

Окадаиковая кислота ИФА

5191ОКА [5]05.23

Конкурентный иммуноферментный анализ для количественного определения
окадаиковой кислоты в образцах гребешков, мидий и устриц

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

+7 499 911 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 444 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

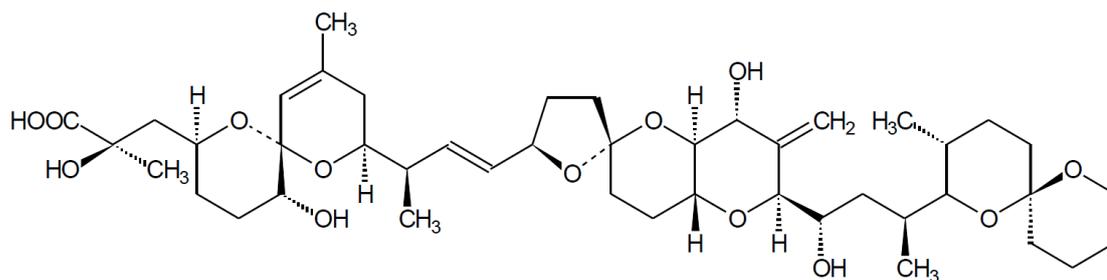
+375 17 336 50 54



КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ

Тест-набор для ИФА окадаиковой кислоты это конкурентный иммуноферментный анализ для скрининга и количественного анализа окадаиковой кислоты в различных матрицах. Основой тест-набора являются кроличьи поликлональные антитела к окадаиковой кислоте. С помощью этого ИФА-набора возможно проведение 96 определений. Анализ проб и градуировочных растворов выполняется в параллелях, таким образом, с помощью одного набора может быть осуществлен анализ 40 проб. Тест-набор содержит все реагенты, включая готовые градуировочные растворы, необходимые для проведения анализа. Материалы и реагенты, необходимые для экстрагирования окадаиковой кислоты из пробы, не включены в тест-набор.

1. ВВЕДЕНИЕ



Химическая структура окадаиковой кислоты (ОА)

Морские биотоксины, также называемые фитотоксинами или токсинами моллюсков, представляют собой природные соединения, вырабатываемые водорослями и фитопланктоном. В нормальных условиях эти соединения не вызывают никаких проблем. Однако фильтраторы, такие как моллюски, мидии, устрицы и ракообразные, могут потреблять большие количества этих водорослей, когда условия окружающей среды приводят к вредоносному цветению водорослей, также известному как «красные приливы». Высокие концентрации токсинов моллюсков затем накапливаются в организме этих животных, вызывая заболевания среди людей, которые их едят. Существует четыре синдрома, называемых отравлением моллюсками: паралитическое отравление моллюсками (PSP), нейротоксическое отравление моллюсками (NSP), диарейное отравление моллюсками (DSP) и амнестическое отравление моллюсками (ASP). Сообщается, что эти отравления вызывают различные симптомы, включая спазмы желудка, боли в животе, диарею, головные боли, потерю памяти, паралич и в некоторых случаях даже смерть.

ПСП вызывается сакситоксином и его аналогами. DSP в первую очередь вызывается окадаиновой кислотой (ОА) и несколькими аналогами ОА, тогда как ASP вызывается домоевой кислотой (DA).

ОА, полиэфирный токсин, является мощным промотором опухоли. Он был назван в честь морской губки *Halichondria okadaei*, из которой он был впервые выделен. Настоящие продуценты ОА относятся к группе водорослей динофлагеллят.

ОА и его аналоги — динофизистоксины (DTX1, DTX2 и DTX3) вместе образуют группу ОА-токсинов. Эти токсины липофильны и термостабильны и могут быть обнаружены в различных видах моллюсков. Предполагается, что механизм действия токсинов ОА-группы заключается в ингибировании серин/треонин-фосфопротеинфосфатаз.

В Европейском Союзе Регламент (ЕС) № 853/2004 предусматривает, что живые двустворчатые моллюски не должны содержать ОА в общем количестве (измеренном во всем теле или любой части, съедобной отдельно), превышающей предел в 160 мкг эквивалентов ОА (ОА, динофизистоксины) и пектенотоксины вместе) на килограмм.

2. ПРИНЦИПЫ ИФА НИТРОФУРАНА АНД

Тест-набор для проведения ИФА включает 12 стрипов по 8 лунок, сенсублизированных антителами к кроличьим иммуноглобулинам. Антитела (кроличьи поликлональные антитела к окадаиковой кислоте), окадаиковая кислота, маркированная пероксидазой хрена (ферментно маркированный конъюгат), градуировочные растворы либо растворы проб вносятся в лунки планшета.

Во время инкубации кроличьи антитела к оокадиновой кислоте связываются с иммобилизованными антителами захвата в лунках планшета, одновременно с этим оокадиновая кислота, присутствующая в пробе либо градуировочном растворе, конкурируя с ферментно маркированным конъюгатом, связывается с антителами к оокадиновой кислоте (конкурентный ИФА). После 30-минутной инкубации несвязанные реагенты удаляются на стадии промывки

Количество связанной ферментно маркированной оокадиновой кислоты визуализируется внесением смеси субстрат/хромоген. Бесцветный хромоген окрашивает фермент (пероксидазу хрена) в голубой цвет. Большое количество оокадиновой кислоты в пробе или градуировочном растворе вызывает более слабое окрашивание. Реакция окрашивания останавливается внесением серной кислоты. В кислой среде голубой цвет изменяется на желтый. Интенсивность окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм, она обратно пропорциональна концентрации оокадиновой кислоты в пробе.

3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для данного набора ИФА для определения оокадиновой кислотой используют специфическое антитело, полученное путем иммунизации кроликов конъюгатом с белком домовой кислоты.

Перекрестная реактивность:

Оокадиновая кислота	100%
Динофизистоксины DTX-1	8%
Динофизистоксины DTX-2	3%
Сакситоксин	0%
Неосакситоксин	0%
Домоевая кислота	0%
DC-STX	0%
Гониаутоксины	0%

Перекрестную реактивность определяют в буферной системе. Полученные значения могут отличаться от значений, полученных для реальных образцов из-за влияния эффектов матрицы.

Тест не позволяет отличить аналиты от перекрестно-реактивных веществ.

Предел обнаружения (LOD) определяется в оптимальных условиях. Критерии CUT-OFF требуют критического рассмотрения.

Матрица	LOD (ppb)
Мидии	50
Устрицы	50

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

4. УСЛОВИЯ ОБРАЩЕНИЯ И ХРАНЕНИЕ

- Набор реагентов должен храниться при температуре от +2°C до +8°C в темном месте. Не замораживать.

- Неиспользованные лунки планшета должны храниться закрытыми в оригинальной упаковке.

- После истечения срока годности невозможно гарантировать приемлемое качество.

- Восстанавливать или разводить компоненты набора необходимо непосредственно перед использованием, но после того, как компоненты согрелись до комнатной температуры.

- Необходимо избегать любого прямого воздействия света на раствор субстрата/хромогена.

- Окрашивание хромогена является признаком порчи реагентов. Реагент должен быть утилизирован.

- Стоп-реагент содержит серную кислоту. Следует избегать контакта с кожей.

- Разведение реагентов либо их замена по истечении срока годности тест-набора может повлиять на чувствительность тест-набора.

- Оптическая плотность нулевого градуировочного раствора менее 0,8 опт. единиц может означать порчу реагентов

- Избегайте попадания пузырьков воздуха в лунки при проведении анализа. Перед считыванием результатов на фотометре убедитесь в отсутствии пузырьков в лунках, т.к. это может повлиять на результат считывания оптической плотности.

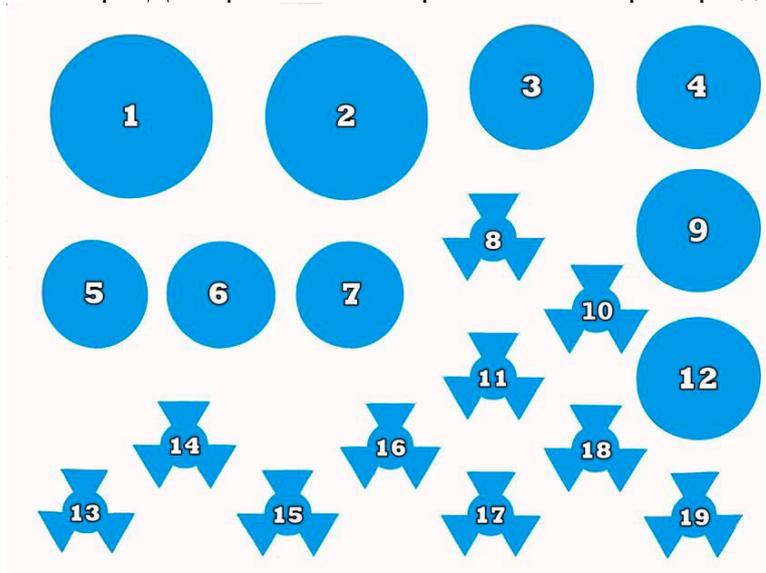
- Окадаиновая кислота распадается при воздействии света или тепла.

5. СОСТАВ НАБОРА

Инструкция

Один запечатанный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок),

Позиции реагентов в наборе. Для приготовления реагентов смотрите раздел 8.



1. Буфер для разведения (30 мл, концентрации 10х)
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. не используется
6. Антитела (лиофилизат, желтая крышка)
7. не используется
8. Конъюгат (концентрации 100х, голубая крышка)
9. не используется
10. не используется
11. не используется
12. не используется
13. Нулевой градуировочный раствор (2 мл, готов для применения)
14. Градуировочный раствор 1 (1 мл, готов для применения) 0,2 нг/мл
15. Градуировочный раствор 2 (1 мл, готов для применения) 0,5 нг/мл
16. Градуировочный раствор 3 (1 мл, готов для применения) 1,0 нг/мл
17. Градуировочный раствор 4 (1 мл, готов для применения) 2,0 нг/мл
18. Градуировочный раствор 5 (1 мл, готов для применения) 5,0 нг/мл
19. Градуировочный раствор 6 (1 мл, готов для применения) 10,0 нг/мл

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- весы, емкости для взвешивания;
- перчатки;
- вытяжной шкаф;
- гомогенизатор (миксер);
- центрифуга (4000*g);
- вортекс;

- автоматическое устройство для промывки планшетов либо многоканальный пипет-дозатор 100-300 мкл;
- шейкер для микротитровальных планшетов;
- микропланшетный фотометр с фильтром 450 нм;
- пробирки стеклянные (10-15 мл) ;
- пипет-дозаторы 0,5-10 мкл;
- пипет-дозаторы 100-1000 мкл;
- пипет-дозатор 2,5 мл;
- метанол;
- фильтры 0,45 мкм;
- дистиллированная вода.

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. ПРОБОПОДГОТОВКА

Тест-набор может быть использован для определения омега-3 кислоты в различных матрицах. Мы представили Вам информацию о различных вариантах пробоподготовки, но возможно также использование альтернативных методов.

Моллюски

- Гомогенизировать 1 г мяса моллюска, добавить 1 мл воды
- Перемешать на вортексе в течение 1 минуты
- Добавить 2 мл 100% метанола
- Перемешать на вортексе в течение 1 минуты
- Центрифугировать в режиме 10 мин / 2000 g / комнатная температура (20-25°C)
- Отобрать супернатант, профильтровать через фильтр 0.45 мкм (Millex HV, Millipore).
- Развести супернатант буфером для разведения проб* в пропорции 1:50 (10 мкл пробы + 490 мкл буфера), тщательно перемешать
- В тесте используют 50 мкл на лунку

Примечание: часто после охлаждения экстракта пробы появляются мелкие частицы в ее экстракте. Поэтому рекомендуется фильтрация пробы перед приготовлением ее разведений.

* Буфер для разведения проб

9,2 мл буфера для разведения (готового к применению) + 0,8 мл 100% метанола.

9. ПОДГОТОВКА 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°C–+8°C. Для длительного хранения см. раздел 4 (Условия обращения и хранения).

Тест-набор содержит количество реагентов, достаточное для проведения не менее 96 анализов (включая градуировку). Анализ каждого градуировочного раствора и пробы выполняется в повторностях.

Микротитровальный планшет

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

Буфер для промывки

Буфер для промывки поставляется в концентрации 20х. Раствор должен готовиться непосредственно перед использованием. Для каждого стрипа необходимо 40 мл разведенного буфера для промывки (2 мл концентрированного буфера + 38 мл дистиллированной воды).

Раствор субстрата

Раствор субстрата (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.

Буфер для разведения (концентрации 10х)

Буфер для разведения поставляется в концентрации 10х. Перед разведением (10 мл концентрата буфера + 90 мл дистиллированной воды) буфер необходимо довести до комнатной температуры и тщательно перемешать. Раствор буфера может кристаллизоваться при температуре +4°C, поэтому его необходимо тщательно перемешать перед разведением дистиллированной водой. Разведенный буфер может храниться в холодильнике (+2°C - +8°C) до окончания срока годности, указанного на этикетке.

Конъюгат

Ферментно маркированный конъюгат оокадаиковой кислоты поставляется в концентрированном виде. Центрифугированием (в течение 1 минуты при 1000g) обеспечивают стекание концентрата на дно бутылочки. Концентрат разводят буфером для разведения (напр. 5 мкл концентрата конъюгата + 495 мкл буфера для разведения). На 2 стрипа по 8 лунок требуется 400 мкл раствора конъюгата. Не требуемый концентрат конъюгата должен сразу же быть помещен в темное холодное место (+2°C - +8°C).

Антитела к оокадаиковой кислоте

Антитела к оокадаиковой кислоте поставляются в лиофилизованном виде. Восстановление антител осуществляется добавлением 4 мл буфера для разведения и тщательным перемешиванием.

Восстановленные антитела должны сразу же быть помещены в темное холодное место (+2°C - +8°C).

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
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 Подготовка проб и подготовьте реагенты в соответствии с разделом Подготовка реагентов. Микротитровальный планшет готов к использованию.

2. Вносят 100 мкл нулевого градуировочного раствора в двух повторностях (лунки Н1, Н2)

Вносят 50 мкл нулевого градуировочного раствора в двух повторностях (лунки А1, А2)

Вносят 50 мкл каждого градуировочного раствора в двух повторностях (лунки от В1,2 до G1,2, т.е. 0,2, 0,5, 1, 2, 5 и 10 нг/мл)

Вносят по 50 мкл каждой пробы в двух повторностях (40 проб, 80 лунок)

3. Вносят по 25 мкл конъюгата во все лунки за исключением Н1 и Н2.

4. Вносят по 25 мкл раствора антител во все лунки за исключением Н1 и Н2.

5. Планшет запечатывают и аккуратными круговыми движениями в течение 1 мин. перемешивают его содержимое.

6. Планшет инкубируют в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре (20°C - 25°C).

7. Удаляют раствор из микротитровального планшета и промывают 3 раза буфером для промывания.

8. Вносят по 100 мкл раствора субстрата во все лунки. Тщательно перемешивают и инкубируют планшет в течение 15 минут при комнатной температуре (20°C - 25°C).

9. Вносят по 100 мкл стоп-реагента во все лунки.

10. Сразу же измеряют оптическую плотность при 450 нм.

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

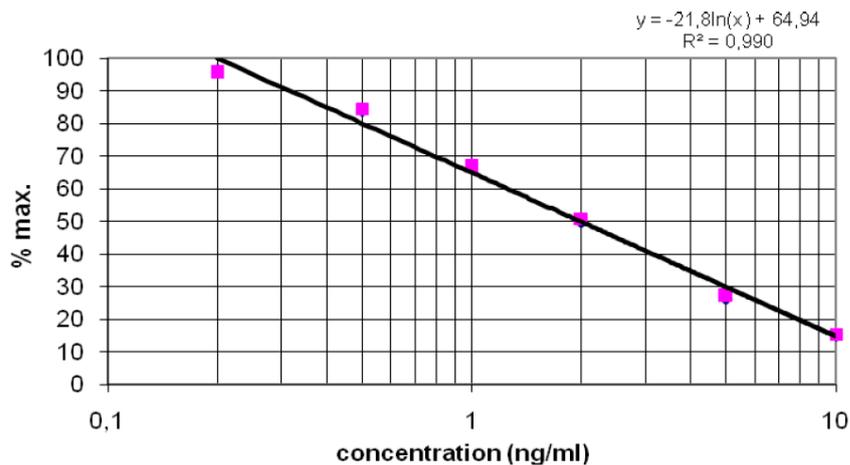
Вычитите среднее значение оптической плотности (O.D.) для лунок А1 и А2 из отдельных значений O.D. для лунок, содержащих градуировочные растворы и пробы.

Значения O.D. для шести градуировочных растворов и проб (среднее значение двух повторностей) делят на среднее значение O.D. нулевого градуировочного раствора (лунки В1 и В2) и умножают на 100. Таким образом, нулевой градуировочный раствор принимается за 100% (максимальная оптическая плотность) и другие значения O.D. приводятся в процентах от максимальной оптической плотности.

$$\frac{\text{ОП стандарта (или образца)}}{\text{ОП стандарта 0 нг/мл}} \times 100\% = \% \text{ от максимальной оптической плотности}$$

Градуировочная кривая:

Значения (% от максимальной оптической плотности), вычисленные для градуировочных растворов, наносятся на график (по оси Y) напротив эквивалентной концентрации оокадаиковой кислоты (нг/мл) по логарифмической оси X. Градуировочная кривая должна быть практически линейна в диапазоне 0,2 – 10 нг/мл.



Пример градуировочной кривой

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

Значение концентрации октадионовых кислот, полученное по градуировочной кривой, должно быть умножено на 200 для получения значения концентрации октадионовых кислот в пробе.

12. ЛИТЕРАТУРА

M. Dubois, L. Demoulin, C. Charlier, G. Singh, S.B. Godefroy, K. Campbell, C.T. Elliott, and Ph. Delahaut (2010). Development of ELISA's for detecting domoic acid, okadaic acid, and saxitoxin and their applicability for the detection of marine toxins in samples collected in Belgium. *Food Additives Contam.* 27(6): 859-868.

European Commission 2004. Commission regulation 853/2004/EC of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Off. J. Eur. Comm.* L226: 22-82.

13. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Для заказа тест-системы используйте артикул 5191ОКА.

14. ИСТОРИЯ ИЗМЕНЕНИЙ

Изменения по тексту и дополнение п. 3.