

# Aflatoxin M<sub>1</sub> SENSITIVE ELISA

*5121AFMS[11]11.20*

Иммуноферментный конкурентный анализ для количественного определения Афлатоксина М<sub>1</sub> в молоке и молочных продуктах

Тест-система для анализа in-vitro  
Хранить при 2 - 8 °С



Официальный дистрибьютор  
R-Biopharm В Беларуси  
ОДО "КомПродСервис"  
+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50  
[www.komprod.com](http://www.komprod.com), [info@komprod.com](mailto:info@komprod.com)



Официальный дистрибьютор  
R-Biopharm в России  
ООО "Неотест"  
+7 (499) 649-02-01  
[info@neo-test.ru](mailto:info@neo-test.ru), [www.neo-test.ru](http://www.neo-test.ru)

## **Краткая информация**

Aflatoxin M<sub>1</sub> SENSITIVE ELISA представляет собой набор для количественного определения афлатоксина М1 методом конкурентного иммуноферментного анализа. Набора достаточно для 96 определений (включая стандарты). Набор содержит все реагенты для проведения анализа. Методы быстрого и эффективного извлечения афлатоксина М1 из разных матриц включены в руководство по использованию набора.

### **1. ВВЕДЕНИЕ**

Афлатоксины это канцерогенные, высокотоксичные метаболиты плесневых грибов рода *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Афлатоксин М1 образуется как гидроксигированный метаболит афлатоксина В1. Он выделяется с молоком после скормливания дойным коровам корма, содержащего афлатоксин В1. Так как афлатоксин М1 относительно устойчив при пастеризации молока, необходим не только регулярный всеобъемлющий контроль обрабатываемого сырья, но также контроль готовых молочных продуктов. Основными источниками афлатоксинов в кормах являются арахисовая мука, кукурузная и хлопковая мука [1]. Человеческое грудное молоко может содержать афлатоксин М1 после того, как кормящая женщина употребит пищу, загрязненную афлатоксином В1 [2].

В Европе для афлатоксина М1 установлены следующие максимальные допустимые уровни [3,4]:

- молоко (сырое молоко, молоко для производства продуктов на основе молока и термообработанное молоко): 0,05 ppb;
- смеси для грудных детей и смеси для детей более старшего возраста , в том числе детское молоко: 0,025 ppb.
- диетические продукты для специальных медицинских целей, предназначенные специально для детей: 0,025 ppb.

### **2. ПРИНЦИПЫ ИФА Афлатоксин М1**

В основе теста – реакция антиген-антитело. Лунки стрипов планшета покрыты антителами, специфичными в отношении афлатоксина М1. В лунки планшета вносят стандартные или исследуемые растворы, конъюгат афлатоксина М1 с ферментом (ферментный конъюгат). Свободный афлатоксин и афлатоксин, конъюгированный с ферментом, конкурируют за центры связывания антител (конкурентный

иммуноферментный анализ). Не связавшийся ферментный конъюгат затем удаляется в процессе промывки. Далее в лунки планшета добавляется субстрат/хромоген. Связавшийся ферментный конъюгат преобразует бесцветный хромоген в конечный продукт голубого цвета. Добавление стоп-раствора приводит к изменению цвета с голубого на жёлтый. Измерение проводится фотометрически при 450 нм. Оптическая плотность раствора в лунках обратно пропорциональна концентрации афлатоксина М1 в образце.

### 3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для данного набора используются мышиные антитела, полученные против афлатоксина М1, конъюгированного белком.

Перекрестная чувствительность:

Афлатоксин М1	100%
Афлатоксин М2	70%

Предел обнаружения (LOD) рассчитывается по формуле:  $X_n + 3SD$  ( $n > 20$ ) и определяется при оптимальных условиях.

Матрица	Способ пробоподготовки	LOD (ppb)
Молоко	8.1	2,3
Сыр	8.2	3,6
Масло	8.3	2,6
Детские смеси	8.4	5,0*

\* - все измеренные значения холостых образцов были равны нулю. Поэтому LOD был установлен на уровне стандарта с самой низкой концентрацией.

### 4. УСЛОВИЯ ОБРАЩЕНИЯ И ХРАНЕНИЕ

- Компоненты набора до и после использования должны храниться в при температуре от +2°C до +8°C, в темном месте.
- После истечения срока годности качество работы набора не гарантировано.
- Перед проведением анализа все компоненты тест-набора, включая микротитровальный планшет, должны быть доведены до комнатной температуры. Разбавьте компоненты набора непосредственно перед использованием, но после того, как компоненты нагреются до температуры окружающей среды.
- Необходимо избегать любого прямого воздействия света на раствор хромогена.

Признаки порчи реагентов:

- Синяя окраска раствора субстрата перед переносом его в лунки.

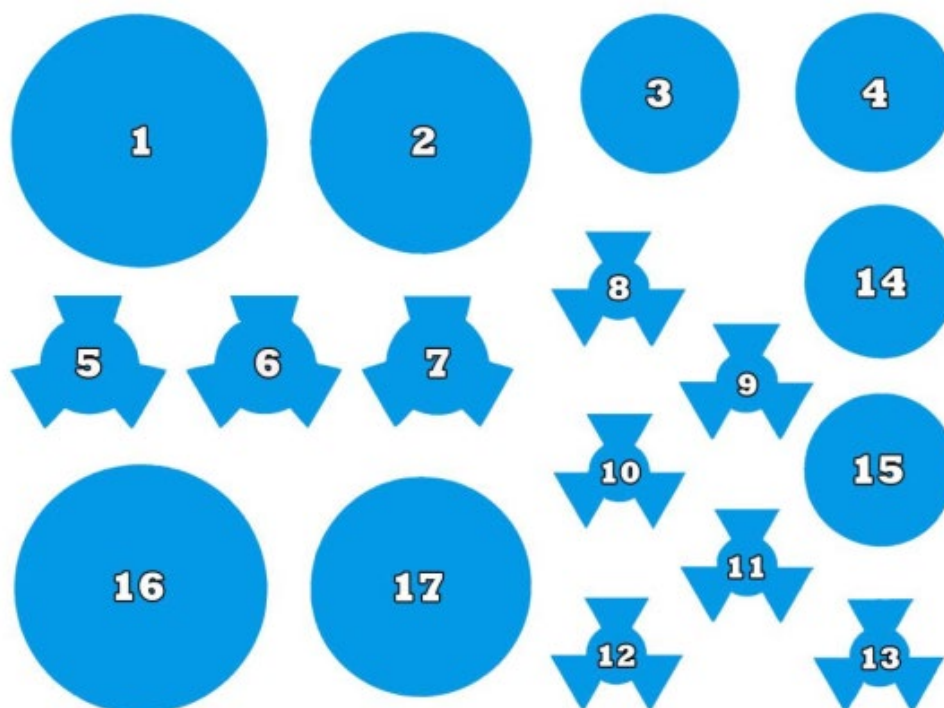
- Слабая или отсутствующая цветовая реакция нулевого стандарта ( $B_{\max}$ ,  $E_{450\text{nm}} < 0,8$ ).

## 5. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Инструкция

Один запечатанный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок). Планшет готов к использованию.

Позиции реагентов в наборе. Для приготовления реагентов смотрите раздел 9.



1. **Буфер для разведения образцов** (40 мл, готов для применения).
2. **Буфер для промывки планшета** (30 мл, концентрированный 20х).
3. **Раствор субстрата** (12 мл, готов для применения).
4. **Стоп-реагент** (15 мл, готов для применения).
5. **Конъюгат** (150 мкл, концентрированный 100х).
6. **Стандарт** (1000 пг/мл).
7. **Нулевой градуировочный раствор** (4 мл, готов для применения).
8. **Градуировочный раствор 2** (1 мл, готов для применения) **5 пг/мл**.
9. **Градуировочный раствор 3** (1 мл, готов для применения) **10 пг/мл**.
10. **Градуировочный раствор 4** (1 мл, готов для применения) **20 пг/мл**.
11. **Градуировочный раствор 5** (1 мл, готов для применения) **40 пг/мл**.

12. **Градуировочный раствор 6** (1 мл, готов для применения) **80 пг/мл.**
13. Не используется.
14. **Буфер для разведения** (15 мл, готов для применения).
15. Не используется.
16. Не используется.
17. Не используется.

## **6. ОБОРУДОВАНИЕ И ТРЕБУЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ТЕСТ-НАБОРА**

- весы, емкости для взвешивания;
- перчатки;
- вытяжной шкаф;
- гомогенизатор (миксер) ;
- центрифуга (2500\*g) ;
- вортекс;
- автоматическое устройство для промывки планшетов либо многоканальный пипет-дозатор 100-300 мкл;
- магнитная мешалка;
- шейкер для микротитровальных планшетов;
- микропланшетный фотометр с фильтром 450 нм;
- пробирки стеклянные (10-15 мл) ;
- пипет-дозаторы 100-1000 мкл;
- пипет-дозатор 2,5 мл;
- дихлорметан;
- гептан;
- 0,1 М HCl.

## **7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

- Афлатоксины являются токсичными и канцерогенными соединениями. Следует избегать контакта афлатоксинов с кожей и слизистыми.
- Любой материал, загрязненный афлатоксинами, должен быть уничтожен или дезактивирован добавлением раствора гипохлорита натрия (10% по объему).
- Стоп-реагент содержит серную кислоту концентрации 0,5 М. Не допускать контакта реагента с кожей.
- Избегать контакта проб с кожей и слизистыми.
- Не пипетировать ртом.
- Не допускается есть, пить, курить, хранить или готовить пищу или применять косметику в пределах обозначенной рабочей области.
- Тетраметилбензидин (ТМБ) является токсичным при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании. Поэтому будьте внимательны при работе с субстратом.
- Не используйте компоненты тест-набора после истечения их срока годности и не перемешивайте компоненты из разных партий.
- Каждая лунка используется как оптическая кювета. Поэтому не прикасайтесь к поверхности лунок, не допускайте их повреждения и загрязнения.
- Все компоненты должны быть полностью растворены перед применением. Обращайте особое внимание на субстрат, который имеет тенденцию к кристаллизации при температуре +4°C.
- Оптимальные результаты могут быть получены при строгом соблюдении протокола анализа. Точность и воспроизводимость результатов анализа зависит от аккуратности пипетирования и равномерного промывания лунок.

## **8. ПОДГОТОВКА ПРОБ**

Реагентов, включенных в набор, достаточно для проведения не менее 96 анализов (включая анализ стандартов). Каждый стандарт и образец анализируются в двух экземплярах.

### **8.1 Молоко**

Образцы необходимо обезжирить: центрифугировать образцы холодного молока в течение 10 минут, 2000 x g, 4°C. Удалите верхний жировой слой с помощью шпателя. Используйте 100 мкл обезжиренного молока в тесте.

### 8.1.1 Сухое молоко

Восстановить сухое молоко в соответствии с инструкцией производителя. Если инструкция производителя недоступна, добавьте 10 мл деионизированной или дистиллированной воды к 1 г сухого молока. Хорошо перемешайте и обезжирьте восстановленные образцы сухого молока: центрифугируйте образцы холодного восстановленного молока в течение 10 минут, 2000 x g, 4°C. Удалите верхний жировой слой с помощью шпателя. Используйте 100 мкл обезжиренного молока в тесте.

### 8.2 Образцы сыра

- Взвесьте 2 г мелко нарезанного и гомогенизированного сыра в 15 мл пробирке.
- Добавьте 4 мл 0,1 М HCl.
- Добавьте 8 мл дихлорметана.
- Перемешивайте содержимое пробирки в течение 15 мин, центрифугируйте (5 минут, 2000 x g) при 20 °C - 25 °C, удалите верхний слой (HCl).
- Отфильтруйте экстракт сыра через фильтровальную бумагу.
- Отберите 4 мл фильтрата и выпарите досуха при 50°C, под слабым током азота.
- Растворите осадок в 1 мл буфера для разведения образцов (глава 5, п. 1).
- Добавьте 1 мл гептана (для обезжиривания) и перемешайте.
- Центрифугируйте (5 минут, 2000 x g).
- Используйте 100 мкл нижнего слоя раствора в тесте.

### 8.3 Образцы масла

- Взвесьте 2 г мелко нарезанного и гомогенизированного масла в 15 мл пробирке.
- Добавьте 4 мл 0,1 М HCl.
- Добавьте 8 мл дихлорметана.
- Перемешивайте содержимое пробирки в течение 15 мин, центрифугируйте (5 минут, 2000 x g) при 20 °C - 25 °C, удалите верхний слой (HCl).
- Отфильтруйте экстракт масла через фильтровальную бумагу.
- Отберите 4 мл фильтрата и выпарите досуха при 50°C, под слабым током азота.
- Растворите осадок в 1 мл буфера для разведения образцов (глава 5, п. 1).
- Добавьте 1 мл гептана (для обезжиривания) и перемешайте.
- Центрифугируйте (5 минут, 2000 x g).
- Перенесите нижний слой раствора в чистую пробирку.

- Добавьте 1 мл гептана и перемешайте.
- Центрифугируйте (5 минут, 2000 x g).
- Используйте 100 мкл нижнего слоя раствора в тесте.

#### 8.4 Детская смесь

Восстановить детскую смесь в соответствии с инструкциями производителя для получения готового детского питания.

- Внесите 4 мл гомогенизированного образца в пробирку на 50 мл.
- Добавить 16 мл дихлорметана.
- Перемешивайте содержимое пробирки в течение 30 мин, при 20 °С - 25 °С (при слишком интенсивном встряхивании смесь становится желеобразной).
- Отфильтруйте экстракт через фильтровальную бумагу.
- Возьмите 4 мл фильтрата и выпарите досуха под слабым током азота при 50 °С.
- Растворите осадок в 1 мл буфера для разведения образцов (глава 5, № 1).
- Добавьте 1 мл гептана (для обезжиривания) и перемешивайте 10 минут.
- Центрифугируйте (5 минут, 2000 x g) при 20 °С - 25 °С.
- Отбросьте верхний слой гептана
- Используйте 100 мкл нижнего водного слоя раствора в тесте.

### **9. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**

Перед началом испытаний реагенты должны быть доведены до температуры окружающей среды. Реагенты необходимо готовить непосредственно перед использованием. Любые неиспользованные реагенты должны быть немедленно возвращены на хранение при 2 - 8°C.

#### Микротитровальный планшет

Верните неиспользованные лунки в закрывающийся пакет с осушителем и храните при температуре 2 - 8°C до использования в последующих анализах. Сохраните также держатель стрипов.

#### Буферы для разведения

В этом наборе поставляются два готовых к использованию буфера для разбавления. Буфер для разведения образцов (глава 5, № 1). Этот буфер используется для растворения осадка образца, образовавшегося после выпаривания растворителя.



Этот буфер может загустевать. Доведите температуру буфера до температуры окружающей среды и энергично перемешайте до получения гомогенного раствора.

Буфер для разведения конъюгата (глава 5, № 14).

#### Промывочный буфер

Промывочный буфер поставляется в виде 20-кратного концентрата. Приготовьте рабочий раствор буфера перед использованием. Для каждого стрипа необходимо 40 мл разбавленного промывочного буфера (2 мл концентрированного промывочного буфера + 38 мл дистиллированной воды).

#### Раствор конъюгата (150 мкл)

Конъюгат (Афлатоксин М1-HRP) поставляется в виде 100-кратного концентрата. Раствор конъюгата необходимо готовить непосредственно перед использованием.

Конъюгат (Афлатоксин М1-HRP) доставляется в 100 раз концентрированном. Осадите конъюгат с помощью центрифугирования (1 минута, 1000 x g). Добавьте 20 мкл концентрированного раствора конъюгата в 2 мл буфера для разведения (глава 5, № 9). Для 2 стрипов (16 лунок) требуется 1600 мкл разбавленного конъюгата. Хранить неиспользованный концентрированный конъюгат при 2-8 ° С.

#### Раствор субстрат/хромогена

Довести температуру раствора до комнатной, перед пипетированием перемешать содержимое (возможно образование осадка при 4°C).

## **10. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

### Протокол промывки

В ходе выполнения ИФА между этапами инкубации необходимо удалять несвязанные компоненты. Это достигается посредством соответствующей процедуры промывки. Очевидно, что каждая процедура промывки должна проводиться с большой тщательностью, что бы гарантировать повторяемость и воспроизводимость результатов.

Промывка вручную или с помощью автоматического вошера может осуществляться следующим образом:

### Промывка вручную

1. Жидкость из лунок вылить путем резкого переворачивания планшета, удалить остатки жидкости путем энергичного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги

2. Все лунки заполнить буфером для промывки до края лунки (300 мкл)
3. Процесс промывки (этапы 1 и 2) повторять трижды
4. Жидкость из лунок выливать путем резкого переворачивания планшета
5. После последнего промывания планшет перевернуть и удалить остатки жидкости путем энергичного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги
6. Не допускать высыхания лунок перед внесением следующего реагента.

#### Промывка с помощью автоматического вошера

При использовании автоматического вошера проверьте, чтобы из всех лунок жидкость удалялась полностью, чтобы раствор для промывания тщательно распределялся, заполняя до края каждую лунку во время каждого цикла промывания. Вошер должен быть запрограммирован на выполнение трех циклов промывки.

#### Протокол анализа

1. подготовить образцы в соответствии с главой 8 (подготовка образцов) и подготовить реагенты в соответствии с главой 9 (приготовление реагентов).

Примечание: стандарты могут загустевать при хранении, перед анализом доведите стандарты до комнатной температуры и тщательно перемешайте до гомогенного состояния.

2. внесите 100 мкл нулевого стандарта в дубле (лунки G1, G2, бланк).  
внесите 100 мкл нулевого стандарта в дубле (лунки A1, A2, максимальный сигнал).  
внесите 100 мкл каждого из стандартных растворов Aflatoxin M1 в дубле (лунки От B1, 2 до F1,2, то есть 5, 10, 20, 40 и 80 пг/мл).
3. Внесите по 100 мкл каждого раствора образца в дублях в оставшиеся лунки микротитровального планшета (40 образцов; 80 лунок).
4. Запечатйте планшет и несколько секунд встряхивайте планшет на шейкере для микропланшетов.
5. Инкубируйте в течение 1 часа в темноте при температуре от 20 до 25 °C.
6. Удалите раствор из планшета и промойте 3 раза промывочным буфером.
7. Внесите по 100 мкл конъюгата (афлатоксин M1-HRP) во все лунки, кроме лунок G1 и G2.
8. Запечатйте планшет и несколько секунд встряхивайте планшет на шейкере для микропланшетов.
9. Инкубируйте в течение 30 минут в темноте при температуре от 20 до 25 °C.

12. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.

13. Измерьте значения оптической плотности проб при 450 нм.

## 11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

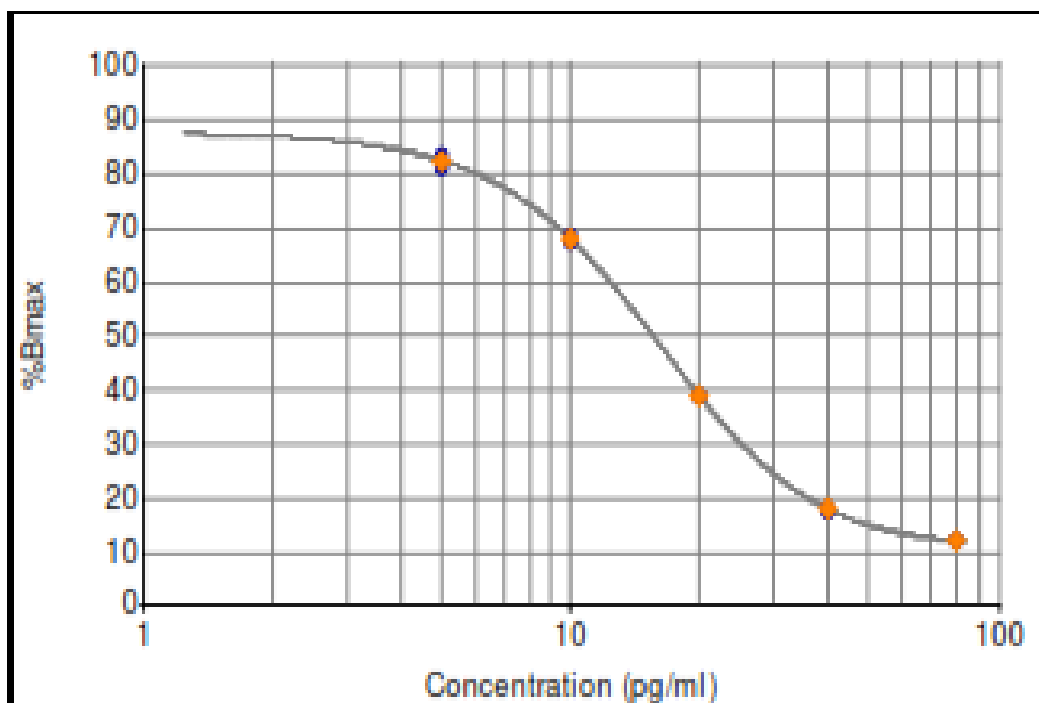
Вычтите среднее значение оптической плотности (ОП) лунок G1 и G2 (бланк) из отдельных значений ОП для лунок, содержащих стандартные растворы и пробы.

Значения ОП для шести стандартных растворов и проб (среднее значение двух повторностей) делят на среднее значение ОП нулевого градуировочного раствора (лунок A1 и A2) и умножают на 100. Таким образом, нулевой градуировочный раствор принимается за 100% (максимальная оптическая плотность) и другие значения ОП приводятся в процентах от максимальной оптической плотности.

$$\frac{\text{ОП стандарта (или образца)}}{\text{ОП нулевого стандарта}} \times 100 = \% \text{ от максимальной оптической плотности}$$

Калибровочная кривая:

Значения (% от максимальной оптической плотности), вычисленные для стандартных растворов, наносятся на график (по оси Y) и соответствуют концентрации афлатоксина нанесенные на логарифмическую ось X.



Количество афлатоксина М1 в образцах выражают в эквивалентах афлатоксина М1. Эквиваленты афлатоксина М1 в образцах (нг/мл), соответствующие % от максимальной оптической плотности каждого образца, можно определить по калибровочной кривой.

### 8.1 Образцы молока

Концентрация афлатоксина М1 в образцах молока может быть непосредственно считана из калибровочной кривой.

#### 8.1.1 Образцы сухого молока

Концентрация афлатоксина М1 в восстановленных образцах может быть непосредственно считана из калибровочной кривой.

### 8.2 Образцы сыра

Концентрация афлатоксина М1 в образцах сыра может быть непосредственно считана из калибровочной кривой.

### 8.3 Образцы масла

Концентрация афлатоксина М1 в образцах масла может быть непосредственно считана из калибровочной кривой.

### 8.4 Детская смесь

Концентрация афлатоксина М1 в восстановленном образце детской смеси может быть непосредственно считана из калибровочной кривой. Чтобы получить концентрацию афлатоксина М1 в порошке детской смеси, необходимо получить результат из калибровочной кривой и умножить его на коэффициент восстановления, указанный в инструкции производителя продукта.

## **12. ЛИТЕРАТУРА**

1. S.H. Henry, T. Whitaker, I. Rabbani, et al. Aflatoxin M1. JECFA report 47, 2001 pp 1-106
2. A. Zarpa, C.P. Wild, A.J. Hall, et al. Aflatoxin M1 in human breast milk from The Gambia, West Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. Carcinogenesis, 13, 891-894, 1992.
3. Commission Regulation (EC) No 2174/2003 of 12 December 2003 amending Regulation (EC) no 466/2001 as regards aflatoxins. Off. J. European Commun. L326 (2003) 12-15.

4. Commission Regulation (EC) No 683/2004 of 13 April 2004 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards aflatoxins and ochratoxin A in foods for infants and young children. Off. J. European Commun. L106 (2004) 3-5.

### 13. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Для заказа Aflatoxin M<sub>1</sub> SENSITIVE ELISA используйте код набора 5121 AFMS.



Техническая поддержка и прием заявок:  
+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50, +7 (499) 649-02-01  
[info@komprod.com](mailto:info@komprod.com), [support@komprod.com](mailto:support@komprod.com), [info@neo-test.ru](mailto:info@neo-test.ru)