

Внесена в реестр МВИ под обозначением  
O`zO`U 0535:2011 (RIDASCREEN®  
Zearalenon Art. No.: R1401)

**RIDASCREEN® Zearalenon**  
**Art. No.: R1401**  
(аутентичный перевод)

## **Иммуноферментный анализ для количественного определения Зеараленона**

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](http://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](mailto:orders@r-biopharm.de)

Маркетинг

(0 61 51) 81 02-40

[info@r-biopharm.de](mailto: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® Zearalenon (Артикул №.: R1401) представляет собой набор для количественного определения зеараленона в зерне, кормах, пиве, сыворотке и моче 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:	Зерно и корма: экстракция, фильтрование и разбавление Пиво: дегазация и разбавление Сыворотка и моча: хроматографическая очистка на колонках RIDA® C18 column (Артикул № R2002)
Затраты времени:	пробоподготовка (для 10 проб) зерно и корма.....около 20 минут пиво .....около 10 минут сыворотка и моча .....около 3,5 часа проведение анализа (время инкубации) ....2,5 часа
Предел обнаружения:	Зерно и корма .....около 1750 ppt Пиво .....около 250 ppt Сыворотка и моча .....около 50 ppt
Полнота извлечения:	В искусственно зараженных пробах зерна и кормов .....около 80 % (средний коэффициент вариации 15 %)
Специфичность:	Специфичность анализа RIDASCREEN® Zearalenon была установлена посредством определения перекрёстной чувствительности к соответствующим микотоксинам. Зеараленон.....100 % Зеараленон α.....около 41,6 % Зеранол (зеараланол).....около 27,7 % Зеараленон β.....около 13,8 %

**За счет перекрестной реакции к запрещенному в ЕС средству для роста скота зеранолу (зеараланолу) тест RIDASCREEN® Zearalenon может использоваться для определения остатков зеранола до границы определения в 150 ng/L (ppt) в моче.**

## 1. Назначение

Тест RIDASCREEN® Zearalenon - конкурентный иммуноферментный анализ для количественного определения зеараленона в зерне, кормах, пиве, сыворотке и моче.

## 2. Общие положения

Микотоксин зеараленон образуется грибом рода *Fusarium*. Зеараленон является фитогормоном, который, помимо анаболических свойств, оказывает главным образом эстрогенное действие. Из-за его эстрагенных свойств зеараленон может вызывать нарушения биопродуктивности у животных с клиническими признаками гиперэстрогенизма – вид заболевания, которое, хоть и наблюдается в основном у домашних свиней, поражает и другие виды животных, таких как коровы, лошади и овцы.

На тему о потенциальном риске для здоровья человека, вызванном этим микотоксином, который усваивается с пищей животного или растительного происхождения, ведутся интенсивные дискуссии.

## 3. Принцип метода

В основе теста - взаимодействие антигенов с антителами. Лунки микротитровального планшета покрыты специфическими антителами против зеараленона. Добавляются стандарты (опорные образцы) зеараленона или растворы проб, а также ферментный конъюгат зеараленона. Свободный зеараленон и ферментный конъюгат зеараленона конкурируют за места связывания антител зеараленона (конкурентный иммуноферментный анализ). Несвязавшийся ферментный конъюгат зеараленона затем удаляется в процессе промывки. В лунки добавляется субстрат и хромоген, связавшийся ферментный конъюгат преобразует хромоген в вещество голубого цвета. Добавление стоп-раствора приводит к изменению цвета с голубого на желтый. Измерение проводится фотометрически при 450 nm. Оптическая плотность

раствора обратно пропорциональна концентрации (массовой доле) зеараленона в образце.

#### 4. Поставляемые реагенты

Каждый набор содержит достаточное количество материалов для 96 измерений (включая стандартные растворы). Каждая тест-система содержит:

- 1 x Микротитровальный планшет с 96 лунками (12 полос (стрипов) с 8 сменными лунками каждый), покрытый антителами к зеараленону
- 6 x Растворы стандартов (опорных образцов), (каждый по 1,3 mL), 0 ppt (нулевой стандарт), 50 ppt, 150 ppt, 450 ppt, 1350 ppt, 4050 ppt зеараленона в водном растворе
- 1 x Конъюгат (0,7 mL).....красная крышка  
зеараленона с пероксидазой  
концентрат
- 1 x Субстрат (7 mL) .....зеленая крышка  
Содержит пероксид мочевины
- 1 x Хромоген (7 mL).....голубая крышка  
Содержит тетраметилбензидин
- 1 x Стоп-раствор (14 mL).....желтая крышка  
содержит 1 N серную кислоту
- 1 x Буфер 1 (50 mL) .....белая крышка  
Для разбавления проб и конъюгата

#### 5. Реагенты, оборудование и расходные материалы, необходимые дополнительно

##### 5.1. Оборудование:

- спектрофотометр микротитровальных планшетов (450 nm)
- лабораторная мельница
- лабораторный шейкер
- для пробоподготовки: фильтровальная воронка и стеклянная колба (100 mL)
- фильтровальная бумага: Whatman No.1 или аналогичная
- градуированный цилиндр (пластмассовый или стеклянный) (100 mL)
- центрифуга
- роторный испаритель
- пастеровские пипетки
- регулируемые микропипетки на 20 – 200 µL и 200 – 1000 µL

##### 5.2. Реагенты

- метанол для анализа

Дополнительно для подготовки сыворотки / мочи:

- глюкуронидаза/ арилсульфатаза из *Helix pomatia* (Merck, Артикул № 4114)
- 50 mM буфера ацетата натрия, pH 4,8
- 20 mM буфера Tris, pH 8,5 / метанол (80/20; по объему)
- колонка RIDA® C18 (Артикул № R2002)

#### 6. Предупреждения и меры предосторожности

Стандартные растворы содержат зеараленон. При работе необходимо соблюдать особые меры предосторожности. Избегайте контакта реагентов с кожей (используйте перчатки).

Обеззараживание (деконтаминацию) стеклянной посуды и растворов, содержащих зеараленон 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 1N 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 температуре (2 – 8) °C.

Зеараленон светочувствителен, поэтому избегайте попадания на него прямого света.

Прозрачный раствор хромогена светочувствителен, поэтому избегайте попадания на него прямого света.

Не используйте тест-систему с истекшим сроком годности, указанным на ярлыке комплекта, так как гарантия качества в этом случае аннулируется.

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. Зерно и корма

Представительную пробу (отобранную по официальным предписаниям) растереть в порошок и тщательно перемешать в смесителе.

- взвесьте 5 g размельченной пробы и добавьте 25 mL метанола/воды (70/30) \*)
- тщательно перемешивайте в течение 3 минут (вручную или с помощью шейкера)
- центрифугируйте экстракт: 10 минут / 3500 g / комнатная температура (20 – 25) °C или профильтруйте экстракт через фильтровальную бумагу
- 1 mL фильтрата или супернатанта разбавьте буфером для разбавления проб (буфер 1) в соотношении 1:7 (1 + 6) (например 100 µL супернатанта или фильтрата + 600 µL буфера 1)

- используйте при анализе 50 µL разведённого фильтрата на лунку планшета

\*) Объем пробы может быть увеличен пропорционально раствору метанола/воды, например 10 g в 50 mL метанол/вода (70/30)

### Примечание:

Метаноловый экстракт (фильтрат или супернатант) можно хранить в холодильнике при (2 – 8) °C в течение двух недель или в морозильной камере (при -20 °C) в течение двух месяцев. Используйте стеклянную посуду (коричневое стекло) и храните в темном месте.

Если ожидаются высокие концентрации зеараленона, необходимо дальнейшее разбавление буфером для разбавления проб (буфер 1).

### 9.2. Пиво

- используя достаточный объем пробы пива удалите CO<sub>2</sub> (посредством фильтрации или помешивания) до исчезновения видимых пузырьков
- дегазированную пробу пива разбавьте буфером для разбавления проб (буфер 1) в соотношении 1:5 (1+4), например 100 µL пробы + 400 µL буфера 1.
- для тестирования используйте по 50 µL на лунку

### Примечание:

Мутные пробы пива (например нефильтованное) должны пройти стерилизующее фильтрование перед дегазацией до тестирования!

### 9.3. Сыворотка и моча

Подготовка только для мочи:

- разбавьте 0,5 mL мочи 3 mL 50 mM буфера ацетата натрия, pH 4,8
  - добавьте 8 µL глюкуронидазы/арилсульфатазы *Helix pomatia*
  - инкубируйте в течение 3 часов при температуре 37 °C
- 3,5 mL гидролизата мочи или 0,5 mL сыворотки (без подготовки) очищаются на колонках RIDA® C18 (Артикул № R2002) следующим образом:
- скорость 1 капля в секунду
  - промойте колонку 3 mL метанола (100 %)
  - уравновесьте колонку 2 mL 20 mM Трис-буфера, pH 8,5 / метанол (80/20)
  - нанесите 3,5 mL гидролизата мочи или 0,5 mL сыворотки
  - промойте колонку 2 mL 20 mM Трис-буфера, pH 8,5 / метанол (80/20)
  - промойте колонку 3 mL метанола (40 %)
  - осушите колонку воздухом или потоком азота в течение 1 минуты
  - медленно элюируйте пробу (15 капель в минуту) 1 mL метанола (80 %)
  - испарите элюат при максимальной температуре 60 °C (желательно при слабом потоке азота под вытяжкой)
  - растворите сухой остаток в 50 µL метанола, добавьте 450 µL буфера 1 и тщательно перемешайте
  - используйте в тесте по 50 µL на лунку

**Примечание:**

По запросу вы можете получить приложения для проб мяса и молока.

## **10. Порядок проведения тестирования**

### **10.1 Предварительные указания**

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

**Ферментный конъюгат зearаленона** (флакон с красной крышкой) поставляется в концентрированном виде. Поскольку у разбавленного раствора конъюгата ограниченный срок хранения, перед анализом следует разбавлять только необходимое количество концентрата конъюгата буфером. Перед использованием концентрата конъюгата его необходимо осторожно встряхнуть. Для приготовления готового к использованию раствора конъюгата разбавьте его буфером 1 (см. 4), в отношении 1:11 (1+10) (флакон с белой крышкой, например, 200 µL концентрата + 2 mL буфера, достаточно для 4-х микротитровальных стрипов).

### **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 и исследуемых растворов для тестирования в двух повторностях. Запишите положения лунок со стандартными и исследуемыми растворами на планшете.

2 Добавьте по 50 µL стандартного или исследуемых растворов в соответствующие лунки для тестирования в двух повторностях.

3 Добавьте по 50 µL разбавленного ферментного конъюгата в соответствующие лунки. Перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию в течение 2 часов при комнатной температуре (20 – 25) °C в темноте.

4 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. Заполните все лунки по 250 µL дистиллированной воды, и снова вылейте жидкость. Повторите процедуру промывки лунок еще два раза.

5 Добавьте по 50 µL субстрата и хромогена в каждую лунку. Перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию при комнатной температуре (20 – 25) °C в течение 30 минут в темноте.

6 Добавьте в каждую лунку по 100 µL стоп-раствора. Перемешайте, осторожно вращая планшет рукой и измерьте оптическую плотность в каждой лунке при 450 nm. Снимите показания не позднее 30 минут после добавления стоп-раствора.

## 11. Результаты

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

Для одиночных определений мы рекомендуем Logit/log оценку, для двух или многократных определений может быть использован Cubic Spline.

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) зеараленона [ppt].

Концентрация зеараленона в ppt считывается по градуировочной кривой соответственно относительному поглощению каждой пробы.

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

Зерно и корма .....	35
Пиво.....	5
Сыворотка и моча .....	1

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.