

Бацитрацин ИФА

5151ВАС[13]12.20

Иммуноферментный метод

для скрининга и количественного определения бацитрацина в
различных матрицах

**Официальный дистрибьютор
R-Biopharm в Республике Беларусь:
ОДО «КомПродСервис»**

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск
+375 17 336 50 54
info@komprod.com
www.komprod.com

Техническая поддержка

+375 17 336 50 54
support@komprod.com



**Официальный дистрибьютор
R-Biopharm в Российской Федерации:
ООО «Неотест»**

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир
+7 499 649 02 01
info@neo-test.ru
www.neo-test.ru

Техническая поддержка

+7 499 704 05 50
support@neo-test.ru



КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ

1. ВВЕДЕНИЕ

2. ПРИНЦИПЫ ИФА

3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для данного тест-набора ИФА используются специфические кроличьи антитела, полученные с помощью бацитрацина, конъюгированного белком.

Кроссреактивность:

Бацитрацин 100%

Виргиниамицин, Тилозин, Олаквиндокс, Салиномицин, Спирамицин, Амоксициллин, Монензин, Неомицин, Диметридазол, Окситетрациклины, Хлортетрациклины <0,01%

Чувствительность: 100 %.

Предел обнаружения определен при оптимальных условиях.

Матрица	Описание подготовки проб	Предел обнаружения мкг/кг
Молоко	8.1	10
Яйца	8.2	11
Ткани	8.2	9
Корма	8.3	60
Моча	8.4	23

4. УСЛОВИЯ ОБРАЩЕНИЯ И ХРАНЕНИЕ

- Набор реагентов должен храниться при температуре от +2 °С до +8 °С в темном месте. Не замораживать.
- После истечения срока годности невозможно гарантировать приемлемое качество.
- Перед проведением анализа все компоненты тест-набора, включая микротитровальный планшет, должны быть доведены до комнатной температуры.
- Следует избегать появления конденсата в лунках планшета. Планшет должен быть согрет до температуры окружающей среды перед вскрытием упаковки.
- Необходимо избегать любого прямого воздействия света на раствор хромогена.

Следующие показатели могут являться признаком порчи реагентов:

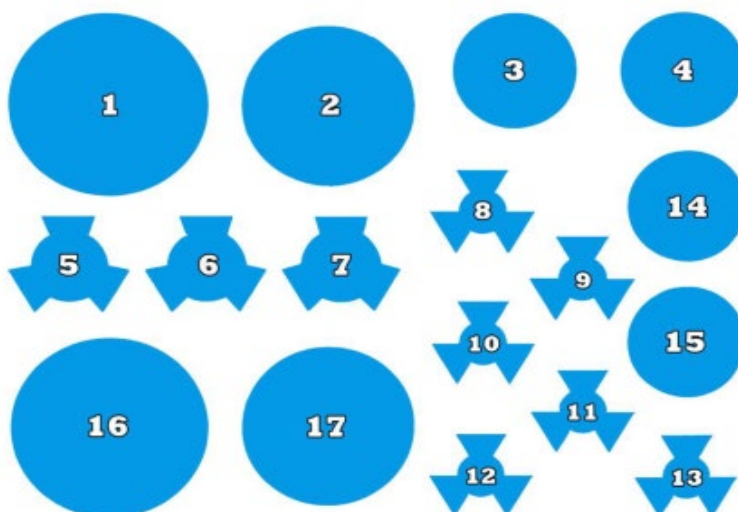
- Голубая окраска раствора хромогена перед внесением в лунки
- Слабая либо отсутствующая реакция окрашивания нулевого градуировочного раствора (E450nm <0,8)

5. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Инструкция

Один запечатанный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок), сенсibilизированный антителами. 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, концентрации 20х)
3. **Раствор субстрата** (12 мл, готов для применения)
4. **Стоп-реагент** (15 мл, готов для применения)
5. **Конъюгат** (100 мкл, концентрации 100х)
6. не используется
7. **Нулевой градуировочный раствор** (2 мл, готов для применения)
8. **Градуировочный раствор 1** (1 мл, готов для применения) **0,625 нг/мл**
9. **Градуировочный раствор 2** (1 мл, готов для применения) **1,25 нг/мл**
10. **Градуировочный раствор 3** (1 мл, готов для применения) **2,5 нг/мл**
11. **Градуировочный раствор 4** (1 мл, готов для применения) **5 нг/мл**
12. **Градуировочный раствор 5** (1 мл, готов для применения) **10 нг/мл**
13. **Градуировочный раствор 6** (1 мл, готов для применения) **20 нг/мл**
14. **Буфер для разведения**
15. не используется
16. не используется
17. не используется

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

- весы
- перчатки
- гомогенизатор (вортекс, миксер)
- автоматическое устройство для промывки планшетов либо многоканальный пипет-дозатор 100-300 мкл
- шейкер для микротитровальных планшетов
- микропланшетный фотометр с фильтром 450 нм
- пипет-дозаторы
- степпер
- метанол 100%
- дистиллированная вода

- алюминиевая фольга, скотч или парафильм
- 0,1 М NaOH

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 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 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 точности пипетирования и равномерного промывания лунок.

8. ПОДГОТОВКА ПРОБ

Тест-набор может быть использован для определения бацитрацина в различных матрицах. Мы представили Вам информацию о различных вариантах пробоподготовки, но возможно также использование альтернативных методов.

8.1 Молоко

pH молока влияет на протекание иммуноферментного анализа. Необходимо откорректировать pH на уровне $7 \pm 0,5$, используя 0,1 М NaOH.

- Отцентрифугировать холодную пробу молока (5 минут, $2000 \times g$, 4 °C)
- Шпателем удалить верхний жировой слой
- Развести 20 мкл обезжиренного молока с 180 мкл буфера для разведения проб
- Перемешать на вортексе
- В тесте используют 50 мкл на лунку

8.2 Мясо и яйца

- Гомогенизировать от 10 до 100 г образца
- 1 г гомогенизированной пробы поместить в пробирку для центрифугирования
- Добавить 2 мл 80 % - ного метанола, приготовленного на буфере для разведения проб (1,6 мл 100% метанола смешать с 0,4 мл буфера для разбавления образцов)
- Перемешать на вортексе, экстрагировать в течение 15 минут на ротаторе
- Центрифугировать в режиме 10 мин / 2000g

- Развести 40 мкл надосадочного слоя с 160 мкл буфера для разведения
- Перемешать на вортексе
- В тесте используют 50 мкл на лунку

8.3 Корма

- Гомогенизировать от 10 до 100 г образца
- 1 г гомогенизированной пробы поместить в пробирку для центрифугирования
- Добавить 2 мл 80 % - ного метанола, приготовленного на буфере для разведения проб (1,6 мл 100% метанола смешать с в 0,4 мл буфера для разбавления образцов)
- Перемешать на вортексе, экстрагировать в течение 15 минут на ротаторе
- Центрифугировать в режиме 10 мин / 2000g / 20-25°C
- Развести 10 мкл надосадочного слоя с 190 мкл буфера для разведения (1:20)
- Перемешать на вортексе
- В тесте используют 50 мкл на лунку

8.4 Моча

- Развести 20 мкл мочи с 480 мкл буфера для разведения
- Перемешать на вортексе
- В тесте используют 50 мкл на лунку

9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Перед использованием тест-системы доведите температуру всех реагентов до комнатной (20 - 25°C). Неиспользуемые реагенты должны быть немедленно помещены в оригинальную упаковку на хранение при +2 °С – +8 °С.

Микротитровальный планшет

Не используемые стрипы должны храниться с осушителем в плотно закрытом оригинальном пакете при температуре 2 - 8 °С.

Конъюгат

Конъюгат поставляется в концентрированном виде (100x). Центрифугированием (в течение 1 минуты при 1000g) обеспечивают стекание концентрата на дно виалы. Концентрат разводят буфером для разведения (напр. 10 мкл концентрата конъюгата + 990 мкл буфера для разведения). На 2 стрипа по 8 лунок требуется 800 мкл раствора конъюгата. Не требуемый концентрат конъюгата должен сразу же быть помещен в темное холодное место (+2°C - +8°C).

Буфер для промывки

Буфер для промывки поставляется в концентрации 20x. Буфер необходимо приготовить непосредственно перед использованием. На один стрип необходимо 40 мл разведенного раствора (2 мл концентрата буфера + 38 мл дистиллированной воды).

Раствор субстрата/хромогена

Раствор субстрата/хромогена (готовый к применению) осаждается при температуре +4°C. Бутылочку с ним необходимо довести до комнатной температуры (в темноте) и перемешать содержимое перед внесением в лунки.

10. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Протокол промывки

При ИФА между каждым этапом иммунологической инкубации должны удаляться несвязанные компоненты. Это достигается посредством соответствующей процедуры промывки. Очевидно, что каждая процедура промывания должна проводиться с большой тщательностью для гарантирования хороших результатов повторяемости и воспроизводимости.

В принципе, промывка вручную или с помощью автоматического вошера может осуществляться следующим образом:

Промывка вручную

1. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.
2. Все лунки заполняют буфером для промывания до края лунки (300 мкл).
3. Этот процесс промывки (этапы 1 и 2) повторяют трижды.
4. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета.
5. После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.
6. Не допускайте высыхания лунок перед внесением следующего реагента.

Промывание 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. Подготовьте пробы в соответствии с разделом 8 (Подготовка проб) и подготовьте реагенты в соответствии с разделом 9 (Подготовка реагентов).
2. Вносят 100 мкл нулевого стандарта в двух повторностях (лунки Н1, Н2, бланк). Вносят 50 мкл нулевого стандарта (макс. опт. плотность) в двух повторностях (лунки А1, А2). Вносят 50 мкл каждого градуировочного раствора в двух повторностях (лунки от В1,2 до G1,2, т.е. 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 и 20.0 нг/мл).
3. Вносят по 50 мкл каждой пробы в двух повторностях
4. Вносят по 50 мкл конъюгата во все лунки за исключением Н1 и Н2.
5. Планшет запечатывают и перемешивают в течение нескольких секунд его содержимое (на шейкере для микротитровальных планшетов либо аккуратными круговыми движениями).
6. Планшет инкубируют в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре (20 °С – 25 °С).
7. Удаляют раствор из микротитровального планшета и промывают 3 раза буфером для промывания.
8. Вносят по 100 мкл раствора субстрата во все лунки.

9. Тщательно перемешивают и инкубируют планшет в темноте в течение 30 минут при комнатной температуре (20 °С – 25 °С).
10. Вносят по 100 мкл стоп-реагента во все лунки.
11. Сразу же измеряют оптическую плотность при 450 нм.

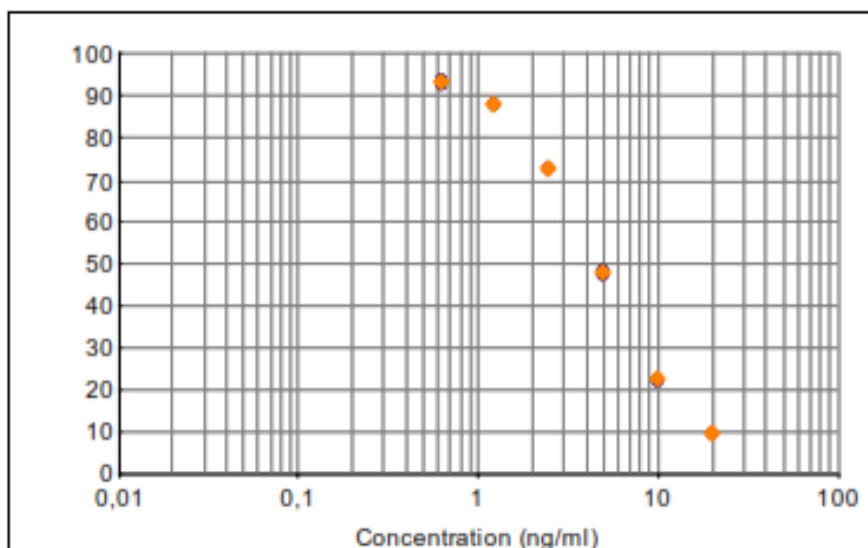
11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычитите среднее значение оптической плотности (ОП) для лунок Н1 и Н2 (бланк) из отдельных значений ОП для лунок, содержащих градуировочные растворы и пробы. Значения ОП для шести градуировочных растворов и проб (среднее значение двух повторностей) делят на среднее значение ОП нулевого градуировочного раствора (лунки А1 и А2) 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.

$$\frac{\text{ОП градуировочного раствора (или пробы)}}{\text{ОП нулевого градуировочного раствора}} \times 100 = \% \text{ связывания}$$

Градуировочная кривая:

Значения (% от максимальной оптической плотности), вычисленные для градуировочных растворов, наносятся на график (по оси Y) напротив эквивалентной концентрации бацитрацина (нг/мл) по логарифмической оси X.



Количество бацитрацина в пробе выражается как эквивалент бацитрацина. Эквивалент бацитрацина в пробе (нг/мл), соответствующий % от максимальной оптической плотности каждого экстракта, может быть получен по градуировочной кривой.

8.1. Пробы молока

Для получения концентрации бацитрацина в пробах молока значение концентрации бацитрацина, полученное по градуировочной кривой, должно быть умножено на 10 для получения значения концентрации бацитрацина в пробе.

8.2. Пробы мяса и яиц

Для получения концентрации бацитрацина в пробах значение концентрации бацитрацина, полученное по градуировочной кривой, должно быть умножено на 15 для получения значения концентрации бацитрацина в пробе.

8.3. Пробы кормов

Для получения концентрации бацитрацина в пробах кормов значение концентрации бацитрацина, полученное по градуировочной кривой, должно быть умножено на 60 для получения значения концентрации бацитрацина в пробе.

8.3. Пробы мочи

Для получения концентрации бацитрацина в пробах мочи значение концентрации бацитрацина, полученное по градуировочной кривой, должно быть умножено на 25 для получения значения концентрации бацитрацина в пробе.

12. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Для размещения заказа на тест-набор на бацитрацина используйте код набора 5151 ВАС.