

# Product information

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



## User's Manual

# Vitamin B<sub>12</sub> Immuno- affinity Column

Sample Preparation and Concentration for the Quantitative Analysis  
of Vitamin B<sub>12</sub> with ELISA or HPLC

**REF**

DEB12A01



96

Capacity	> 200 ng
Recovery (spiked samples)	97 %

## 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 amongst others 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 **Vitamin B<sub>12</sub> Immunoaffinity Column (IAC)** is a helpful tool in specific isolation and enrichment of vitamin B<sub>12</sub> from different matrices. After the IAC procedure the eluate can be quantitatively analyzed by various analytical techniques like the **Vitamin B<sub>12</sub> ELISA** or HPLC.

## 2. PRINCIPLE OF THE METHOD

The **Vitamin B<sub>12</sub> Immunoaffinity Column** is based on the principle of an antibody-antigen reaction. A polyclonal antibody raised against vitamin B<sub>12</sub> is bound on a sepharose gel, which is fixed between two frits in a polypropylene column. By passing the sample solution through the column, vitamin B<sub>12</sub> is bound selectively by the antibody fixed on the sepharose gel. Unbound matrix material is removed in a wash step. Bound vitamin B<sub>12</sub> is eluted by a small amount of methanol (100%). This eluate is used for further quantification by ELISA, HPLC or any other appropriate analytical method.

## 3. PRECAUTIONS

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

1. Prior to beginning of the immunoaffinity column cleanup procedure, bring all reagents to room temperature (20-25 °C).
2. Once the cleanup procedure has been started, all subsequent steps should be completed without interruption.
3. Use a separate disposable tip for each specimen to prevent cross-contamination.
4. Do not use reagents after expiration date.
5. Check both precision and accuracy of the laboratory equipment used during the procedure (micro-pipets, 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 or any other material of biological origin.
3. Handling and disposal of chemical products must be done according to good laboratory practices (GLP).

## 5. CONTENT

10 immunoaffinity columns for the cleanup and concentration of vitamin B<sub>12</sub> containing samples.

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

### Instrumentation

- Syringe
- Pump unit
- Balance
- Homogenizer (mixer, magnetic stirrer)
- Clamp
- Centrifuge, filtering paper
- Funnel, beakers
- Micropipets

### Reagents

- Double distilled/deionised water
- Methanol (100 %)
- 0.01 M PBS
- Hydrochloric acid (1 N)
- Hydrochloric acid, concentrated (36 %)
- Sodium hydroxide (1 N)

## 7. SAMPLE PREPARATION

Basically all aqueous solutions can be used as samples. Make sure that the pH is at  $7.0 \pm 0.5$ . If this is not the case, use hydrochloric acid (1 N) or sodium hydroxide (1 N) for pH adjustment. If the sample is not clear, it must be filtered or centrifuged for not risking a blockade of the column.

### Solid samples

- Normally water soluble samples are analyzed. These are dissolved in double distilled water. After the dissolution, the pH is adjusted to  $7.0 \pm 0.5$ . Afterwards potential turbid matter is removed.
- Alternative to centrifugation or filtration, Carrez precipitation may be applied for sample clearance. Use 250  $\mu$ L Carrez I (150 g/L Potassiumhexacyanoferrate(II)-3-hydrate) and 250  $\mu$ L Carrez II (300 g/L Zincksulfate-7-hydrate) per 5 mL sample and remove the formed precipitate by centrifugation.
- Samples which are difficult to dissolve in cold water can be brought in solution by gentle warming.
- In the case the sample matrix is not water soluble (e.g. grain products) an appropriate amount of solid sample is crushed in a mortar or mixer to produce a fine to medium-fine powder. 2 g of this powder are extracted with 10 mL double distilled water. This mixture is agitated for 30 minutes on a horizontal shaker (120 / minute). Alternatively also a magnetic stirrer can be used. The mixture is filtrated or centrifuged afterwards for 5 minutes at 3000 g. The pH is adjusted to  $7.0 \pm 0.5$  prior to the column cleanup.

### Liquid samples

- Samples with a high fat content (e.g. full cream milk) should be centrifuged prior to use (2-8°C, 3000g, 15 minutes) to separate the fat.
- After removal of the fat layer the sample can be applied directly onto the column. If the sample is highly viscous it can be diluted 1:2 to 1:10 in 0.01 M PBS.
- Protein rich samples can be deproteinated prior to use. 20  $\mu$ L concentrated hydrochloric acid (36%) is added to 5 mL sample and incubated for 45 minutes at 60°C. The sample is centrifuged for 10 minutes at 3000 g and the pH is adjusted with sodium hydroxide solution (1 N).

## 8. PROCEDURE

1. For each sample use a new column.
2. Let column and sample reach ambient temperature before use.
3. Take off the upper cap of the column and cut the bottom of the cap horizontally using a knife. Then place the opened cap again onto the column.
4. Connect the column to the syringe and fix the whole combination with a clamp. Place a beaker under the column.
5. Fill prepared sample into the syringe. The necessary sample volume depends on the sensitivity to be reached with the following quantification technique. Uncap the lower end of the column.
6. The sample is passed through the column using gravity. Application of slight pressure might be helpful until the first drop appears at the lower end of the column.
7. After the binding the column is washed by adding 10 mL distilled water to the syringe and passing it through the column. Remove any unbound water from the gel by passing quickly 1-2 times air through the column using the pump unit.
8. Place a clean vial under the column. Add 1 mL methanol (100%) into the dry syringe and let it pass through under gravity. In case the methanol should not pass through immediately, push the first drop through the column using the pump unit. Do not elute in less than 1 minute!
9. Push some air through the column to elute the last drop of methanol.

## 9. PERFORMANCE

### Capacity

The capacity of the **Vitamin B<sub>12</sub> Immunoaffinity Column** was determined to be >200 ng.

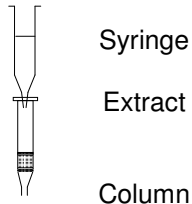
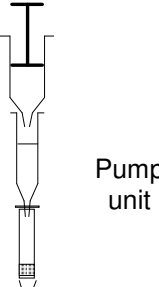
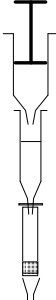
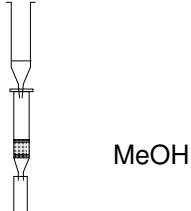

### Recovery

The recovery of spiked samples was determined to be 97%.

## 10. 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, Baumohl 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.

**11. WORKING SCHEME FOR ABSORPTION AND ELUTION**

A	B	C	D	E
 <p data-bbox="304 387 395 416">Syringe</p> <p data-bbox="304 450 395 479">Extract</p> <p data-bbox="304 535 395 564">Column</p>	 <p data-bbox="544 434 612 490">Pump unit</p>		 <p data-bbox="1054 495 1129 524">MeOH</p>	
<p data-bbox="236 602 400 685">Absorption of sample under gravity</p>	<p data-bbox="459 602 624 685">Washing step 10 mL dist. Water</p>	<p data-bbox="668 602 909 685">Removing of unbound water by passing air through IAC</p>	<p data-bbox="951 602 1177 685">Elution of vitamin B<sub>12</sub> with 1 mL MeOH under gravity</p>	<p data-bbox="1209 613 1374 674">ELISA or HPLC Analysis</p>

## 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 Immunoaffinitätssäule dient der spezifischen Isolierung und Anreicherung von Vitamin B<sub>12</sub> aus verschiedenen Probenmaterialien. Nach der Aufarbeitung kann die Probe durch verschiedene analytische Methoden - wie z.B. den Vitamin B<sub>12</sub>-ELISA - quantifiziert werden.

## 2. PRINZIP

Die Immunoaffinitätssäule basiert auf dem Prinzip der Antikörper-Antigenreaktion. Es ist ein polyklonaler Antikörper, der gegen Vitamin B<sub>12</sub> gerichtet ist, kovalent an die Oberfläche der in der Säule enthaltenen Gelmatrix gebunden. Hierauf wird die Vitamin B<sub>12</sub> enthaltende Probe gegeben. Matrixbestandteile passieren die Säule, während das Vitamin zurückgehalten wird. Nach Abtrennung der Matrix wird Vitamin B<sub>12</sub> mit Methanol von der Säule eluiert und kann für verschiedene analytische Nachweisverfahren eingesetzt werden.

## 3. VORSICHTSMAßNAHMEN

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

1. Vor der Testdurchführung müssen die Immunoaffinitätssäulen sowie alle einzusetzenden Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (20 °C-25 °C).
2. Wenn mit der Aufreinigung einmal begonnen ist, sollten alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung vollzogen werden.
3. Für jede Probe muss eine separate Einmal-Pipettenspitze verwendet werden, um eine Verschleppung bzw. Kreuzkontamination zu vermeiden.
4. Komponenten von verschiedenen Chargen dürfen nicht verwendet oder gemischt werden.
5. Reagenzien dürfen nach der Verfallszeit nicht benutzt werden.
6. Es sollten ständig die Präzision und die Richtigkeit für die Laborgeräte kontrolliert werden, die man für das Testverfahren benutzt (Mikropipetten etc.).

## 4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.

## 5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND GERÄTE

### Geräte:

- 1000 µl-Mikropipette
- Klemmvorrichtung
- Auffanggefäße
- Glaszylinder
- Spritze (20 ml)
- Gummistopfen
- Zentrifuge/Filterpapier

### Reagenzien:

- Methanol
- bidestilliertes Wasser
- 1 M Natronlauge
- 1 M Salzsäure

## 6. PROBENVORBEREITUNG

Als Proben können prinzipiell alle wässrigen, Vitamin B<sub>12</sub> enthaltenden Lösungen eingesetzt werden. Der pH-Wert sollte 7 +/- 0,5 betragen. Ist dies nicht der Fall, muss dieser mit 1 M Natronlauge oder 1 M Salzsäure eingestellt werden. Trübstoffe müssen durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt werden.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

1. Für jede zu untersuchende Probe wird eine neue Immunoaffinitätssäule verwendet.
2. Der obere farbige Säulenverschluss wird von der Säule entfernt, die Spitze abgeschnitten und wieder auf die Säule gesteckt.
3. Die Immunoaffinitätssäule wird mit dem Glasspritzenzylinder verbunden, in eine entsprechende Vorrichtung gespannt und ein Auffanggefäß unter die Säule gestellt.
4. Die Probe wird in den Glasspritzenzylinder gefüllt. Das einzusetzende Volumen richtet sich nach dem gewünschten Anreicherungsgrad. Anschließend wird die untere Verschlusskappe der Säule entfernt.
5. Die Probe wird ohne zusätzliches Drücken die Säule durchlaufen.
6. Nach dem Probenauftrag wird die Säule mit 10 ml bidestilliertem Wasser gespült. Dafür wird das Wasser in den Glasspritzenzylinder gefüllt und die aufgezoogene Spritze über den Gummistopfen mit dem Glasspritzenzylinder verbunden. Das Wasser wird mit der Spritze langsam durch die Säule gedrückt. Anschließend wird die Säule mit einem Spritzenvolumen trocken geblasen.
7. Für die Elution wird ein neues sauberes Auffanggefäß unter die Säule gestellt. 1 ml Methanol wird auf die Säule gegeben und wiederum ohne mechanische Hilfe eluiert. Durch das Trocknen der Säule im vorangegangenen Schritt ist es möglich, dass das Methanol nicht in das Säulenbett einsickern kann. In diesem Fall empfiehlt es sich, mit Hilfe der Spritze einen leichten Druck auszuüben, bis der erste Tropfen am Säulenausgang erscheint. Wenn das Methanol die Säule passiert hat, wird diese mit einem Spritzenvolumen trocken geblasen.

## 8. WIEDERFINDUNG

Die Wiederfindungsrate aufgestockter Proben wurde mit 97 % bestimmt.






## 9. SÄULENKAPAZITÄT

Die Säulenkapazität der Immunoaffinitätssäulen wurde mit > 200 ng Vitamin B<sub>12</sub> bestimmt.

## 10. LITERATUR

1. Thompson, M.T. et al; J. Biol. Chem. 184, 175 (1950).
2. Reichert, N., Rubach, K.; Dt. Lebensmittel-Rundschau 86/10 (1990).

**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS**

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso 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.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità