МАЛАХИТОВЫЙ ЗЕЛЁНЫЙ И КРИСТАЛЛИЧЕСКИЙ ФИОЛЕТОВЫЙ ИФА

5161MGT [3]05.23

Конкурентный иммуноферментный анализ для скрининга и количественного анализа малахитового зеленого, лейкомалахитового зеленого, кристаллического фиолетового и лейкокристаллического фиолетового в рыбе и креветках

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

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

Техническая поддержка
support@komprod.com
+375 17 336 50 54

КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ

EuroProxima Malachite Green Total/Crystal Violet ELISA – это конкурентный иммуноферментный анализ для скрининга и количественного определения малахитового зеленого, лейкомалахитового зеленого, кристаллического фиолетового и лейкокристаллического фиолетового в рыбе и креветках. Образцы и стандарты измеряют в двух экземплярах. С помощью одного набора можно проанализировать 40 образцов.

Набор малахитовый зеленый/кристаллический фиолетовый ИФА содержит все необходимые реагенты, включая стандарты, для проведения теста. Также включены некоторые реагенты, необходимые для пробоподготовки.

1. ВВЕДЕНИЕ

Трифенилметановые красители, такие как малахитовый зеленый (MG) и кристаллический фиолетовый (CV), представляют собой группу органических красителей, широко используемых в промышленности для окрашивания. Они также использовались в аквакультуре для лечения и профилактики грибковых и паразитарных инфекций у рыб, однако из-за их токсического воздействия их никогда не разрешали использовать у рыб для потребления человеком. Эти красители интенсивно абсорбируются и метаболизируются в восстановленные лейкоформы: лейкомалахитовый зеленый (LMG) и лейкокристаллический фиолетовый (LCV), которые могут сохраняться в тканях в течение длительного времени. Обнаружение остатков этих красителей в продуктах аквакультуры указывает на незаконное использование, поскольку допускается только нулевой уровень. В Европейском Союзе минимальный требуемый предел эффективности для метода определения суммы малахитовой зелени и лейкомалахитовой зелени составляет 2 мкг/кг (Решение Комиссии 2002/657/EC). В соответствии с Решением Комиссии 2002/994/EC любой импорт продукции аквакультурного рыболовства из Китая должен проверяться на наличие малахитовой зелени, кристаллического фиолетового и их метаболитов.

Чтобы обеспечить новый метод одновременного обнаружения остатков как малахитового зеленого, так и кристаллического фиолетового, компания R-Biopharm Nederland разработала ИФА малахитового зеленого общего/кристаллического фиолетового (MGT). Тест применим для анализа образцов рыбы и креветок. Во время процедуры пробоподготовки из гомогенизированных образцов сначала выделяют малахитовый зеленый, кристаллический фиолетовый, лейкомалахитовый зеленый и лейкокристаллический фиолетовый. Затем лейкомалахитовый зеленый и лейкокристаллический фиолетовый превращаются в исходные соединения на стадии быстрого окисления. Наконец, образцы анализируют с помощью ИФА малахитового зеленого общего/кристаллического фиолетового, и результаты выражают в виде общей концентрации MG: суммы малахитового зеленого, кристаллического фиолетового, лейкомалахитового зеленого и лейкокристаллического фиолетового.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

Микропланшет для титрования предварительно покрыт антителами против MG (12 стрипов по 8 лунок каждый). В лунки добавляют MG, меченный пероксидазой хрена (-HRP), и стандартный раствор или образец. Свободный MG/CV из образцов или стандартов и конъюгат MG-HRP конкурируют за сайты связывания специфических антител (конкурентный иммуноферментный анализ). После 30-минутной инкубации при комнатной температуре несвязанные реагенты удаляют на стадии промывки. Количество связанного конъюгата MG-HRP визуализируют путем добавления раствора субстрата/хромогена (тетраметилбензидин, ТМБ). Во время инкубации бесцветный хромоген под действием фермента пероксидазы превращается в продукт синего цвета. Насыщенность синего цвета обратно пропорционален количеству связанного MG/CV. Чем больше MG/CV присутствует в стандартном растворе или образце, тем слабее проявляется цвет. Ферментативную реакцию останавливают добавлением серной кислоты. Интенсивность окраски измеряют фотометрически при длине волны 450 нм.

3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Перекрёстная реактивность:

Малахитовый зеленый (MG)	100%
Кристаллический фиолетовый (CV)	65%
Лейкомалахитовый зеленый (LMG)	100% (после окисления)
Лейкокристалл фиолетовый (LCV)	65% (после окисления)

Перекрестную реактивность определяют в буферной системе. Сообщаемые значения могут отличаться в образцах из-за матричных эффектов.

Тест не может различать аналиты и перекрестно-реактивные вещества.

Предел обнаружения (LOD) и способность обнаружения (CCβ) определяются при оптимальных условиях. Критерии Cut-off требуют критического рассмотрения.

Матрица	LOD (нг/г)	CCβ (нг/г)					
		MG	LMG	CV	LCV	MG+LMG	CV+LCV
Рыба и креветки	0.12	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3[1]	0.3[1]

[1]0,15 нг/г MG (или CV) и 0,15 нг/г LMG (или LCV) = 0,30 нг/г всего MG+LMG (или CV+LCV)

Если обнаружено, что образец не соответствует требованиям, результаты должны быть проверены путем повторного анализа образца с использованием подтверждающего метода.

4. ОБРАЩЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ

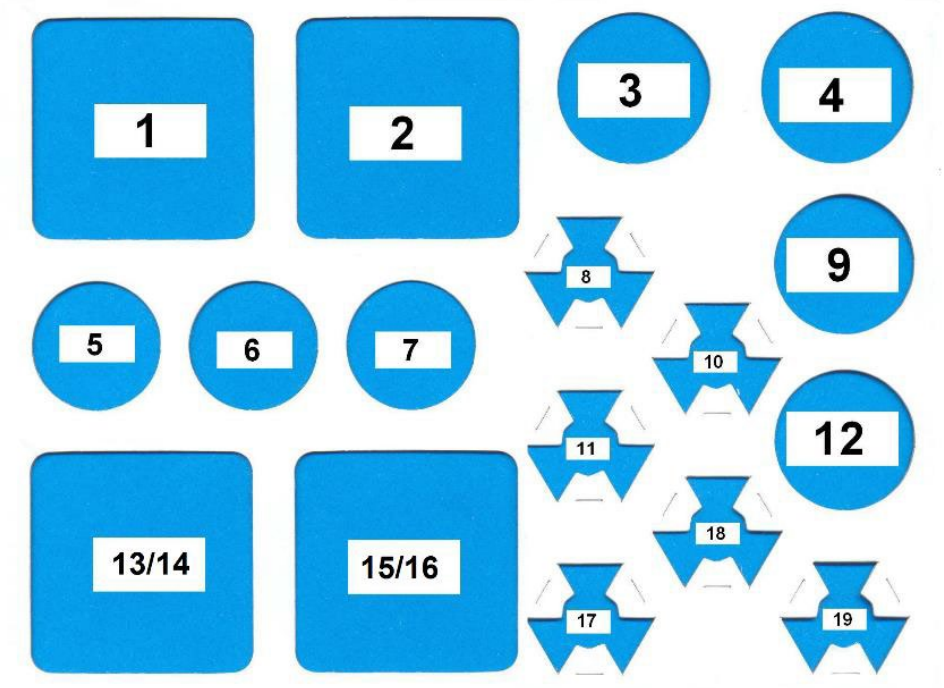
- Набор и его компоненты следует хранить при температуре от 2°C до 8°C в защищенном от света месте. Для повторного использования храните компоненты комплекта, как указано в главе 9.
- После истечения срока годности комплекта и/или компонентов дальнейшая гарантия качества не действительна.
- Перед использованием доведите все компоненты набора, включая планшет для микротитрования, до комнатной температуры.
- Компоненты набора разбавляйте непосредственно перед использованием, но после того, как компоненты будут доведены до температуры окружающей среды.
- Избегайте образования конденсата в лунках планшета. Доведите запечатанную упаковку до комнатной температуры, прежде чем открывать запечатанную пластину.
- Раствор субстратного хромогена можно хранить в холодильнике (от 2°C до 8°C) до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Следует избегать воздействия света на раствор хромогена.

Признаки непригодности реагентов:
- Синяя окраска раствора субстрата, перед внесением его в лунки.
- Слабая или отсутствующая цветовая реакция нулевого стандарта (E450нм < 0,8).

5. СОСТАВ НАБОРА

- Руководство
- Один запечатанный (96-луночный) микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок), покрытый антителом против MG. Готов использовать.
- Шпатель с одной мерной ложкой

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



1. **Буфер для экстракции** (50 мл, готовый к использованию)
2. **Промывочный буфер** (30 мл, 20-кратная концентрация)
3. **Раствор субстрата** (12 мл, готов к использованию)
4. **Стоп-раствор** (12 мл, готов к использованию)
5. Не используется
6. Не используется
7. Не используется
8. **Конъюгат MG-HRP** (100 мкл, 100-кратная концентрация)
9. **Буфер PBS для конъюгата** (13 мл, готов к использованию).
10. **Стандарт MG** (500 мкл, 10 мкг/мл)
11. Не используется
12. Не используется

13/14. **Нейтральный оксид алюминия** (около 45 г)

15/16. **Буфер для разбавления образца** (40 мл, готов к использованию)

17. Не используется
18. **Окисляющий раствор** (1 мл, 10-кратная концентрация)
19. **Раствор LMG** (150 мкл, 10 мкг/мл)

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Весы и сосуды для взвешивания
- Перчатки
- Вытяжной шкаф
- Гомогенизатор
- Вихревой миксер
- Центрифуга (2500×g)
- Автоматический вошер микропланшетов или 8-канальная микропипетка 100 – 300 мкл
- Шейкер для микротитровальных планшетов
- Ридер для микротитровальных планшетов с фильтром 450 нм
- Микропипетки 20 – 200 мкл, 100 – 1000 мкл
- Мультипипетка с наконечниками combitips 2,5 мл
- Алюминиевая фольга или парафильм
- Деионизированная или дистиллированная вода
- Ацетонитрил

- Хлорная кислота (70-72%)
- н-гексан
- полипропиленовые центрифужные пробирки объемом 15 мл
- стеклянные пробирки с пробками объемом 4 мл

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Стоп-раствор содержит серную кислоту. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
- Избегать контакта всех биологических материалов с кожей и слизистыми оболочками.
- 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 после окончания 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 повреждений и загрязнений.
- 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. Креветки и рыба

- Взвесьте 0,5 г гомогенизированного образца в 15 мл полипропиленовой центрифужной пробирке.
- Добавьте 5 мл подкисленного ацетонитрила (см. главу 9), перемешайте на вортексе в течение 2 минут.
- Добавьте 0,75 г – 1 г* нейтрального оксида алюминия (13/14) и 1 мл буфера для экстракции (1). Встряхивайте на вортексе 1 мин.
- Центрифугируйте в течение 5 минут при 2500 × g.
- Перелейте 1 мл верхнего слоя растворителя в стеклянную пробирку и выпарить до суха при 50 °C под струей азота (либо другим доступным способом).
- Восстановите осадок в 100 мкл разбавленного окислительного раствора (см. главу 9 для приготовления), встряхните в течение 10 с, затем немедленно добавьте 300 мкл буфера для разбавления образцов и встряхивайте 5 с.
- Добавить 400 мкл н-гексана к каждому образцу и встряхивайте в течение 5 с.
- Центрифугируйте 10 минут при 2500 × g.
- Удалить верхний гексановый слой и разбавьте нижний слой в 5 раз буфером для разведения образцов, т.е. к 50 мкл образца необходимо добавить 200 мкл буфера для разведения образцов.
- Теперь образец готов к проведению анализа.

* Используйте шпатель, поставляемый в комплекте с набором. К каждому образцу надо добавить один шпатель оксида алюминия.

9. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед началом анализа, реагенты должны быть доведены до комнатной температуры. Любые неиспользуемые реагенты, следует немедленно вернуть на хранение при температуре 2ºC до 8ºC. При длительном хранении смотрите раздел 3 (Хранение).

Микротитровальный планшет

Уберите неиспользуемые стрипы в пакет с осушителем, закройте застёжку пакета и храните при температуре +2ºС до +8ºС для использования в последующих анализах. Сохраните держатель стрипов.

Моющий буфер

Моющий буфер поставляется в виде 20х концентрата. Разведите буфер непосредственно перед использованием. Для 1 стрипа необходимо 40 мл разведенного буфера (2 мл концентрированного моющего буфера + 38 мл дистиллированной воды).

Буфер для разведения образцов

Буфер для разведения образцов поставляется готовым к использованию.

Буфер для конъюгата

Буфер для разведения конъюгата MG-HRP поставляется готовым к использованию.

Раствор конъюгата MG-HRP

Конъюгат MG-HRP поставляется в 100 раз концентрированном виде. Осадите конъюгат с помощью короткого центрифугирования (1 мин, 1000 × g). Объем 0,8 мл разбавленного конъюгата необходим для двух стрипов – 2 х 8 лунок. Добавьте 10 мкл концентрированного раствора конъюгата к 990 мкл буфера для разведения конъюгата перед использованием. Подготовить необходимый объем разбавленного конъюгата, хранить неиспользованный концентрированный конъюгат при температуре от + 2ºС до + 8ºС.

Буфер для разведения стандартов

Подготовьте 5% ацетонитрила в буфере для разведения образцов: добавьте 0,25 мл ацетонитрила к 4,75 мл буфера для разведения образцов и используйте его для приготовления стандартов MG.

Стандарты

Подготовьте серию разведения MG в стандартном буфере для разведения (5% ацетонитрила в буфер для разведения образцов), начиная со стандарта MG 10 мкг/мл, поставляемого с набором.

Промежуточные разведения MG:

100 нг/мл – 10 мкл стандарта MG 10 мкг/мл + 990 мкл буфера для разведения стандартов;

10 нг/мл – 50 мкл раствора MG 100 нг/мл + 450 мкл буфера для разведения стандартов.

Стандартная кривая MG:

0,6 нг/мл – 30 мкл 10 нг/мл + 470 мкл стандартного буфера для разведения;

0,24 нг/мл – 200 мкл 0,6 нг/мл + 300 мкл стандартного буфера для разведения;

0,096 нг/мл – 200 мкл 0,24 нг/мл + 300 мкл стандартного буфера для разведения;

0,0384 нг/мл – 200 мкл 0,096 нг/мл + 300 мкл стандартного буфера для разведения

0,01536 нг/мл – 200 мкл 0,0384 нг/мл + 300 мкл стандартного буфера для разведения;

0,006144 нг/мл – 200 мкл 0,01536 нг/мл + 300 мкл стандартного буфера для разведения.

Готовьте стандарты непосредственно перед использованием.

Раствор субстрата/хромогена

Раствор субстрата/хромогена (готовый к употреблению) имеет тенденцию к образованию осадка при + 4ºС. Перед использованием доведите реагент до комнатной температуры и перемешайте.

Буфер для экстракции

Буфер для экстракции поставляется готовым к использованию.

Окислительный раствор

В наборе окислительный раствор находиться в виде концентрата 10х. Необходимо развести концентрированный раствор в ацетонитриле перед употреблением. Для 8 проб требуется минимум 1 мл рабочего раствора. Добавить 100 мкл концентрированного раствора к 900 мкл ацетонитрила и хорошо перемешать. Подготовить такой объем окислительного раствора, который соответствует анализируемому количеству образцов. Храните разбавленный раствор для окисления в стеклянном флаконе, берегите от попадания света и используйте в течение одного дня. Хранить неиспользованный концентрированный окислительный раствор при температуре от + 2ºС до + 8ºС.

Подкисленный ацетонитрил

Разбавьте концентрированную (70-72%) хлорную кислоту в 1250 раз в ацетонитриле. Для 8 образцов необходимо 40 мкл хлорной кислоты добавить к 50 мл ацетонитрила. Хорошо перемешайте раствор и используйте в день приготовления. Подготовьте такой объем окислительного раствора, который соответствует анализируемому количеству образцов.

10. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Протокол промывки:

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

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

Ручная промывка:

1. Вылейте жидкость из лунок, перевернув микротитровальный планшет вверх дном и удалите оставшуюся жидкость, путем постукивания по бумажному полотенцу.
2. Заполните все лунки моющим буфером по кромку лунки (300 мкл).
3. Цикл отмывки (шаги 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, чтобы удалить остатки моющего буфера из лунок.
6. Не допускайте высыхания лунок до добавления следующего реагента.

Промывка автоматическим оборудованием:

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 буфера для разведения стандарта в 2-х параллелях (лунки H1, H2; бланк)

Добавьте по 50 мкл буфера для разведения стандарта (ОП max) в двух параллелях (лунки A1, A2).

Добавьте по 50 мкл каждого стандарта в двух параллелях (лунки от B1,2 до G1,2, напр., 0.006144, 0.01536, 0.0384, 0.096, 0.24, 0.6 нг/мл).

3. Внесите по 50 мкл каждого исследуемого раствора в двух параллелях в оставшиеся лунки на планшете. (40 проб, 80 лунок).
4. Внесите по 50 мкл конъюгата (малахитовый зеленый – пероксидаза) во все лунки, кроме H1 и H2.
5. Закройте микротитровальный планшет и перемешайте содержимое лунок в течение нескольких секунд с помощью шейкера для микротитровальных планшетов.
6. Инкубируйте 30 минут в темноте при комнатной температуре (от 20оС до 25 ^{o}C).
7. Вылейте раствор из лунок микротитровального планшета и промойте 3 раза моющим буфером.
8. Добавьте 100 мкл раствора субстрата в каждую лунку.
9. Инкубируйте 30 минут в темноте при комнатной температуре (от 20оС до 25°C).
10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
11. Немедленно измерьте оптическую плотность растворов в лунках при 450 нм.

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

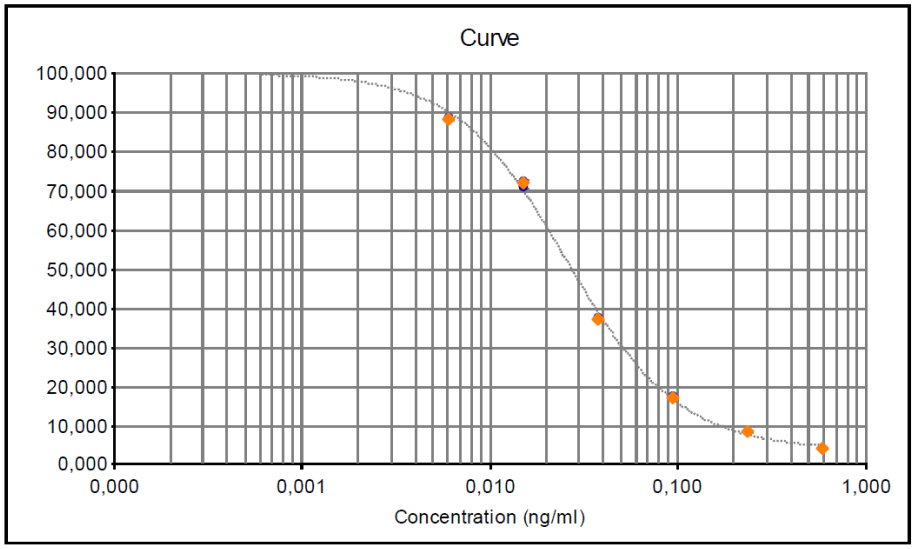
Вычтите среднее значение оптической плотности (ОП) лунок Н1 и Н2 (бланк) из оптической плотности лунок, содержащих стандарты и пробы.

Значения оптических плотностей для шести стандартов и проб (их средние значения для двух параллелей) делят на среднее значение величины оптической плотности для нулевого стандарта (ОПmax, лунки А1 и А2) и умножают на 100. Таким образом, нулевой стандарт (ОПmax) приравнивается к 100% (максимальному поглощению), а другие значения оптических плотностей выражают в процентах от максимальной оптической плотности.

$$\frac{\text{ОП стандарта (или образца)}}{\text{ОП нулевого стандарта}} \times 100 = \%\ \text{макс. абсорбции}$$

<u>Калибровочная кривая:</u>

Полученные величины (% максимальной оптической плотности), рассчитанные для стандартных растворов, откладываются по оси Y, соответствующие концентрации малахитового зеленого (нг/мл) - по оси X (логарифмическая шкала).



Концентрация малахитового зеленого (нг/г), содержащаяся в проанализированных пробах, рассчитывается путем считывания значения с калибровочной кривой и умножения этого значения на 20.

12. ЛИТЕРАТУРА

Commission Decision of 14 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC). OJ L 221, 17.8.2002, p. 8. (with 8 amendments as on 1 July 2015).

Commission Decision of 20 December 2002 concerning certain protective measures with regard to the products of animal origin imported from China (2002/994/EC) OJ L 348, 21.12.2002, p. 154. (with 2 amendments as on 22 December 2003).

Wendy C. Andersen, José E. Roybal, Sherri B. Turnipseed. (2004) Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green in Salmon with In-Situ Oxidation and Liquid Chromatography with Visible Detection. FDA/ORA/DFS Laboratory Information Bulletin No. 4334, 20(11), 1-13.

13. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Для заказа тест-системы EuroProxima Malachite Green Total/Crystal Violet используйте каталожный код 5161MGT.

14. ИСТОРИЯ ВЕРСИЙ

Название продукта было изменено с EuroProxima Malachite Green Total ELISA на EuroProxima Malachite Green Total/Crystal Violet ELISA.