommandé d'utiliser 2 puits par échantillon. Déposer 100µL des étalons et du contrôle négatif. Recouvrir la plaque hermétiquement et **incuber 20 minutes à température ambiante (+22°C/25°C)**.
3. Laver les puits 3 fois en respectant la procédure de lavage précédemment décrite dans le point IV (Étapes de lavage).
4. Ajouter 100µL du conjugué enzymatique prêt-à-l'emploi dans chaque puits. Recouvrir la plaque hermétiquement et **incuber 20 minutes à température ambiante (+22°C/25°C)**.
5. Laver les puits 4 fois en respectant la procédure précédemment décrite.
6. A l'aide d'une pipette multicanaux, ajouter 100µL du substrat TMB dans chaque puits. **Incuber 20 minutes à température ambiante.**
7. Ajouter 100µL de solution stop dans chaque puits en respectant l'ordre de dépôt effectué lors de l'ajout du substrat. Une réaction positive est indiquée par le virage de couleur du bleu au jaune.
8. Lire la densité optique de chaque puits à 450nm dans les 5 minutes après l'ajout de la solution stop.

VIII. LECTURE ET INTERPRETATION DES RÉSULTATS :

Validation du test

Le test peut être considéré valide lorsque :

- ⇒ La densité optique de l'étalon à 50ng/ml est supérieure à 1,5 et la densité optique du contrôle négatif est inférieure à celle du point étalon à 3,12ng/ml.

Interprétation :

La densité optique de l'échantillon correspond à la moyenne des valeurs de densités optiques de l'échantillon dupliqué.

Réaliser la courbe d'étalonnage en utilisant la moyenne des valeurs de DO obtenues pour les cinq standards (abscisses) et les valeurs de concentration correspondantes en ng/ml (ordonnées).

Déterminer la concentration en gliadines de l'échantillon (C) par interpolation de sa

valeur d'absorbance sur la courbe d'étalonnage.

La teneur en gluten (ppm) de l'échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$\text{ppm de gluten} = C \times D \times 2 \times 40 / 1000$$

Où :

C: concentration en gliadines de l'échantillon obtenue par la courbe de calibration en ng/ml

D: Facteur de dilution de l'échantillon (12,5, ou 25 ou 50)

2: Facteur appliqué pour obtenir la concentration exprimée en ppm de gluten (et non en ppm de gliadine)

40: Facteur de dilution appliqué lors de la préparation de l'échantillon (0,25g d'échantillon dans 10ml de solution d'extraction).

1/1000: facteur de conversion des ng/ml en ppm.

INFORMATION COMPLÉMENTAIRES :

- Afin de garantir la fiabilité des calculs, les valeurs de DO des échantillons doivent être comprises à l'intérieur de la plage de DO de la gamme d'étalonnage. Il peut être nécessaire de répéter l'analyse en utilisant différentes dilutions échantillon pour obtenir ce résultat. Si tel est le cas, il est important d'appliquer le facteur de dilution

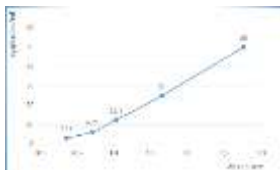
correspondant dans le calcul du résultat pour obtenir la bonne concentration.

- Dans le seul cas où la valeur de DO serait légèrement supérieure à la valeur de DO du point à 50ng/ml (jusqu'à 15%), l'essai peut être considéré comme valide.

EXEMPLE :

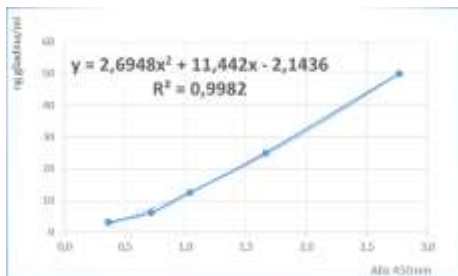
- 1) DO du contrôle négatif = 0,13
- 2) DO des points étalons :

ng/ml	Abs450
50	2.768
25	1.660
12.5	1.039
6.25	0.717
3.12	0.361



- 3) La concentration en gliadine de l'échantillon (C) peut être obtenue par extrapolation de sa valeur d'absorbance sur la courbe d'étalonnage grâce à une feuille de calcul excel (Veuillez nous contacter pour obtenir une feuille de calcul prête à être remplie) ou en utilisant un logiciel approprié. Par exemple :

- ✓ Logiciel : Excel (Microsoft)
- ✓ Une fois les valeurs de DO obtenues pour les étalons de gliadines, cliquer sur "Assistant graphique"
- ✓ Sélectionner un type de graphique : « XY (dispersion)
- ✓ Ajouter une courbe de tendance de type « polynomiale »
- ✓ Cocher l'option « Afficher l'équation sur le graphique »
- ✓ Dans cette équation, remplacer l'inconnue « x » par la valeur de DO de l'échantillon.



<i>Echantillon</i>	<i>Dilution(D)</i>	<i>DO</i>	<i>ng/ml (C)*</i>	<i>ppm gluten</i>
1	12,5	0,21	< 3,12	< 3
2	12,5	0,500	4	4
3	25	0,893	10	20
4	25	2,817	51,5	103
5	50	2,532	44	176

*Valeur obtenue en remplaçant « x » dans l'équation de la courbe de tendance.

PROCÉDURE SIMPLIFIÉE

1. Les réactifs doivent être portés à température ambiante **(+22°C/25°C)** avant le démarrage du test.
2. Ajouter 100µL d'**échantillon** (préparés et dilués selon la procédure décrite au point VI) en duplicat.
3. Ajouter 100µL des **étalons** et du **contrôle négatif**. (Recouvrir la plaque hermétiquement à l'aide de film adhésif).
4. Incuber à température ambiante **(+22°C/25°C)** pendant 20 minutes.
5. Laver les puits 3 fois à l'aide de la solution de lavage diluée afin d'éliminer l'excédent de réactif.
6. Ajouter 100µL de **conjugué enzymatique** dans chaque puits. (Recouvrir la plaque hermétiquement à l'aide de film adhésif).
7. Incuber à température ambiante **(+22°C/25°C)** pendant 20 minutes.
8. Laver les puits 4 fois à l'aide de la solution de lavage diluée afin d'éliminer l'excédent de conjugué.
9. Ajouter 100µL de **substrat (TMB)** dans chaque puits.
10. Incuber à température ambiante **(+22°C/25°C)** pendant 20 minutes.
11. Ajouter 100µL de **solution stop** dans chaque puits.
12. Lire à 450nm.

Développé et produit en Espagne par :

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA,
 S.A.
 C/ Hnos. García Noblejas, 39
 28037- MADRID (SPAIN)



Votre interlocuteur en France et Belgique :



Dynamic Test Kits for R&D
 and Quality Control

LIBIOS
 83 Rue Edmond Michelet
 69490 Pontcharra Sur Turdine
 France

Tél. : +33 (0)4 74 13 03 02
 Fax : +33 (0)4 74 05 28 25
 Mail : info@libios.fr
 Web : www.libios.fr