

Внесена в реестр МВИ под обозначением
O`zO`U 0530:2011 (RIDASCREEN®
Aflatoxin M₁ 30/15 Art. No.: R1111)

RIDASCREEN® Aflatoxin M₁ 30/15
Art. No.: R1111
(аутентичный перевод)

Иммуноферментный анализ для количественного определения Афлатоксина М₁

Тест-система для анализа в искусственных условиях
Хранить при (2 – 8) °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Адрес:
R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.de

По вопросам обращаться:

Телефон:

Центр / прием заказов (0 61 51) 81 02-0

Секретариат по маркетингу (0 61 51) 81 02-84

Телефакс / E-Mail:

Прием заказов (0 61 51) 81 02-20

orders@r-biopharm.de

Маркетинг

(0 61 51) 81 02-40

info@r-biopharm.de

RIDA® и RIDASCREEN® - зарегистрированная торговая марка R-Biopharm AG
Производитель: R-Biopharm AG, Дармштадт, Германия

R-Biopharm AG сертифицирован по ISO 9001

Краткое описание

RIDASCREEN® Aflatoxin M₁ 30/15 (Артикул №.:R1111) представляет собой набор для количественного определения афлатоксина В₁ в молоке, сухом молоке и сыре методом конкурентного иммуноферментного анализа.

Все необходимые для иммуноферментного анализа реагенты, включая стандарты (опорные образцы), входят в комплектацию набора.

Набор предназначен для 96 измерений (включая стандарты).

Для количественного анализа требуется микропланшетный ИФА-анализатор (ридер).

Пробоподготовка:	молоко: обезжиривание сухое молоко: восстановление и обезжиривание сыр: экстракция и центрифугирование
Затраты времени:	пробоподготовка (для 10 проб) молоко и сухое молоко.....около 0,5 часа сыроколо 2 часов проведение теста (время инкубации)1 час
Предел обнаружения:	молоко5 ppt сухое молоко (в пересчёте на восстановленное молоко)....5 ppt сухое молоко (в пересчёте на сухой образец).....50 ppt сыр.....50 ppt
Полнота извлечения:	в искусственно зараженном цельном молоке (10-80 ppt)около 95 % (коэффициент вариации: около 14%) сухое молоко:.....около 95 % сыр:.....около 102 % (коэффициент вариации: около 11%)
Специфичность:	Специфичность RIDASCREEN® афлатоксина M ₁ 30/15 была установлена посредством определения перекрёстной чувствительности к соответствующим микотоксинам. Афлатоксин M ₁100% Афлатоксин M ₂30%

1. Назначение

Тест RIDASCREEN® Aflatoxin M₁ 30/15 - конкурентный иммуноферментный анализ для количественного определения афлатоксина M₁ в молоке, сухом молоке и сыре.

2. Общие положения

Афлатоксины принадлежат к канцерогенным, высокотоксичным метаболитам плесневых грибов рода *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Афлатоксин M₁, так называемый молочный афлатоксин, образуется как метаболит афлатоксина B₁. Он выделяется с молоком после скармливания дойным коровам корма, содержащего афлатоксин B₁. Так как афлатоксин M₁ относительно устойчив при пастеризации молока, необходим не только регулярный обширный контроль обрабатываемого сырья, а также контроль готовых молочных продуктов.

С 1-го января 1999 года в странах Евросоюза введены единые нормы пределов содержания афлатоксинов. Для афлатоксина M₁ определен предел в 0,05 µg/L (50 ppt).

3. Принцип метода

В основе теста – взаимодействие антигенов с антителами. Лунки микротитровального планшета покрыты специфическими антителами, связывающимися с афлатоксином M₁.

Добавляются стандарты (опорные образцы) афлатоксина M₁ или исследуемые растворы и после процедуры промывки ферментный конъюгат афлатоксина M₁. Свободный афлатоксин M₁ и ферментный конъюгат афлатоксина M₁ конкурируют за места связывания антител (конкурентный иммуноферментный анализ). Свободный ферментный конъюгат афлатоксина M₁ затем удаляется в процессе промывки.

Далее в лунки планшета добавляется субстрат/хромоген. Связавшийся ферментный конъюгат афлатоксина M₁ преобразует бесцветный хромоген в вещество голубого цвета. Добавление стоп-раствора приводит к изменению цвета с голубого в желтый. Измерение проводится фотометрически при 450 nm. Оптическая плотность раствора в лунках обратно пропорциональна концентрации афлатоксина M₁ в образце.

4. Поставляемые реагенты

Каждый набор содержит достаточное количество материалов для 96 измерений (включая анализы стандартов (опорных образцов)). Каждая тест-система содержит:

- 1 x Микротитровальный планшет с 96 лунками (12 полос (стрипов) с 8 сменными лунками каждая), покрытыми антителами против афлатоксина M₁
- 6 x Растворы стандартов (опорных образцов) (каждый по 1,3 mL):
0 ppt (нулевой стандарт), 5 ppt, 10 ppt, 20 ppt, 40 ppt, 80 ppt афлатоксина M₁
в молочном буфере
- 1 x Конъюгат(1,3 mL).....красная крышка
афлатоксина M₁ с пероксидазой
концентрат
- 1 x Раствор субстрата/хромогена (10 mL).....коричневая крышка
подкрашен в красный цвет, содержит тетраметилбензидин
- 1 x Стоп-раствор(14 mL).....желтая крышка
содержит 1 N серную кислоту
- 1 x Буфер 1 (20 mL)
для разбавления проб
- 1 x Буфер 2 (12 mL).....белая крышка
для разбавления конъюгата
- 1 x Промывочный буфер (соль)
для приготовления 10 mM фосфатного буфера (pH 7,4)
содержит 0,05 % полисорбата Tween 20

5. Реагенты, оборудование и расходные материалы, необходимые дополнительно

5.1. Оборудование:

- спектрофотометр микротитровальных планшетов (450 nm)
- центрифуга
- пастеровские пипетки
- градуированные пипетки
- регулируемые микропипетки на 20 – 200 µL и 200 – 1000 µL

только для проб сыра:

- шейкер
- испаритель

5.2. Реагенты

только для проб сыра:

- метанол
- *n*-гептан
- дихлорметан
- фосфатный буфер, pH 7,2: 0,55 g NaH₂PO₄·H₂O + 2,85 g Na₂HPO₄ 2 H₂O + 9 g NaCl
растворить в дистиллированной воде и довести до объема 1000 mL

6. Предупреждения и меры предосторожности

Стандартные растворы содержат афлатоксин M₁. При работе необходимо предпринять особые меры предосторожности. Избегайте контакта реагентов с кожей (используйте перчатки).

Обеззараживание (деконтаминацию) стеклянной посуды и растворов, содержащих токсины, лучше всего проводить, используя 10 % раствор гипохлорита натрия. Соляной кислотой доведите pH раствора гипохлорита до 7, залейте раствор в загрязненную посуду и оставьте на ночь.

Стоп-раствор содержит в своем составе 1 N серную кислоту (R36/38, S2-26).

7. Инструкция по хранению реагентов

Храните комплект при температуре (2 – 8) °C. Не замораживайте.

Неиспользованные микролунки поместите в оригинальную упаковку из фольги и плотно закройте её вместе с прилагаемым осушителем. Храните при (2 – 8) °C.

Афлатоксины светочувствительны, поэтому избегайте попадания на стандартные растворы или экстракты прямого света.

Раствор субстрата/хромогена светочувствителен, поэтому избегайте попадания на него прямого света.

Нет принятой гарантии качества после истечения срока комплекта (смотри ярлык комплекта)

Не заменяйте реагенты в составе одного комплекта реагентами из другого комплекта с другим номером партии.

8. Признаки непригодности реагентов

- окрашивание красноватого раствора субстрата/хромогена в голубой цвет до добавления в лунки
- оптическая плотность в лунке с нулевым стандартом ниже 0,6 ($E_{450\text{ nm}} < 0,6$)

9. Пробоподготовка

Пробы должны храниться в прохладном темном месте, защищенном от попадания прямого света.

9.1. Пробы молока

- центрифугируйте пробы молока для обезжиривания: 10 min / 3500 g / 10°C (при отсутствии центрифуги с охлаждением, перед центрифугированием охладите пробы до 10° C)
- после центрифугирования, полностью удалите верхний жирный слой с помощью пастеровской пипетки
- внесите в каждую лунку планшета по 100 µL обезжиренного молока (обезжиренный супернатант)

9.2. Сухое молоко

- взвесьте 10 g сухого молока в пробирке и заполните деионизированной водой до 100 µL
- растворите путем размешивания в течение 5 минут
- далее следуйте п.9.1. пробоподготовки молока

9.3. Сыр

Представительную пробу сыра грубо растереть и тщательно перемешать без добавления жидкости.

Участки поверхности сыра с чрезмерным количеством плесени использовать нельзя, т.к. это влияет на результаты анализа.

- взвесьте 2 g размолотого сыра и поместите в плотно закрывающуюся стеклянную колбу
- добавьте 40 mL дихлорметана и экстрагируйте путем смешивания / встряхивания пробирки в течение 15 минут
- отфильтруйте суспензию, испарите 10 mL экстракта в слабом потоке азота при 60° C
- растворите маслянистый остаток в 0,5 mL метанола, 0,5 mL фосфатного буфера (см. 5.2) и, добавив в пробирку 1 mL гептана, тщательно смешайте

- центрифугируйте: 15 min / 2700 g / 15° C
- полностью удалите верхний гептановый слой
- с помощью пастеровский пипетки осторожно отберите нижний водно - метанольный слой
- разбавьте 100 µL полученного обезжиренного раствора 400 µL буфера 1 (раствор 1:5) и при анализе используйте 100 µL раствора на каждую лунку

Примечание - Если необходимо дальнейшее разбавление, используйте буфер 1 (см. п.4).

10. Порядок проведения тестирования

10.1. Предварительные указания

Перед использованием доведите все реагенты до комнатной температуры (20 – 25) °C.

Ферментный конъюгат афлатоксина M₁ (флакон с красной крышкой) поставляется в концентрированном виде. Поскольку у разбавленного ферментного конъюгата ограниченный срок хранения, перед анализом следует разбавлять только необходимое количество конъюгата буфером 2. Перед использованием ферментного конъюгата его необходимо осторожно встряхнуть. Для приготовления готового к использованию конъюгата разбавьте его буфером 2 в отношении 1:11 (1+10) (бутылка с белой крышкой): например, 400 µL концентрированного препарата + 4,0 mL буфера, достаточного для 4-х микротитровальных полос.

Для приготовления **моющего буфера** (фосфатно-солевой буфер с Tween 20) растворите содержимое прилагаемого пакетика буферной соли (см. 4) в 1 L дистиллированной воды. Готовый моющий буфер может храниться при (2 – 8) °C в течение 4-6 недель.

Как альтернатива: Растворите содержимое пакетика только в 100 mL дистиллированной воды, чтобы получить 10тикратно концентрированный моющий буфер. Этот раствор может храниться около 8-12 недель при комнатной температуре (20 – 25) °C.

Для приготовления готового к употреблению моющего буфера растворите одну часть этого концентрата в 9 частях дистиллированной воды.

10.2. Процедура анализа

Тщательно следуйте рекомендуемой процедуре промывки. В процессе выполнения анализа не допускайте высыхания микролунок.

1 Вставьте в рамку планшета микролунок в количестве, достаточном для всех стандартных растворов и проб для анализа в двух повторностях. Запишите положения лунок со стандартными растворами и пробами на планшете.

2 Добавьте пипеткой 100 µL стандартного раствора и заготовленные по методу, описанному в п.9, пробы для анализа в двух повторностях в соответствующие лунки. Перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию в темноте при комнатной температуре (20 - 25) °C в течение 30 минут.

3 Вылейте жидкость из лунок, переверните рамку планшета и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Промойте каждую лунку 250 µL моющего буфера (см. 10.1). Повторите эту процедуру ещё два раза.

4 После этого добавьте пипеткой по 100 µL готового раствора ферментного конъюгата в соответствующие лунки, перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию в темноте при комнатной температуре (20 - 25) °C в течение 15 минут.

5 Вылейте жидкость из лунок, переверните рамку планшета и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Промойте каждую лунку 250 µL моющего буфера (см. 10.1). Повторите эту процедуру ещё два раза.

6 Добавьте по 100 µL раствора субстрата/хромогена (коричневая крышка) в каждую лунку. Перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию при комнатной температуре (20 – 25)°C в течение 15 минут в темноте.

7 Добавьте в каждую лунку по 100 µL стоп-раствора (жёлтая крышка). Перемешайте, осторожно вращая планшет рукой. После добавления стоп-реагента измерьте оптическую плотность в каждой лунке при 450 nm относительно воздуха. Снимите показания не позднее 15 минут после добавления стоп-раствора.

11. Результаты

Специальное программное обеспечение RIDA® SOFT Win (Артикул № Z9999) доступно для RIDASCREEN® ферментных иммунохимических анализов.

Траектория стандартной кривой показана в Сертификате Гарантии Качества, вложенный в тест комплект.

Замечание для расчета без программного обеспечения

$$\frac{\text{Оптическая плотность стандарта (или пробы)}}{\text{Оптическая плотность нулевого стандарта}} \times 100 = \% \text{ оптической плотности}$$

Нулевой стандарт, таким образом, приравнивается 100 %, а величины оптической плотности указываются в процентах. Вычисленные значения для стандартов (опорных образцов) фиксируются в системе координат на бумажной полулогарифмической кривой в отношении к концентрации (массовой доле) афлатоксина M₁ [ng/L].

Для того чтобы вычислить концентрацию афлатоксина M₁ в ng/L (ppt) в исходной пробе, величину концентрации афлатоксина M₁, полученную по калибровочной кривой, следует умножить на соответствующий фактор разбавления. При выполнении анализа в соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения:

молоко	1
сухое молоко (в пересчёте на восстановленное молоко).....	1
сухое молоко (в пересчёте на сухой образец).....	10
сыр.....	10

R-Biopharm AG гарантирует стандартное качество всех материалов, входящих в состав набора. В случае изначального дефекта каких-либо материалов R-Biopharm обеспечивает их замену. R-Biopharm AG не отвечает за любые повреждения, вытекающие из-за некорректной работы с набором, а так же не покрывает расходы, связанные напрямую или косвенно с неправильным применением данного набора.