

Внесена в реестр МБИ под обозначением
O`zO`U 0529:2011 (RIDASCREEN®
Aflatoxin B₁ 30/15 Art. No.: R1211)

RIDASCREEN® Aflatoxin B₁ 30/15
Art. No.: R1211
(аутентичный перевод)

Иммуноферментный анализ для количественного определения Афлатоксина В₁

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 B₁ 30/15 (Артикул №.:R1211) представляет собой набор для количественного определения афлатоксина В₁ в зерне и кормах 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: размельчение, экстракция, фильтрование и разбавление
Затраты времени:	пробоподготовка (для 10 проб) зерно и корма.....около 30 минут проведение анализа (время инкубации)45 минут
Предел обнаружения:	1 ppb
Полнота извлечения:	80 % – 100 % в искусственно зараженных пробах злаков (коэффициент вариации приблизительно 8 %)
Специфичность:	Специфичность анализа RIDASCREEN® Aflatoxin B ₁ 30/15 была установлена посредством определения перекрёстной чувствительности к соответствующим веществам. Афлатоксин В ₁100 % Афлатоксин G ₁ приблизительно 29 % Афлатоксин В ₂ приблизительно 13 % Афлатоксин G ₂ приблизительно 3,2 % Афлатоксин М ₁ приблизительно 1,5 %

1. Назначение

Тест RIDASCREEN® Aflatoxin B₁ 30/15 - конкурентный иммуноферментный анализ для количественного определения афлатоксина В₁ в зерне и кормах.

2. Общие положения

Афлатоксины являются вторичными метаболитами плесневых грибов рода *Aspergillus flavus*, *parasiticus* и *nomius*. Эти грибы встречаются во влажных тропических областях и контаминация растительных продуктов питания происходит в странах культивирования. Афлатоксины относятся к сильнейшим канцерогенным веществам природного происхождения.

Афлатоксин В₁, который почти всегда встречается вместе с афлатоксином В₂, G₁ и G₂, является афлатоксином с наибольшей токсической значимостью. Он находится в основном в кукурузе, арахисе и бразильских орехах, хлопковом семени и фисташках.

В связи с токсичностью этих микотоксинов в странах ЕС установлены единые максимально допустимые уровни содержания микотоксинов - 2 ppb для афлатоксина В₁ и 4 ppb для общего содержания афлатоксинов.

3. Принцип метода

В основе теста – взаимодействие антигенов с антителами. Лунки микротитровального планшета покрыты антителами захвата, связывающимися с анти-афлатоксиновыми антителами.

Добавляются стандарты (опорные образцы) афлатоксина или исследуемые растворы, ферментный конъюгат афлатоксина и анти-афлатоксиновые антитела. Свободный афлатоксин и ферментный конъюгат афлатоксина конкурируют за места связывания антител афлатоксина (конкурентный иммуноферментный анализ). Одновременно анти-афлатоксиновые антитела связываются неподвижными антителами захвата. Свободный ферментный конъюгат затем удаляется в процессе промывки. Далее в лунки планшета добавляется субстрат/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 в лунках обратно пропорциональна концентрации (массовой доле) афлатоксина 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 с 8 сменными лунками каждая), покрытый антителами захвата
- 6 x Стандарты (опорные образцы) (афлатоксина В₁ *), (каждый по 1,3 mL):
0 ppb (нулевой стандарт); 5 ppb; 10 ppb; 20 ppb; 50 ppb
Афлатоксин В₁ в метаноле/воде
готов к употреблению
- 1 x Конъюгат (6 mL).....красная крышка
пероксидаза, связанная афлатоксином В₁
готов к употреблению
- 1 x Анти-афлатоксиновые антитела (6 mL).....чёрная крышка
готовы к употреблению
- 1 x Раствор субстрата/хромогена (10 mL).....коричневая крышка
подкрашен в красный цвет
- 1 x Стоп-раствор (14 mL).....желтая крышка
содержит 1 N серную кислоту
- 1 x Буферная соль (пакетик) = моющий буфер
для приготовления 10 mM фосфатного буфера (pH 7,4)
содержит 0,05 % полисорбата Tween 20

*) В указанных концентрациях учтен фактор разбавления - 10, который следует из процедуры пробоподготовки. Концентрации (массовые доли) афлатоксина В₁ в образцах определяются непосредственно по калибровочной кривой.

5. Реагенты, оборудование и расходные материалы, необходимые дополнительно

5.1. Оборудование:

- спектрофотометр микротитровальных планшетов (450 nm)
- градуированный цилиндр (пластиковый или стеклянный), 100 mL
- стеклянная посуда для подготовки экстракта пробы: фильтровальная воронка и колба (50 mL)
- дробилка (мельница)
- необязательно: шейкер
- фильтровальная бумага: Whatman No.1 или аналогичная
- градуированные пипетки
- регулируемые микропипетки на 20 – 200 µL и 200 – 1000 µL

5.2. Реагенты

- метанол
- раствор метанола с объемной долей 70 %: готовится смешением 70 mL метанола (100 %) с 30 mL дистиллированной воды
- дистиллированная или деионизированная вода

6. Предупреждения и меры предосторожности

Стандартные растворы содержат афлатоксин В₁. 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 имеющимся осушителем. Храните при температуре (2 – 8) °C.

Афлатоксин В₁ светочувствителен, поэтому избегайте попадания на стандартные растворы и 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 месте, защищенном от попадания прямого света.

Представительную пробу (отобранную по официальным предписаниям) перед экстракцией необходимо размельчить и перемешать.

- взвесьте 5 г размельчённой пробы и добавьте 25 mL метанола с объемной долей 70 % *).

- тщательно перемешайте в течение 3 минут (вручную или с помощью шейкера).

- профильтруйте экстракт через фильтровальную бумагу Whatman No.1 (или аналогичную).

- разбавьте 1 mL фильтрата 1 mL дистиллированной или деионизированной воды.

- в тесте используют 50 µL разбавленного фильтрата на лунку.

*) если необходимо объём пробы может быть увеличен, но объём метанол/вода должен быть соответственно адаптирован, например 10 g в 50 mL метанола с объемной долей 70 %.

Примечание - Если ожидается высокая концентрация афлатоксина, требуется дальнейшее разбавление. Пробы, предназначенные для применения в тесте, должны всегда находиться в растворе метанол/вода (35/65)!

10. Порядок проведения тестирования

10.1. Предварительные указания

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

Стандартные растворы афлатоксина В₁ поставляются в готовом к использованию виде. Концентрация стандартных растворов, приведенная на этикетках, дана с учётом фактора разбавления 10, таким образом концентрация афлатоксина В₁ считается непосредственно по стандартной кривой.

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 в только 100 mL дистиллированной воды чтобы получить 10тикратно концентрированный моющий буфер. Этот раствор может

храниться около 8-12 недель при комнатной температуре (20 – 25) °С.

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 микролунки в количестве, достаточном для всех стандартных и исследуемых растворов. Запишите положения лунок со стандартными и исследуемыми растворами на планшете.

2 Добавьте пипеткой 50 µL стандартного или исследуемого раствора в соответствующие лунки. Для каждого раствора используйте новые наконечники на пипетки.

3 Добавьте по 50 µL ферментного конъюгата (красная крышка) в соответствующие лунки.

4 Добавьте по 50 µL раствора анти-афлатоксиновых антител (чёрная крышка). Перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию при комнатной температуре (20 – 25) °С в течение 30 минут (+/- 1).

5 Вылейте жидкость из лунок, переверните рамку планшета и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем тройкратного 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) °С в течение 15 минут (+/- 1) в темноте.

7 Добавьте в каждую лунку по 100 µL стоп-раствора (жёлтая крышка). Перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и измерьте оптическую плотность при 450 nm. 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.

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) афлатоксина B₁ [ppb].

Концентрация (массовая доля) афлатоксина B₁ в ppb соответствующая оптической плотности каждой пробы может быть считана по калибровочной кривой.

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.