

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



User's Manual

# Vitamin B12 ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Vitamin B12 in food

**REF**

**DEB12E01**



**96 wells**

Sensitivity	0.3 ng/mL
Recovery (spiked samples)	98 %
Incubation Time	80 min

## 1. GENERAL INFORMATION

Vitamin B<sub>12</sub> as a trace element belongs to the biologically important chelate formers. The basic unit consists of a corrin ring with cobalt as a central atom. Cobalt is sixfold coordinated by four nitrogen atoms, one cyanide and a dimethylbenzimidazol group. Vitamin B<sub>12</sub> forms a stable complex, which is absorbed in the lower part of the small intestine, with the so-called intrinsic factor present in the gastric juice. A lack of vitamin B<sub>12</sub> can lead among other things to pernicious anemia. This disease is not generated by an insufficient supply of vitamin B<sub>12</sub>, but by the absence of intrinsic factor. A pernicious anemia can be treated by a high dosage of vitamin B<sub>12</sub>.

The existing detection procedures are mainly microbiological methods (1), but also HPLC and thin-layer chromatography, all of which are associated with a high amount of time and instrumentation.

With the present test kit it is possible, to determine vitamin B<sub>12</sub> quantitatively in vitaminated food (2) in a significantly faster way (2.5 to 4 hours inclusive sample pretreatment) compared with a conventional microbiological assay (24 to 48 hours).

## 2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Vitamin B<sub>12</sub>** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. An antibody directed against vitamin B<sub>12</sub> is bound on the surface of a microtiter plate. Vitamin B<sub>12</sub> containing samples or standards and a vitamin B<sub>12</sub>-peroxidase conjugate are given into the wells of the microtiter plate. Enzyme labeled and free vitamin B<sub>12</sub> compete for the antibody binding sites. After one hour incubation at room temperature, the wells are washed with diluted washing solution to remove unbound material. A substrate solution is added and incubated for 20 minutes, resulting in the development of a blue colour. The colour development is inhibited by the addition of a stop solution, and the colour turns yellow. The yellow colour is measured photometrically at 450 nm. The concentration of vitamin B<sub>12</sub> is indirectly proportional to the colour intensity of the test sample.

## 3. PRECAUTIONS

Full compliance of the following good laboratory practices (GLP) will determine the reliability of the results:

1. Prior to beginning the assay procedure, bring all reagents to room temperature (20-25°C).
2. All reagents should be mixed by gentle inversion or swirling prior to use. Do not induce foaming.
3. Once the assay has been started, all subsequent steps should be completed without interruption and within the recommended time limits.
4. Replace caps in all the reagents immediately after use. Do not interchange vial stoppers.
5. Use a separate disposable tip for each specimen to prevent cross-contamination.
6. All specimens and standards should be run at the same time, so that all conditions of testing are the same.
7. Do not mix components from different batches.
8. Do not use reagents after expiration date.
9. Check both precision and accuracy of the laboratory equipment used during the procedure (micropipets, ELISA reader etc.).

## 4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

1. Do not smoke or eat or drink or pipet by mouth in the laboratory.
2. Wear disposable gloves whenever handling patient specimens.
3. Avoid contact of substrate and stop solution with skin and mucosa (possible irritation, burn or toxicity hazard). In case of contact, rinse the affected zone with plenty of water.
4. Handling and disposal of chemical products must be done according to good laboratory practices (GLP).

## 5. REAGENTS

The kit contains reagents for 96 determinations. They have to be stored at 2-8°C. Expiry data are found on the labels of the bottles and the outer package.

1. **SORB** **MT** Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with anti-vitamin B<sub>12</sub>.
2. **CAL** **1** – **6** Vitamin B<sub>12</sub> Standards (0; 0.4; 1; 4; 10; 40 ng/mL): 6 vials with 0.5 mL each, dyed red, ready-to-use.
3. **ENZ** **CONJ** Conjugate (Vitamin B<sub>12</sub>-Peroxidase): 6 mL, dyed red, ready-to-use.
4. **SUB** **TMB** Substrate Solution (TMB): 15 mL; ready-to-use.
5. **STOP** **SOLN** Stop Solution (1 N acidic solution): 15 mL; ready-to-use.
6. **SAM** **DIL** Sample Diluent (PBS): 2 x 60 mL; dyed red, ready-to-use.
7. **WASH** **SOLN** **10x** Washing Solution (PBS + Tween 20): 30 mL as 10x concentrate, dyed blue. Dilute 1+9 with distilled water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
8. Instruction Manual

## 6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)

### Instrumentation

- 10 - 1000 µL-micropipets
- Volumetric flask
- Mortar, mixer
- Centrifuge
- ELISA reader (450 nm)
- Plastic foil
- Plastic bag

### Reagents

- Potassiumhexacyanoferrate(II)-3-hydrate (150 g/L; Carrez I)
- Zinxsulfate-7-hydrate (300 g/L; Carrez II)
- Double-distilled water
- 1 M caustic soda solution
- 1 M hydrochloric acid
- PBS (8.77 g/L NaCl, 0.70 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O, 2.90 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O)

## 7. SAMPLE PREPARATION

The vitamin is extracted from the sample by double-distilled water. After the dissolution, the pH is adjusted by 1 M caustic soda solution or 1 M hydrochloric acid to 6-7. Afterwards potential turbid matter is precipitated by Carrez I (150 g/L Potassiumhexacyanoferrate(II)-3-hydrate) and Carrez II (300 g/L Zinxsulfate-7-hydrate). The extract is filled up to a defined volume and is centrifuged. Samples which are difficult to dissolve in cold water can be brought in solution by gentle warming. After the centrifugation, the samples are further diluted by the supplied sample diluent. To exclude interfering matrix or pH effects, a minimal dilution of 1 in 5 should be followed. We recommend a dilution to 1-10 ng/mL, in order to obtain an optimal accuracy during the measurement.

Grain products normally contain low concentrations of vitamin B<sub>12</sub>. In order to avoid high dilutions, the sample can be extracted directly by sample diluent instead of double-distilled water. The amount of sample diluent supplied in the kit is not sufficient in this case. The buffer can however be ordered separately from **Demeditec**.

### Multivitamin Tablets and Capsules

The tablets and capsules are dissolved in double-distilled water, and the pH value is adjusted to 6-7. Then 0.5 mL each of Carrez I and Carrez II are added, and the solution is filled up to a defined volume by double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and the upper phase is further diluted by sample diluent. To dissolve the capsules, heating to 30-40°C is recommended.

### Multivitamin Juices

The juice is adjusted to pH 6-7, 0.5 mL each of Carrez I and Carrez II are added, and the solution is filled up to a defined volume by double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and the upper phase is further diluted by sample diluent.

### Multivitamin Jam

The jam is homogenised in a mixer, and approximately 8 grams are extracted by double-distilled water, the pH is adjusted to 6-7 and 0.5 mL each of Carrez I and Carrez II are added. Afterwards the solution is filled up to a defined volume by double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and the upper phase is further diluted by sample diluent.

### Grain Products (Corn Flakes and Muesli)

3-5 grams of sample are homogenised by a mortar or a mixer, extracted by double-distilled water, the pH is adjusted to 6-7, and 0.5 mL each of Carrez I and Carrez II are added. Afterwards the solution is filled up to a defined volume by double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and the upper phase is further diluted by sample diluent. Grain products normally contain low concentrations of vitamin B<sub>12</sub>. In order to avoid high dilutions, the sample can be extracted directly by sample diluent instead of double-distilled water.

### Multivitamin Sweets

The sweets are dissolved by gentle heating (if necessary) in double-distilled water, the pH is adjusted to 6-7, and 0.5 mL each of Carrez I and Carrez II are added. Afterwards the solution is filled up to a defined volume by double-distilled water. The solid matter is separated by centrifugation, and the upper phase is further diluted by sample diluent.

### Milk

5 mL of a fresh milk sample (full-cream milk or skim milk) are pipetted into a test tube and refrigerated for 30 minutes at 2-8°C. Afterwards the sample is centrifuged for 10 min at 3000 g. The upper fat layer is aspirated and discarded. The remaining aqueous layer is diluted 1:5 in sample diluent.

### Dry Milk Instant Formula

10 g of dry milk instant formula are suspended in 25 mL PBS and filled up to 50 mL. The mixture is vortexed intensely for 10 min and heated for 3 min in boiling water afterwards. After cooling to 20-25°C it is centrifuged for 10 min at 3000 g. The upper fat layer is aspirated and discarded. The remaining aqueous layer is diluted 1:5 in sample diluent.

**8. PROCEDURE**

1. Prepare samples as described above.
2. Pipet 50 µL standards or prepared samples in duplicate into the appropriate wells of the microtiter plate. Immediately add 50 µL vitamin B<sub>12</sub>-peroxidase conjugate into each well.
3. Cover the microtiter plate with a plastic foil and incubate for 60 minutes at room temperature on a microtiter plate shaker (or 90 minutes without shaker).
4. Wash the plate three times as follows: Discard the contents of the wells (dump or aspirate). Pipet 300 µL of diluted washing solution into each well. After the third repetition empty the wells again and remove residual liquid by striking the plate against a paper towel. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbencies.
5. Pipet 100 µL of substrate solution into each well.
6. Allow the reaction to develop in the dark (e.g. cupboard or drawer; the chromogen is lightsensitive) for 20 minutes at room temperature.
7. Stop enzyme reaction by adding 100 µL of stop solution (1 N acidic solution) into each well. The blue colour will turn yellow upon addition.
8. After thorough mixing, measure absorbance at 450 nm (reference wavelength 620 nm), using an ELISA reader. The colour is stable for 30 minutes.

**9. CALCULATION OF RESULTS**

1. Calculate the average optical density (OD 450 nm) for each set of reference standards or samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean optical density obtained for each reference standard against its concentration in ng/mL on semi-log graph paper with the optical density on the vertical (y) axis and the concentration on the horizontal (x) axis.
3. Using the mean optical density value for each sample, determine the corresponding concentration of vitamin B<sub>12</sub> in ng/mL from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.
4. The diluted samples must be further converted by the appropriate dilution factor. The factor is dependent on the sample preparation procedure employed. Applying the procedure for dry milk instant formula the dilution factor is 25.

**10. TYPICAL STANDARD VALUES**

The following table contains an example for a typical standard curve. The binding is calculated as percent of the absorption of the 0 ng/mL standard. These values are only an example and should not be used instead of the standard curve which has to be measured in every new test.

Vitamin B <sub>12</sub> (ng/mL)	% binding of 0 ng/mL
0	100
0.4	86
1.0	70
4.0	24
10	10
40	4

**11. PERFORMANCE****Sensitivity**

The sensitivity of the **Vitamin B<sub>12</sub> test** is 0.3 ng/mL (based on the standard curve).

**Recovery**

The recovery of spiked samples was determined to 98 %.

**Intra-assay Precision**

The intra-assay variation of the vitamin B<sub>12</sub> test was determined to 3 %.

**Cross-reactivity**

<b>Cross-reactivity</b>	<b>relative to vitamin B<sub>12</sub> (=100%)</b>
Hydroxycobalamine	29 %

**12. REFERENCES**

1. Thompson, MT et al; J. Biol. Chem. 184, 175 (1950).
2. Reichert, N, Rubach, K; Dt. Lebensmittel-Rundschau 86/10 (1990).
3. Miller A, Slingerland DW, Hall CA, Chu RC; Am J Hematol. 1998 Sep;59(1): 42-5.
4. Segal R, Baumoehl Y, Elkayam O, Levartovsky D, Litinsky I, Paran D, Wigler I, Habot B, Leibovitz A, Sela BA, Caspi D; Rheumatol Int. 2004 Jan;24(1):14-9. Epub 2003 Apr 29.
5. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM; Arch Neurol. 1998 Nov;55(11):1449-55.
6. Bernard MA, Nakonezny PA, Kashner TM; J Am Geriatr Soc. 1998 Oct; 46(10):1199-206.

---

Empfindlichkeit	0,3 ng/mL
Wiederfindung (aufgestockte Proben)	98 %
Inkubationszeit	80 min

## 1. ALLGEMEINES

Vitamin B<sub>12</sub> gehört als Spurenelement zu den biologisch wichtigen Chelatbildnern. Der Grundkörper wird aus einem Corrinring mit Kobalt als Zentralatom gebildet. Das Kobalt ist über vier Stickstoffatome, eine Cyanidgruppe und einen Dimethylbenzimidazolrest sechsfach koordiniert. Mit dem im Magensaft befindlichen sogenannten intrinsic factor bildet Vitamin B<sub>12</sub> einen stabilen Komplex, der im unteren Teil des Dünndarms resorbiert wird. Ein Mangel an Vitamin B<sub>12</sub> kann u.a. zu perniziöser Anämie führen. Diese Krankheit wird nicht durch eine zu geringe Zufuhr an Vitamin B<sub>12</sub> hervorgerufen, sondern durch Fehlen des intrinsic factors. Durch hohe Dosen von Vitamin B<sub>12</sub> kann die perniziöse Anämie therapiert werden.

Die bisherigen Nachweisverfahren sind überwiegend mikrobiologische Methoden (1), aber auch HPLC und Dünnschichtchromatographie, wobei die genannten Verfahren mit großem Zeit- und Geräteaufwand verbunden sind.

Mit dem vorliegenden Test kann Vitamin B<sub>12</sub> deutlich schneller (2,5 bis 4 Stunden incl. Probenvorbereitung) quantitativ in vitaminisierten Lebensmitteln (2) bestimmt werden als z.B. mit einem mikrobiologischen Nachweis (24-48 Stunden).

## 2. TESTPRINZIP

Der **Vitamin B<sub>12</sub> Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein Vitamin B<sub>12</sub>-Antikörper ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Vitamin B<sub>12</sub> enthaltende Probe bzw. Standards, sowie ein Vitamin B<sub>12</sub>-Peroxidase-Konjugat in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Konkurrenz zwischen markiertem und unmarkiertem Vitamin B<sub>12</sub> statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entwickelt wird. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Vitamin B<sub>12</sub>-Konzentration ist der Intensität der Färbung umgekehrt proportional.

## 3. VORSICHTSMAßNAHMEN

Die volle Übereinstimmung mit den folgenden Regeln für eine gute Laborpraxis (GLP) wird zu vertrauenswürdigen Ergebnissen führen:

1. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (20°C-25°C).
2. Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Die Erzeugung von Schaum sollte dabei vermieden werden.
3. Wenn mit der Testdurchführung einmal begonnen ist, sollten alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung und innerhalb der empfohlenen Zeitgrenzen vollzogen werden.
4. Unmittelbar nach Entnahme der Reagenzien sollten die Flaschen wieder mit ihren Stopfen verschlossen werden. Die Verschlüsse dürfen nicht verwechselt werden!
5. Für jede Probe muss eine separate Einmal-Pipettenspitze verwendet werden, um eine Verschleppung bzw. Kreuzkontamination zu vermeiden.
6. Alle Proben und Standards sollten gleichzeitig getestet werden, so dass die Bedingungen für alle identisch sind.
7. Komponenten von verschiedenen Chargen dürfen nicht verwendet oder gemischt werden.
8. Reagenzien dürfen nach der Verfallszeit nicht benutzt werden.
9. Es sollten ständig die Präzision und die Richtigkeit für die Laborgeräte kontrolliert werden, die man für das Testverfahren benutzt (Mikropipetten, Washer, ELISA-Reader, etc.).

#### 4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Beim Einsatz von Proben menschlichen Ursprungs müssen Einmalhandschuhe getragen werden.
3. Der Kontakt der Stopp-Lösung mit Haut und Schleimhäuten sollte vermieden werden, da mögliche Reizungen, Verbrennungen oder Vergiftungsgefahr auftreten können. Sollte ein Kontakt entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.
4. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.

#### 5. REAGENZIEN

Der Kit enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen. Sie müssen bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf jeder Komponente sowie auf der Verpackung angegeben.

1. **SORB MT** Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit anti-Vitamin B<sub>12</sub>.
2. **CAL 1 – 6** Vitamin B<sub>12</sub> Standards: 6 Fläschchen mit je 0,5 mL (0; 0,4; 1; 4; 10; 40 ng/mL), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. **ENZ CONJ** Konjugat (Vitamin B<sub>12</sub>-Peroxidase), 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. **SUB TMB** Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
5. **STOP SOLN** Stopp-Lösung (1 N saure Lösung), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. **SAM DIL** Probenverdünnungspuffer (PBS), 2 x 60 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
7. **WASH SOLN 10x** Waschlösung (PBS + Tween 20), 30 mL als 10x-Konzentrat, blau eingefärbt. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
8. Arbeitsanleitung

#### 6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

##### Geräte

- 10 - 1000 µL-Mikropipetten
- Messkolben
- Mörser, Mixer
- Zentrifuge
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Plastikfolie
- Plastikbeutel

##### Reagenzien

- Kaliumhexacyanoferrat(II)-3-hydrat (150 g/L; Carrez I)
- Zinksulfat-7-hydrat (300 g/L; Carrez II)
- bidestilliertes Wasser
- 1 M Natronlauge
- 1 M Salzsäure
- PBS (8.77 g/L NaCl, 0.70 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O, 2.90 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O)



## 7. PROBENVORBEREITUNG

Das Vitamin wird aus der Probe mit bidestilliertem Wasser extrahiert. Nach dem Lösen wird der pH-Wert mit 1 M Natronlauge oder 1 M Salzsäure auf 6-7 eingestellt. Anschließend werden eventuell vorhandene Trübstoffe mit Carrez I (150 g/L Kaliumhexacyanoferrat(II)-3-hydrat) und Carrez II (300 g/L Zinksulfat-7-hydrat) gefällt. Der Extrakt wird auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und anschließend zentrifugiert. In kaltem Wasser schwer lösliche Proben können durch leichtes Erwärmen in Lösung gebracht werden. Nach der Zentrifugation werden die Proben im mitgelieferten Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt. Um störende Matrix- oder pH-Effekte auszuschließen, sollte hierbei mindestens 1:5 verdünnt werden. Empfohlen wird eine Verdünnung auf etwa 1-10 ng/mL, da hier die größtmögliche Genauigkeit bei der Messung erzielt wird.

Getreideprodukte enthalten üblicherweise geringe Konzentrationen an Vitamin B<sub>12</sub>. Um hohe Verdünnungen zu vermeiden, kann die Probe statt mit bidestilliertem Wasser direkt mit Probenverdünnungspuffer extrahiert werden. Die im Kit mitgelieferte Menge an Probenverdünnungspuffer ist hierfür nicht ausreichend. Der Puffer kann bei **Demeditec** separat bestellt werden.

### Multivitamin-tabletten und -kapseln

Die Tabletten bzw. Kapseln werden in bidestilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 6-7 eingestellt. Anschließend werden je 0,5 mL Carrez I und Carrez II zugegeben und auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Die Feststoffe werden abzentrifugiert und der Überstand mit Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt. Zum Lösen der Kapseln empfiehlt sich eine Erwärmung auf 30-40°C.

### Multivitamin-säfte

Der Saft wird auf pH 6-7 eingestellt, je 0,5 mL Carrez I und II zugegeben und mit bidestilliertem Wasser auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Die Feststoffe werden abzentrifugiert und der Überstand mit Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt.

### Multivitamin-marmelade

Die Marmelade wird im Mixer homogenisiert, ca. 8 g werden mit bidestilliertem Wasser versetzt, der pH-Wert auf 6-7 eingestellt und je 0,5 mL Carrez I und II zugegeben. Anschließend wird auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Die Feststoffe werden abzentrifugiert und der Überstand mit Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt.

### Getreideprodukte (Frühstücksflocken, Müsli)

3-5 g Probe werden mit einem Mörser oder einem Mixer homogenisiert, mit bidestilliertem Wasser versetzt, der pH-Wert auf 6-7 eingestellt und je 0,5 mL Carrez I und II zugegeben. Anschließend wird auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Die Feststoffe werden abzentrifugiert und der Überstand mit Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt. Da die in diesen Proben enthaltenen Vitamin B<sub>12</sub>-Konzentrationen üblicherweise sehr gering sind, kann die Probe auch in Probenverdünner aufgenommen und direkt im Test eingesetzt werden.

### Multivitamin-bonbons

Die Bonbons werden unter eventuellem Erwärmen in bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6-7 eingestellt und je 0,5 mL Carrez I und II zugegeben. Anschließend wird auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Die Feststoffe werden abzentrifugiert und der Überstand mit Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt.

### Milch

5 mL einer frischen Milchprobe (Vollmilch oder fettarme Milch) werden in ein Reagenzröhrchen pipettiert und 30 Minuten bei 2-8°C gekühlt. Anschließend wird 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Die obere Fettphase wird abgesaugt und verworfen. Die zurück bleibende wässrige Phase wird 1:5 in Probenverdünner verdünnt.

### Säuglingsnahrung

10 g Säuglingsnahrung werden in 25 mL PBS suspendiert und auf 50 mL aufgefüllt. Die Mischung wird 10 min intensiv gerührt und anschließend 3 min in kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen auf 20-25°C wird die Mischung 10 min bei 3000 g zentrifugiert. Die obere Fettphase wird abgesaugt und verworfen. Die zurück bleibende wässrige Phase wird 1:5 in Probenverdünner verdünnt.

**8. TESTDURCHFÜHRUNG**

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 50 µL Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben. Sofort im Anschluss in jede Vertiefung 50 µL des Vitamin B<sub>12</sub>-Peroxidase-Konjugates pipettieren.
3. Platte abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (oder 90 Minuten ohne Schüttler) inkubieren.
4. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
5. 100 µL Substratlösung zugeben.
6. Platte abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
7. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (1 N saure Lösung) beenden.
8. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 30 Minuten stabil.

**9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE**

1. Für jede Probe bzw. jeden Standard wird die gemittelte Extinktion berechnet.
2. Aus den gemittelten Werten der Standardreihe wird graphisch auf halblogarithmischem Millimeterpapier oder über ein EDV-Programm eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion jedes Standards (y-Achse) wird gegen die Konzentration in ng/mL (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ng/mL für Vitamin B<sub>12</sub> abgelesen.
4. Um die in einer Probe tatsächlich enthaltene Konzentration zu errechnen, muss der aus der Eichkurve abgelesene Wert noch mit einem entsprechenden Verdünnungsfaktor, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt, multipliziert werden. Bei Anwendung der Probenvorbereitungsmethode für Säuglingsnahrung ist der Verdünnungsfaktor 25.

**10. TYPISCHE STANDARDKURVE**

Die folgende Tabelle enthält ein Beispiel für eine Standardreihe. Die Extinktionen sind in Prozent der Extinktion des 0 ng/mL-Standards angegeben. Die Werte dieser Standardkurve sind nur als Beispiel bestimmt und dürfen nicht an Stelle der in jedem Test neu zu erstellenden Kurve verwendet werden.

Vitamin B <sub>12</sub> (ng/mL)	OD-% von 0 ng/mL
0	100
0,4	86
1	70
4	24
10	10
40	4

## 11. TECHNISCHE DATEN

### Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Vitamin B<sub>12</sub> Tests** beträgt 0,3 ng/mL bezogen auf die Standardkurve.

### Wiederfindung

Die Wiederfindung aufgestockter Proben wurde mit 98% bestimmt.

### Intraassay-Präzision

Der Intraassay-Variationskoeffizient des Vitamin B<sub>12</sub>-Tests wurde mit 3% bestimmt.












### Kreuzreaktionen

Kreuzreaktionen	relativ zu Vitamin B <sub>12</sub> (=100%)
Hydroxycobalamin	29%

## 12. LITERATUR

1. Thompson, MT et al; J. Biol. Chem. 184, 175 (1950).
2. Reichert, N, Rubach, K; Dt. Lebensmittel-Rundschau 86/10 (1990).
3. Miller A, Slingerland DW, Hall CA, Chu RC; Am J Hematol. 1998 Sep;59(1): 42-5.
4. Segal R, Baumoehl Y, Elkayam O, Levartovsky D, Litinsky I, Paran D, Wigler I, Habot B, Leibovitz A, Sela BA, Caspi D; Rheumatol Int. 2004 Jan;24(1):14-9. Epub 2003 Apr 29.
5. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM; Arch Neurol. 1998 Nov;55(11):1449-55.
6. Bernard MA, Nakonezny PA, Kashner TM; J Am Geriatr Soc. 1998 Oct; 46(10):1199-206.

**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS**

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Ussage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore