

Внесена в реестр МВИ под обозначением  
O`zO`U 0533:2011 (RIDASCREEN®  
Ochratoxin A 30/15 Art. No.: R1311)

**RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15**  
**Art. No.: R1311**  
**(аутентичный перевод)**

## **Иммуноферментный анализ для количественного определения Охратоксина А**

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® Ochratoxin A 30/15 (Артикул №.:R1311) представляет собой набор для количественного определения охратоксина А в зерне, кормах, пиве и сыворотке свиной крови 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, центрифугирование или фильтрование Пиво и свиная сыворотка: экстракция, центрифугирование, фильтрование, перемешивание, повторная экстракция, центрифугирование и выпаривание
Затраты времени:	пробоподготовка (для 10 проб) зерно и корма.....около 0,5 часа пиво и сыворотка свиной крови.....около 2,5 часа проведение анализа (время инкубации) .....45 минут
Предел обнаружения:	зерно и корма (9.1).....2,5 ppb зерно и корма (9.2).....1,25 ppb пиво и сыворотка свиной крови.....около 50 ppt
Полнота извлечения:	в зерне и кормах.....около 100 % в пиве и свиной сыворотке.....около 100 %
Специфичность:	Специфичность анализа RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 была установлена посредством определения перекрёстной чувствительности к соответствующим микотоксинам. Охратоксин А.....100% Охратоксин С.....44% Охратоксин В.....14% Охратоксин α.....< 0,1%

## 1. Назначение

Тест RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 - конкурентный иммуноферментный анализ для количественного определения охратоксина А в зерне, кормах, пиве и свиной сыворотке.

## 2. Общие положения

Микотоксин охратоксин А относится к метаболитам плесневых грибов рода *Aspergillus* и *Penicillium*. Наряду с выраженной нефротоксичностью, охратоксин А обладает гепатоксичными, тератогенными, канцерогенными и иммуносупрессивными свойствами.

Угроза здоровью человека состоит в контаминации охратоксином продуктов питания как растительного, так и животного происхождения. Так, охратоксин А был найден как в свиных крови и почках, так и в человеческой крови и материнском молоке.

## 3. Принцип метода

В основе теста - взаимодействие антигенов с антителами. Лунки стрипов микротитровального планшета покрыты специфическими антителами, связывающимися с охратоксином А. Добавляются стандарты (опорные образцы) охратоксина или исследуемые растворы, а также ферментный конъюгат охратоксина А. Свободный охратоксин А и ферментный конъюгат охратоксина А конкурируют за места связывания антител охратоксина А (конкурентный иммуноферментный анализ). Несвязавшийся ферментный конъюгат охратоксина А 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 обратно пропорциональна концентрации (массовой доле) охратоксина А в образце.

#### 4. Поставляемые реагенты

Реагенты одного комплекта рассчитаны на проведение 96 измерений (включая анализы стандартных растворов). Каждая тест-система содержит:

- 1 x Микротитровальный планшет с 96 лунками (12 полос (стрипов) с 8 сменными лунками каждая), покрытый антителами к охратоксину А
- 6 x Растворы стандартов (опорных образцов) охратоксина А (каждый по 1,3 mL) 0 ppt (нулевой стандарт), 50 ppt, 100 ppt, 300 ppt, 900 ppt, 1800 ppt охратоксин А в водном растворе
- 1 x Конъюгат (0,7 mL).....красная крышка охратоксина А с пероксидазой концентрат
- 1 x Субстрат/хромоген (10 mL).....коричневая крышка содержит тетраметилбензидин, подкрашен в красный цвет
- 1 x Стоп-раствор (14 mL).....желтая крышка содержит 1 N серную кислоту
- 1 x Буфер (7 mL).....белая крышка буфер для разбавления конъюгата
- 1 x Моющий 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
- роторный испаритель или микроиспаритель
- лабораторный шейкер
- дробилка (мельница)
- магнитная мешалка
- фильтровальная воронка и фильтровальная бумага
- пастеровские пипетки
- градуированные пипетки
- регулируемые микропипетки на 20 – 200 µL и 200 – 1000 µL

##### 5.2. Реагенты

- 1 N HCl
- дихлорметан
- 0,13 M буфер гидрокарбоната натрия (NaHCO<sub>3</sub>), подстраивается до pH 8,1

#### 6. Предупреждения и меры предосторожности

Стандартные растворы содержат охратоксин А. 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 раствор с объемной долей гипохлорита натрия 10 %. 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 прилагающимся осушителем. Храните при температуре (2 – 8) °C.

Охратоксин А светочувствителен, поэтому избегайте попадания на стандартные растворы охратоксина А прямого света.

Раствор субстрата/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 месте, защищенном от попадания прямого света.

### 9.1. Зерно и корма

**Пробоподготовка для быстрого и простого скрининга (предел обнаружения 2,5 ppb)**

- представительную пробу необходимо размельчить с помощью лабораторной мельницы и хорошо перемешать.
- 5 g размельчённого зерна перемешайте со 100 mL 0,13 M гидрокарбонатного буфера (см 5.2.)
- тщательно встряхивайте в течение 15 минут
- профильтруйте экстракт через фильтровальную бумагу или отцентрифугируйте: 15 минут / 3500 g / комнатная температура (20 – 25) °C
- при анализе используйте 50 µL на лунку

### 9.2. Зерно и корма

**Пробоподготовка для скрининга с большей чувствительностью (предел обнаружения 1,25 ppb)**

- представительную пробу необходимо размельчить с помощью лабораторной мельницы и хорошо перемешать.
- взвесьте 2 g пробы и поместите в центрифужную пробирку с закручивающейся крышкой
- добавьте 5 mL 1 N HCl и перемешивайте/встряхивайте в течение 5 минут
- добавьте 10 mL дихлорметана и встряхивайте в течение 15 минут (рекомендуется держать при этом пробирку в горизонтальном положении)
- центрифугируйте: 15 минут / 3500g / 15 °C
- отберите и удалите весь верхний водный слой до межфазной прослойки
- межфазную прослойку и нижний дихлорметановый слой профильтруйте через фильтровальную бумагу, чтобы дихлорметановый экстракт оказался в новой центрифужной пробирке с закручивающейся крышкой
- в фильтрат добавьте такой же объём 0,13 M буфера гидрокарбоната натрия (см. 5.2) и встряхивайте в течение 15 минут
- центрифугируйте: 15 минут / 3500g / 15 °C
- разбавьте 100 µL верхнего водного слоя с 400 µL 0,13 M буфера гидрокарбоната натрия
- при анализе внесите в каждую лунку по 50 µL

### 9.3 Пиво и сыворотка свиной крови

- центрифугируйте сыворотку

- помещайте пиво и профильтруйте (для удаления CO<sub>2</sub>)
- в 2 mL пробы добавьте 2,5 mL 1 N HCl и 4 mL дихлорметана (в центрифужной пробирке с закручивающейся крышкой)
- размешивайте / встряхивайте в течение 5 минут
- центрифугируйте: 15 минут / 3500g / 15 °C
- полностью удалите верхний водный слой
- для удаления межфазной прослойки профильтруйте дихлорметановый экстракт через фильтровальную бумагу и отберите экстракт
- переместите 2 mL дихлорметанового экстракта в новую центрифужную пробирку с закручивающейся крышкой
- встряхивайте дихлорметановый экстракт с 2 mL 0,13 M буфера гидрокарбоната натрия (см. 5.2) в течение 5 минут
- центрифугируйте: 5 минут / 3500g / 15 °C
- отберите экстракт гидрокарбоната натрия
- повторите процедуру экстракции и центрифугирования
- отберите обе порции гидрокарбонатных экстрактов NaHCO<sub>3</sub> и добавьте к ним 0,75 mL 1 N HCl и 2 mL дихлорметана
- тщательно встряхивайте в течение 10 минут (с помощью шейкера)
- центрифугируйте: 5 минут / 3500g / 15 °C
- отберите верхний водный слой и полностью выпарьте дихлорметановый экстракт при 60 °C (по возможности в слабом потоке азота в вытяжном шкафу)
- растворите остаток в 1 mL гидрокарбонатного буфера (см. 5.2)
- для анализа используйте по 50 µL подготовленного раствора на лунку планшета

**Примечание:**

По запросу можно получить следующие методики анализа:

- для тканей (печень и почки)
- в комбинации с RIDA® Ochratoxin A column (R1303) для обжаренного и зеленого кофе, для сухофруктов и для вина
- в комбинации с иммуноаффинными колонками OCHRAPREP® (RBRP14 / RBRP14B) для красного перца.

## 10. Порядок проведения тестирования

### 10.1. Предварительные указания

**Ферментный конъюгат охратоксина А** (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 с буфером. Перед использованием концентрата конъюгата его необходимо осторожно встряхнуть. Для приготовления готового к использованию раствора конъюгата разбавьте его буфером (см. 4), в отношении 1:11 (1+10), например, 200 µL концентрата + 2 mL буфера, этого объема достаточно для 4-х микротитровальных стрипов).

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) °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 и исследуемых растворов в двойном измерении. Запишите положения лунок со стандартными и исследуемыми растворами на планшете.

2 Добавьте по 50 µL стандартного или исследуемых растворов (подготовленных по п.9 для анализа в двух повторностях) в соответствующие лунки. Для каждого раствора используйте новые наконечники для пипеток.

3 Добавьте по 50 µL разбавленного раствора ферментного конъюгата в соответствующие лунки, перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию при комнатной температуре (20 – 25) °C в течение 30 минут в темноте

4 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.

5 Добавьте по 100 µL раствора субстрата/хромогена в каждую лунку. Перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию при комнатной температуре (20 – 25) °C в течение 15 минут (± 1 минута) в темноте.

6 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 30 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) охратоксина А [ppt].

Для того чтобы вычислить концентрацию (массовую долю) охратоксина А в ppt или ppb в исходной пробе, величину концентрации охратоксина А, 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 (9.1).....	20
Зерно и корма (9.2).....	25
Пиво и сыворотка свиной крови.....	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.