

**Дезоксиниваленол ИФА**  
***5121DON [9]07.17***

**Тест-система для скрининга и количественного определения  
дезоксиниваленола в различных матрицах  
методом конкурентного иммуноферментного анализа**

Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

**Официальный дистрибьютор  
в России:**

**ООО "НеоТест"**

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 649 02 01

info@neo-test.ru

[www.neo-test.ru](http://www.neo-test.ru)

***Техническая поддержка***

support@neo-test.ru

+7 499 704 05 50



**Официальный дистрибьютор  
в Беларуси:**

**ОДО "КомПродСервис"**

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

[www.komprod.com](http://www.komprod.com)

***Техническая поддержка***

support@komprod.com

+375 17 336 50 54



## Краткая информация

Набор представляет собой конкурентный иммуноферментный анализ, предназначенный для скрининга концентрации дезоксиниваленола (ДОН) в пищевых продуктах, кормах и других биологических образцах. Тест основан на антителах, направленных против дезоксиниваленола. Антисыворотка специфична для ДОН и его метаболита 3-ацетил-ДОН. Набор для ELISA содержит 96-луночный микротитровальный планшет, а также все необходимые реагенты, включая готовые к использованию стандарты для проведения теста. В руководство к набору включены методы быстрого и эффективного извлечения ДОН из различных матриц.

## 1. Введение

Дезоксиниваленол принадлежит к группе трихотеценов, продуцируемых широким спектром плесневых грибов *Fusarium*, наиболее важными из которых являются *F. graminearum* и *F. culmorum* [1]. Эти грибы обычно развиваются в течение продолжительных прохладных и влажных сезонов выращивания и сбора урожая, вызывая фузариоз на зерновых культурах. Количество 3-ацетил-ДОН и / или 15-ацетил-ДОН в образце составляет примерно 10% от количества присутствующего ДОН. Значительные концентрации ДОН часто обнаруживаются в пшенице, ячмене, кукурузе и овсе, тогда как более низкие уровни обычно обнаруживаются в ржи, сорго и рисе. Этот ИФА набор подходит для скрининга присутствия ДОН в пищевых продуктах и кормах, а также в жидких образцах, таких как пиво.

## 2. Принцип метода.

Планшет (12 стрипов, 8 лунок в каждом), покрыт овечьими антителами к IgG кролика. На первой стадии анализа в лунки добавляют специфические кроличьи антитела к дезоксиниваленолу, меченые ферментом пероксидазой (-HRP) и стандарты или образцы дезоксиниваленола. Специфические антитела связываются иммобилизованными антителами и в то же время свободный дезоксиниваленол (в стандартном растворе или в пробе) и меченный ферментом дезоксиниваленол конкурирует за сайты связывания специфических антител (конкурентный иммуноферментный анализ). После инкубации несвязанные (меченные ферментом) реагенты удаляются на стадии промывки. Количество связанного ферментного конъюгата визуализируется добавлением хромогенного субстрата (тетраметилбензидин, ТМВ). Связанный фермент преобразует хромоген в окрашенный продукт. Реакция останавливается добавлением серной кислоты. Интенсивность цвета измеряется фотометрически при 450 нм и обратно пропорциональна концентрации дезоксиниваленола в образце.

## 3. Специфичность и чувствительность

Антитела демонстрируют следующие перекрестные реактивности:

Дезоксиниваленол (ДОН) – 100%.

3-ацетил-дезоксиниваленол – 96%.

15-Ацетил-дезоксиниваленол <0,1%.

Ниваленол – 40%.

Т-2 токсин <0,1%.

Зеараленон <0,1%.

Фумонизин <0,1%.

Из-за перекрестной реакции антисыворотки с 3-ацетил-ДОН, который может присутствовать в положительном образце, можно ожидать завышения концентрации ДОН максимум на 10 – 15%.

Предел обнаружения определяли при оптимальных условиях.

Матрица	Процедура	LOD, мкг/кг	Диапазон измерений, мкг/кг
		Фактор разведения	Фактор разведения

		5	100	5	100
Злаки	8.1	1,5	30	1,6 – 50	31 – 1000
Пищевые продукты	8.1	-	30	1,6 – 50	31 – 1000
Корма	8.1	-	30	1,6 – 50	31 – 1000
Пиво	8.2	1,5	-	1,6 – 50	-
Силос	8.1	-	50	1,6 – 50	31 – 1000

#### 4. Обращение с тест-системой и её хранение

- Тест-систему и компоненты храните при 2°C – 8°C в темном месте.
- После истечения срока годности набора и/или компонентов набора, гарантия не предоставляется.
- Доведите температуру всех компонентов тест-системы, включая планшет, до комнатной.
- Избегайте конденсации влаги в лунках планшета. Доведите упакованный микротитровальный планшет до комнатной температуры, перед открытием упаковки.
- Раствор субстрата/хромогена можно хранить в холодильнике (при 2°C – 8°C) до истечения срока годности, указанного на этикетке
- Следует избегать прямого попадания света на раствор хромогена.

Признаки непригодности реагентов:

- Синяя окраска раствора субстрата, перед постановкой анализа.
- Слабая или отсутствующая цветовая реакция нулевого стандарта ( $E_{450nm} < 0,8$ ).

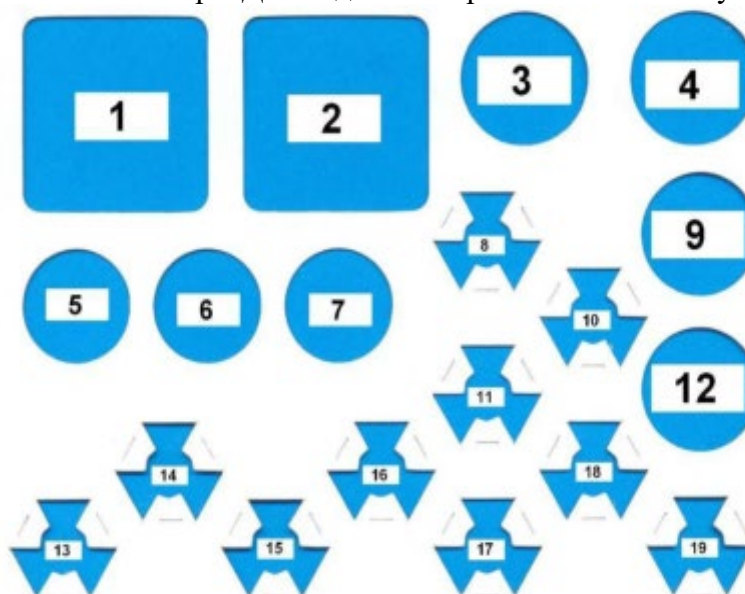
#### 5. Содержание набора

Руководство

Сенсибилизированный микротитровальный планшет (96 лунок: 12 стрипов по 8 лунок).

Планшет готов к использованию.

Положение реагентов в наборе. Для подготовки реагентов см. главу 9.



1. Буфер для разбавления (40 мл, готов к использованию).
2. Моющий буфер (30 мл, 20x концентрат).
3. Раствор субстрата (12 мл, готов к использованию).
4. Стоп-раствор (15 мл, готов к использованию).
5. Конъюгата (лиофилизированный, голубая крышка).
6. Антитела (лиофилизированные, желтая крышка).
7. Не используется.

8. Не используется.
9. Не используется.
10. Не используется.
11. Не используется.
12. Не используется.
13. Нулевой стандартный раствор (2 мл, готов к использованию).
14. Стандартный раствор 1 (1 мл, готов к использованию) 0,313 нг/мл.
15. Стандартный раствор 2 (1 мл, готов к использованию) 0,625 нг/мл.
16. Стандартный раствор 3 (1 мл, готов к использованию) 1,25 нг/мл.
17. Стандартный раствор 4 (1 мл, готов к использованию) 2,5 нг/мл.
18. Стандартный раствор 5 (1 мл, готов к использованию) 5,0 нг/мл.
19. Стандартный раствор 6 (1 мл, готов к использованию) 10,0 нг/мл.

#### **6. Оборудование и материалы, необходимые дополнительно**

- Весы.
- Перчатки.
- Вытяжной шкаф.
- Гомогенизатор (вортекс, миксер).
- Центрифуга (2000 x g).
- Автоматическая машина для промывки микропланшетов или 8-канальная микропипетка 100 – 300 мкл.
- шейкер для микротитровальных планшетов.
- Спектрофотометр для микропланшетов (ридер) с фильтром 450 нм.
- Микропипетки, 100 - 1000 мкл.
- Мультипипетка с дозаторами 2,5 мл.
- Флаконы с закручивающимися крышками;
- Дистиллированная вода;
- Ультразвуковая баня.

#### **7. Меры предосторожности**

Дезоксиниваленол – токсичное соединение. Избегайте контакта всех реагентов с кожей и слизистыми оболочками. Деконтаминация стеклянной посуды и растворов, содержащих токсины, проводится с использованием 10 % (v/v) раствора гипохлорита натрия. Соляной кислотой рН раствора гипохлорита доводится до 7, загрязненная посуда погружается в раствор и оставляется на ночь.

- Стоп-раствор содержит серную кислоту. Избегайте контакта реагента с кожей.
- Не пипетируйте ртом.
- В пределах рабочей зоны не ешьте, не пейте, не курите, не храните и не готовьте продукты, а также не используйте косметические средства.
- ТМБ токсичен при вдыхании, при контакте с кожей и проглатывании; соблюдайте осторожность при обращении с субстратом.
- Не используйте компоненты по истечении срока годности и не используйте реагенты из разных тест систем с разными номерами лотов.
- Каждая лунка используется в качестве оптической кюветы. Поэтому не прикасайтесь к дну лунки, не допускайте её повреждения и загрязнения.
- Все компоненты тест-системы должны быть полностью растворены перед использованием. Особое внимание обратите на субстрат, который кристаллизуется при температуре +4°C.
- Оптимальные результаты будут получены путем строго соблюдения этой инструкции. Тщательное пипетирование и отмывка в течение анализа необходимы для поддержания хорошей точности и сходимости результатов.

## **8. Пробоподготовка**

8.1 Злаки, продукты питания, корма и силос (разведение в 100 раз)

- Измельчите примерно 50-100 г образца, чтобы получить однородную смесь или порошок.
- Отвесьте 1 г измельченной пробы и добавьте 19 мл дистиллированной воды (1:20).
- Тщательно встряхните (например, 5 минут на вортексе).
- Отфильтруйте часть водного экстракта фильтровальной бумагой.
- Разбавьте 50 мкл фильтрата 200 мкл буфера для разведения (конечное разведение 1:100).
- Используйте 50 мкл этого раствора в тесте.

Зерновые, продукты питания, корма и силос (5-кратное разведение)

- Измельчите примерно 50-100 г образца, чтобы получить однородную смесь или порошок.
- Отвесьте 1 г измельченной пробы и добавьте 4 мл дистиллированной воды.
- Тщательно встряхните (например, 5 минут на вортексе).
- Отфильтруйте часть водного экстракта фильтровальной бумагой.
- Используйте 50 мкл этого раствора в тесте.

8.2 Пиво

Пиво дегазируют в ультразвуковой ванне. Аликвоту дегазированной пробы объемом 50 мкл разбавляют 200 мкл буфера для разведения. Аликвоту 50 мкл этого раствора используют в тесте.

## **9. Подготовка реагентов**

Перед началом анализа, реагенты должны быть доведены до комнатной температуры. Любые неиспользуемые реагенты, следует немедленно вернуть на хранение при температуре 2°C до 8°C. Подготовьте реагенты непосредственно перед их использованием.

### **Планшет для микротитрования**

Верните неиспользованные стрипы в закрывающийся пакет с осушителем и храните при температуре от 2 ° C до 8 ° C для использования в последующих анализах. Сохраните также рамку для стрипов.

### **Буфер для разведения (4 x концентрированный)**

До разведения (20 мл буфер + 60 мл дистиллированная вода) доведите температуру буфера до 20-25 °C и тщательно перемешайте. Концентрированный буфер может содержать осадок. Рабочий раствор буфера можно хранить в холодильнике (от 2 °C до 8 °C) до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.

### **Раствор конъюгата**

Восстановите лиофилизированный конъюгат (DON-HRP) 4 мл буфера для разведения, перемешайте тщательно и держите в темноте до использования. Храните флакон сразу после использования в темноте при температуре при 2 – 8 ° C.

### **Раствор антител**

Восстановите лиофилизированные антитела 4 мл буфера для разведения, тщательно перемешайте и держите в темноте до использования. Храните флакон сразу после использования в темноте от 2 – 8 ° C.

Примечание. Для длительного хранения алиquotы антител и конъюгата замораживают при -20°C.

### **Промывочный буфер (20 x концентрированный)**

Промывочный буфер поставляется 20-кратно концентрированным. Подготовьте свежеприготовленный раствор перед использованием. На 1 стрип используется 40 мл разбавленного промывочного буфера (2 мл концентрированного промывочного буфера + 38 мл дистиллированной воды).

## **Раствор субстрата**

Раствор субстрата (готовый к использованию) может образовывать осадок при 4 °С. Поэтому флакон необходимо довести до 20-25 °С (хранить в темноте) и перемешать содержимое перед внесением в лунки.

## **10. Процедура анализа**

### Протокол отмывки:

Несвязанные компоненты должны эффективно удаляться между каждым этапом инкубации при ИФА. Это достигается надлежащей отмывкой планшета. Каждая процедура отмывки должна выполняться тщательно, чтобы гарантировать хорошую внутри- и межпланшетную воспроизводимость.

Ручную отмывку или отмывку с помощью автоматического устройства можно выполнить следующим образом:

### Ручная отмывка:

1. Вылейте жидкость из лунок, переверните микротитровальный планшет вверх дном и удалите оставшуюся жидкость, путем постукивания по бумажному полотенцу.
2. Заполните все лунки моющим буфером по кромку (300 мкл).
3. Цикл отмывки (1 и 2) должен повторяться 3 раза.
4. Переверните планшет вверх дном и опустошите лунки, резко его встряхнув.
5. Поместите перевернутый планшет на впитывающие бумажные полотенца и хорошо постучите им по полотенцам, чтобы удалить остатки моющего буфера из лунок.
6. Не допускайте высыхания лунок до добавления следующего реагента.

### Отмывка автоматическим оборудованием для отмывки микротитровальных планшетов:

При использовании автоматического моющего оборудования, проверьте, что из всех лунок отбирается жидкость и лунки полностью заполняются моющим буфером во время каждого цикла отмывки. Моющее оборудование должно быть запрограммировано на три цикла отмывки.

### Протокол анализа

1. Подготовьте пробы, следуя главе 8 (пробоподготовка), и реагенты, следуя главе 9 (подготовка реагентов).
2. Добавьте по 100 мкл нулевого стандарта в двух параллелях (лунки Н1, Н2; бланк).  
Добавьте по 50 мкл нулевого стандарта в двух параллелях (лунки А1, А2; максимальная ОП).
- Добавьте по 50 мкл каждого стандарта в двух параллелях (лунки от В1,2 до G1,2, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5,0 и 10,0 нг/мл).
3. Внесите по 50 мкл каждого исследуемого раствора в двух параллелях в оставшиеся лунки на планшете.
4. Внесите по 25 мкл конъюгата (ДОН-HRP) во все лунки, кроме Н1 и Н2.
5. Внесите по 25 мкл антител во все лунки, кроме Н1 и Н2.
6. Закройте микротитровальный планшет и перемешайте содержимое лунок в течение 1 минуты.
7. Инкубируйте 1 час в темноте при температуре 4°С (2 – 8 °С).
8. Вылейте раствор из лунок микротитровального планшета и промойте 3 раза моющим буфером.
9. Добавьте 100 мкл раствора субстрата в каждую лунку.
10. Инкубируйте 30 минут в темноте при комнатной температуре (20-25 °С).
11. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
12. Немедленно измерьте оптическую плотность растворов в лунках при 450 нм.

## 11. Интерпретация результатов

Вычитите значение оптической плотности (O.D.) лунок Н1 и Н2 (бланк) из оптической плотности лунок, содержащих стандарты и пробы. Значения оптических плотностей для шести стандартов и проб (их средние значения для двух параллелей) делят на среднее значение величины оптической плотности для нулевого стандарта/Вmax (лунки А1 и А2) и умножают на 100. Таким образом, нулевой стандарт (Вmax) приравнивается к 100% (максимальному поглощению), а другие значения оптических плотностей выражают в процентах от максимальной оптической плотности.

$$\frac{\text{Оптическая плотность стандарта (или пробы)}}{\text{Оптическая плотность Вmax}} \times 100\% = \% \text{ max O.D.}$$

### Калибровочная кривая:

Полученные величины (% максимальной оптической плотности), рассчитанные для стандартных растворов, откладываются по ординате, соответствующие логарифмы концентрации аналита (нг/мл) – по абсциссе.

### Альтернативная калибровочная кривая:

Оптические плотности для стандартных растворов наносятся на шкалу Y против концентрации по оси X. Шкала Y – логит, шкала по оси X – логарифмическая.

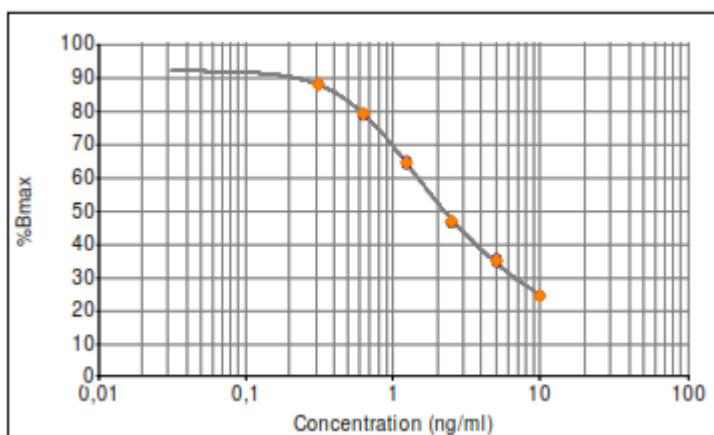


Рис. 1: Пример калибровочной кривой

### 8.1 Образцы зерновых, пищевых продуктов, кормов и силоса

Эквиваленты ДОН, считанные с калибровочной кривой, необходимо умножить на коэффициент разбавления 5 или 100, в зависимости от того, какой метод используется.

### 8.2 Образцы пива

Эквиваленты ДОН, считанные с калибровочной кривой, необходимо умножить на коэффициент 5 для определения содержания ДОН в образцах пива.

### **Информация для заказа**

Для заказа тест-системы, используйте артикул 5121DON.