



РОССИЙСКИЕ
ИННОВАЦИОННЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ
КОНТРОЛЯ
БЕЗОПАСНОСТИ
ПИЩЕВОЙ
ПРОДУКЦИИ



www.dtsbiotech.com

Набор для
иммуноферментного
анализа
ТЕСТСИП®

Охратоксин А

2,0-40,0 мкг/кг

ИНСТРУКЦИЯ
по применению

Совместное производство
ООО «ИЛ Тест-Пущино» и
ООО «ДТС Биотех»



Инструкция по применению
набора для ИФА ТЕСТСИП®

Содержание

1. Введение.....	3
2. Область применения.....	3
3. Принцип работы набора для ИФА.....	4
4. Меры предосторожности	6
5. Материалы, входящие в комплект набора для ИФА.....	7
6. Материалы, не входящие в комплект набора для ИФА.....	9
7. Рабочие протоколы	11
8. Расчет и интерпретация результатов....	17
9. Дополнительная информация	19

1. Введение

Уважаемый пользователь!

Благодарим Вас за выбор Набора для иммуноферментного анализа (ИФА) ТЕСТСИП. Прежде чем приступить к работе, пожалуйста, внимательно изучите это руководство. Помимо рабочих протоколов, здесь перечислены необходимые меры предосторожности и правила техники безопасности, выполнение которых сведет к минимуму риск повреждений оборудования и травм персонала.

2. Область применения

Набор для ИФА ТЕСТСИП предназначен для количественного определения содержания Охратоксина А в зерновых, орехах, кормах для животных, а также готовых пищевых продуктах методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа. Предел обнаружения составляет 2 мкг/кг.

Диапазон количественного анализа составляет от 2 до 40 мкг/кг. Набор прошел метрологическую

аттестацию для кукурузы, кукурузной муки, риса, пшеницы, овса и арахиса (включая продукты его переработки), показана высокая сходимость результатов анализа с референсным методом ВЭЖХ.

3. Принцип работы набора для ИФА

Работа набора для ИФА ТЕСТСИП основана на принципе прямого конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA). Охратоксин А экстрагируется из размолотого образца 70% метанолом. Производится смешивание экстракта и конъюгата Охратоксин А - Пероксидаза хрена, полученную смесь вносят в лунки планшета с иммобилизованными моноклональными антителами. Свободный Охратоксин из образца или стандартов и конъюгированный с ферментной меткой Охратоксин конкурируют за ограниченное

количество антител. После промывки, в ходе которой из лунок удаляется не связавшийся с антителами Охратоксин А, в систему добавляют хромогенный субстрат, который позволяет визуализировать результаты реакции антиген-антитело. Интенсивность цветовой реакции обратно пропорциональна концентрации Охратоксина А в образце (или стандарте). Затем добавляется стоп-раствор, останавливающий цветовую реакцию и, одновременно, усиливающий окраску. Далее с помощью планшетного фотометра регистрируется поглощение при 450 нм (при желании можно также использовать дифференциальный фильтр на 630 нм). По результатам для стандартов с известным содержанием Охратоксина А строится калибровочная кривая, с помощью которой можно определить содержание Охратоксина А в анализируемых образцах.

4. Меры предосторожности

1. Храните реагенты при температуре 2-8°C. Не используйте набор для ИФА после истечения срока годности.
2. Соблюдайте время инкубации, указанное в протоколе. При несоблюдении этого правила возможно получение недостоверных результатов.
3. Метанол является сильным ядом. Не допускайте контакта с кожей и глазами. Манипуляции с метанолом следует выполнять в перчатках!
4. Метанол огнеопасен! Соблюдайте меры предосторожности при хранении и использовании.
5. Стоп-раствор содержит кислоту! Не допускайте контакта с кожей и глазами. В

- случае попадания немедленно промойте пораженный участок большим количеством воды!
6. Охратоксин А обладает нефротоксическим и тератогенным эффектами. Соблюдайте меры предосторожности при манипуляциях с образцами, экстрактами и стандартами для калибровки!
7. Утилизируйте использованные реагенты в соответствии с законодательством.
- 5. Материалы, входящие в комплект набора для ИФА**
- 96-луночный модульный планшет (12 стрипов по 8 лунок) с иммобилизованными моноклональными антителами (запаян в фольгированный пакет)

- 96-луночный модульный планшет (12 стрипов по 8 лунок) для смешивания (в прозрачном пакете, лунки с синей каемкой).
- 5 флаконов со стандартами Охратоксина А (диапазон концентраций: 0, 2,0, 5,0, 20,0, 40,0 мкг/кг).
- Флакон объемом 25 мл с готовым раствором конъюгата Охратоксин А - Пероксидаза хрена (Зелёная крышка)
- Флакон объемом 15 мл с хромогенным субстратом (Синяя крышка)
- Флакон объемом 15 мл со стоп - раствором (Красная крышка)

6. Материалы, не входящие в комплект набора для ИФА

Экстракция:

- Мельница для размола образцов, либо другое оборудование для размола.
- Блендер со стеклянным сосудом или лабораторный встряхиватель для колб.
- Весы до 400 г.
- Мерный цилиндр до 100 мл.
- Колбы емкостью не менее 125 мл
- Фильтровальная бумага «Синяя лента» или аналогичная
- Сито с размером ячейки 20 меш.
- Метанол
- Дистиллированная или деионизованная вода
- Воронка с фильтром

Анализ:

- Восьмиканальный дозатор с рабочим объемом 20 – 200 мкл.
- Одноканальный дозатор с рабочим объемом 20 – 200 мкл.
- Одноканальный дозатор с рабочим объемом 200 – 1000 мкл.
- Лабораторный таймер.
- Промыватель планшетов (необязательно) или пластиковая промывалка.
- Планшетный фотометр с фильтром на 450 нм (дополнительно с фильтром на 630 нм).
- 3 Ванночки для восьмиканального дозатора.
- Наконечники для дозаторов соответствующих объемов.
- Фильтровальная бумага или салфетки.
- Дистиллированная или деионизованная вода.

7. Рабочие протоколы

Экстракция

Протокол 1:

1. Отберите репрезентативный образец и измельчите его с использованием соответствующего оборудования так, чтобы 75 % образца проходило через сито с ячейкой 20 меш. Тщательно гомогенизируйте полученный образец.
2. Отберите 20 грамм размолотого образца в чистый сосуд для блендера.
3. Добавьте 100 мл смеси метанол : вода = 70:30 (Соблюдайте соотношение масса образца : объем экстрагента = 1:5).
4. Перемешивайте на блендере не менее 3 минут с высокой скоростью.
5. Дайте осесть взвеси и профильтруйте экстракт через фильтровальную бумагу «Синяя лента» или аналогичную. Перемешайте полученный фильтрат и отберите 1-3 мл для анализа.

Протокол 2:

1. Отберите репрезентативный образец и измельчите его с использованием соответствующего оборудования так, чтобы 75 % образца проходило через сито с ячейкой 20 меш. Тщательно гомогенизируйте полученный образец.
2. Отберите 20 грамм размолотого образца в чистую колбу.
3. Добавьте 100 мл смеси метанол : вода = 70:30 (Соблюдайте соотношение масса образца : объем экстрагента = 1:5).
4. Перемешивайте на встряхивателе не менее 40 минут.
5. Дайте осесть взвеси и профильтруйте экстракт через фильтровальную бумагу «Синяя лента» или аналогичную. Перемешайте полученный фильтрат и отберите 1-3 мл для анализа.

Примечание 1: Экстракт образца должен иметь рН в диапазоне 6-8. При необходимости доведите рН

экстракта с помощью соляной кислоты или гидроксида натрия.

Примечание 2: Протокол №1 имеет меньшую точность по сравнению с протоколом №2.

Примечание 3: Вы можете использовать и другие протоколы экстракции, если показано, что они позволяют получить сопоставимые результаты.

Анализ

Примечание: Все реагенты и компоненты набора перед проведением исследования должны достичь комнатной температуры (20 - 27°C). Для проведения исследования рекомендуется использовать 8-канальный дозатор. Не следует использовать более 4 стрипов в одном исследовании.

Протокол исследования:

1) Запишите схему расположения стандартов и образцов в прилагаемую таблицу.

2) Установите необходимое количество стрипов для смешивания (с синей каемкой) в держатель. Для каждого стандарта или образца требуется одна лунка.

3) Установите такое же количество стрипов с иммобилизованными антителами в держатель. Неиспользованные стрипы незамедлительно верните в фольгированный пакет, запаяйте (заклейте липкой лентой) и уберите пакет в холодильник.

4) Отмерьте необходимый объем конъюгата (флакон с зеленой крышкой) из расчета 2 мл на стрип и налейте в отдельную ванночку для конъюгата. Восьмиканальным дозатором внесите по 200 мкл конъюгата в каждую лунку стрипов для смешивания.

5) Используя одноканальный дозатор, внесите по 100 мкл стандартов или образцов в соответствующие лунки стрипов для смешивания, в которых уже находится 200 мкл конъюгата. Используйте индивидуальные наконечники для каждого стандарта или образца.

6) Используя восьмиканальный дозатор (новые наконечники для каждого стрипа), аккуратно перемешайте содержимое лунок стрипа для смешивания (пипетируя вверх и вниз три раза) и немедленно перенесите 100 мкл полученной смеси в соответствующие лунки стрипа с иммобилизованными антителами. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 15 минут.

Примечание: Не используйте шейкер, так как встряхивание планшета может привести к перекрестной контаминации

7) По завершении инкубации промойте планшет 5 раз дистиллированной или деионизованной водой с помощью автоматического промывателя или восьмиканального дозатора или пластиковой промывалки.

8) После промывки переверните планшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге, так чтобы в лунках не осталось жидкости.

Примечание: следите за тем, чтобы стрипы не выпали из держателя!

9) Отмерьте необходимый объем субстрата (флакон с синей крышкой) из расчета 1 мл на стрип и налейте в отдельную ванночку для субстрата. Внесите по 100 мкл субстрата в каждую лунку промытого планшета.

10) Инкубируйте при комнатной температуре 5 минут.

11) Отмерьте необходимый объем стоп-раствора (флакон с красной крышкой) из расчета 1 мл на стрип и налейте в отдельную ванночку для стоп-раствора. Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку планшета. Цвет должен измениться с синего на желтый. Избегайте образования пузырьков!

12) Зарегистрируйте поглощение при 450 нм в спектрофотометре (при желании можно использовать дифференциальный фильтр 630 нм).

8. Расчет и интерпретация результатов

Построение калибровочной кривой и расчет концентраций

Для построения калибровочной кривой и расчета концентраций Охратоксина А в анализируемых образцах можно воспользоваться шаблоном в формате Microsoft Excel, или программным обеспечением сторонних производителей (например, встроенное программное обеспечение спектрофотометра).

Расчет результатов с помощью шаблона

Внесите в соответствующие значения таблицы значения поглощения для стандартов и анализируемых образцов. Программа автоматически построит калибровочную кривую и рассчитает концентрацию Охратоксина А в анализируемых образцах.

Интерпретация результатов

Если концентрация Охратоксина А в анализируемом образце превышает верхнюю границу диапазона количественного анализа (40 мкг/кг), повторите исследование, разведя экстракт этого образца смесью метанол : вода = 70 : 30.

Если по результатам анализа содержание Охратоксина А не превышает 2 мкг/кг, в протоколе испытаний следует указать «менее предела количественного определения (2 мкг/кг).

9. Дополнительная информация

Срок годности компонентов набора указан на упаковке. Если вы обнаружили изменение цвета хромогенного субстрата с прозрачного на голубой, не используйте этот реагент и свяжитесь с производителем.

Компоненты набора хранятся при температуре 2-8°C.

Техническая поддержка:

142290, Московская область, г. Пущино,

ул. Грузовая, д.1г, офис 2

Тел. (495) 226 21 33

info@dtsbiotech.com