

**Тест-система для определения энрофлоксацина
в пищевых продуктах
методом иммуноферментного анализа
«МУЛЬТИСКРИН® ЭНРОФЛОКСАЦИН»**

Иммуноферментный метод
для количественного определения энрофлоксацина



Официальный дистрибьютор
R-Biopharm в Беларуси
ОДО "КомПродСервис"
+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50
www.komprod.com, info@komprod.com

1. Принцип метода

Принцип работы набора для обнаружения энрофлоксацина основан на конкурентном иммуноферментном анализе. Лунки иммунологического планшета сенсibilизированы энрофлоксацином. Энрофлоксацин в образце и энрофлоксацин, локализованный на поверхности лунок, конкурируют за связывание со специфичными антителами. После последовательного добавления в лунки ферментного конъюгата и тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание раствора. Значение оптической плотности (ОП) раствора отрицательно коррелирует с концентрацией энрофлоксацина в образце.

2. Технические характеристики

Чувствительность: 1 ppb.

Температура инкубации: 25°C.

Время инкубации: 30 мин – 15 мин.

Предел обнаружения:

Ткани, яйцо – 1 ppb.

Сыворотка, мед – 2 ppb.

Примечание: ppb = мкг/кг.

Кросс-реактивность:

Энрофлоксацин – 100%.

Степень извлечения:

Ткань, яйцо, сыворотка – 80 ± 15%.

Мед – 75 ± 15 %.

3. Компоненты

1. Иммунологический планшет, 12 стрипов, каждый состоящих из 8 лунок.
2. 6 градуировочных растворов (по 1 мл каждый): 0 ppb, 1 ppb, 3 ppb, 9 ppb, 27 ppb, 81 ppb; спайк – 1 ppm.
3. Ферментный конъюгат, 7 мл, красная крышка.
4. Рабочий раствор антител, 7 мл, синяя крышка.
5. Субстрат А, 7 мл, белая крышка.
6. Субстрат В, 7 мл, черная крышка.
7. Стоп раствор, 7 мл, желтая крышка.
8. Промывочный буфер, концентрат (x 20), 40 мл, белая крышка.
9. Раствор для повторного растворения образца, концентрат (x 2), 50 мл, прозрачная крышка.

4. Необходимые, но не предоставляемые материалы

1. Оборудование: микропланшетный ридер (450 нм, 630 нм), вортекс, градуированные пипетки, весы (чувствительность 0,01 г), гомогенизатор, шейкер, центрифуга (4000 г и выше), испаритель.

2. Микродозаторы: одноканальные 20 ~ 200 мкл, 100 ~ 1000 мкл; многоканальные 30 ~ 300 мкл.

3. Реагенты: HCl, метиленхлорид, ацетонитрил, н-гексан, Na₂HPO₄·12H₂O, NaH₂PO₄·2H₂O, натриевая соль гепарина.

5. Предварительная обработка образца

Инструкция. Следующие пункты необходимо учесть до проведения этапа подготовки проб:

- 1) в эксперименте можно использовать только одноразовые наконечники, наконечники следует менять при использовании других реагентов;
- 2) перед экспериментом все оборудование должно быть чистым и, при необходимости, должно быть очищено повторно, чтобы избежать загрязнения, которое может повлиять на результаты эксперимента;
- 3) этот набор можно использовать для тестирования образцов тканей животных, домашней птицы, водных организмов, например – курицы, утки, крупного рогатого скота, кроликов, рыбы, креветок и т.д.

Приготовление растворов:

- 1) 0.1 М HCl: 860 мкл HCl (36%) + деионизированная вода 100 мл.
- 2) Ацетонитрил (CH₃CN) – Метиленхлорид ($V_{\text{ацетонитрил}} - V_{\text{метиленхлорид}} = 1:4$).
- 3) pH 7,2; 0,02 М фосфатный буфер: растворить 5,16 г Na₂HPO₄ x 12 H₂O + 0,87 г NaH₂PO₄ x 2 H₂O в 1 л деионизированной воды.
- 4) Раствор Ацетонитрил (CH₃CN) – метиленхлорид – 0.1 М HCl
К 100 мл раствора Ацетонитрил – Метиленхлорид ($V_{\text{ацетонитрил}} - V_{\text{метиленхлорид}} = 4:1$), добавляют 5 мл раствора 0.1 М HCl.
- 5) 2-х концентрированный раствор для повторного растворения разбавляют деионизированной водой в соотношении 1:1 (1 мл концентрированного раствора для повторного растворения + 1 мл деионизированной воды).

5.1 Ткани (курица/печень, свинина/печень, рыба, креветки и т. д.), яйца

- 1) Взвесьте 2,0 ± 0,05 г гомогенизированного образца ткани или яйца в центрифужную пробирку на 50 мл.
- 2) Добавьте 8 мл раствора ацетонитрил-метиленхлорида, встряхивайте в течение 5 мин, центрифугируйте 4000 об/мин при 15 °С в течение 10 мин.
- 3) Отберите 4 мл прозрачной органической фазы в сухую пробирку, выпаривайте досуха в токе азота или воздуха на роторном испарителе при 56°С.
- 4) Растворите сухой остаток в 1 мл раствора для повторного растворения, добавьте 1 мл н-гексана, перемешайте в течение 30 секунд; центрифугируйте со скоростью более 4000 об/мин при 15°С в течение 5 мин.
- 5) Удалите верхний слой, отберите 50 мкл нижнего слоя для дальнейшего анализа.

Фактор разведения: 1.

5.2 Сыворотка

- 1) Используйте центрифужную пробирку с гепарином натрия (20-30 единиц/мл крови) для взятия образца крови цыпленка (Рекомендация: шприцы для забора крови рекомендуется промывать гепарином). Поместите образец крови в комнатную температуру на 1 час. После образования плазмы центрифугируйте образец со скоростью выше 4000 об/мин при 15 С в течение 10 минут, отберите 1 мл плазмы.
- 2) Добавьте 4 мл безводного ацетонитрила, тщательно перемешайте в течение 5 минут, центрифугируйте со скоростью выше 4000 об/мин при 15 С в течение 10 минут.
- 3) Переместите прозрачный супернатант (верхний слой) в другую пробирку для центрифугирования, добавьте 2 мл 0,02 М фосфатного буфера, перемешайте.
- 4) Добавьте 5 мл метиленхлорида, равномерно перемешайте в течение 5 мин, центрифугируйте со скоростью выше 4000 об/мин при 15 С в течение 10 минут, удалите верхний слой, перенесите нижнюю органическую фазу в сухую пробирку, выпаривайте досуха в токе азота или воздуха на роторном испарителе при 50°C.
- 5) Растворите сухой остаток в 1 мл раствора для повторного растворения, добавьте 1 мл н-гексана, перемешайте в течение 30 секунд; центрифугируйте со скоростью более 4000 об/мин при 15 С в течение 5 мин.
- 6) Удалите верхний и средний слои, отберите 100 мкл нижней фазы, добавить к ней 100 мкл раствора для повторного растворения, перемешайте в течение 30 секунд.
- 7) Отберите 50 мкл раствора для дальнейшего анализа.

Фактор разведения: 2.

5.3 Мед

- 1) Взвесьте $2,0 \pm 0,05$ г меда в 50 мл центрифужную пробирку, добавьте 8 мл раствора ацетонитрила-метиленхлорида-0.1 М HCl, встряхивайте 3 мин, центрифугируйте при 4000 об/мин при 15 С в течение 10 мин.
- 2) Отберите 2 мл супернатанта (верхний слой) в сухую пробирку, выпаривайте досуха в токе азота или воздуха на роторном испарителе при 56°C.
- 3) Растворите сухой остаток в 1 мл раствора для повторного растворения, перемешайте в течение 1 мин.
- 3) Отберите 50 мкл для последующего анализа.

Фактор разведения: 2.

6. Этапы выполнения ИФА

6.1 Инструкция

1. Доведите температуру всех реагентов и иммунологических стрипов до комнатной (20-25 °С).
2. Сразу после использования верните все реагенты в температуру 2-8 °С.
3. Воспроизводимость результатов ИФА, в значительной степени, зависит от качества процедур промывки. Правильная процедура промывки является ключевым моментом в проведении ИФА.
4. Избегайте при проведении инкубации в условиях постоянной температуры воздействия света на все образцы и реагенты, микропланшет должен быть закрыт пленкой.

6.2 Операционные процедуры

1. Перед использованием необходимо выдержать компоненты набора при комнатной температуре (20-25 °С) в течение не менее 30 мин, перед использованием аккуратно встряхните каждый реагент.
2. Поместите необходимое количество микролуночных стрипов в рамку планшета. Запечатайте неиспользованные стрипы и храните их при 2-8 °С, не замораживайте.
3. Разбавьте необходимое количество 20-кратного промывочного буфера деионизированной водой в соотношении 1:19 (1 часть 20-кратного моющего буфера + 19 частей деионизированной воды).
4. Пронумеруйте микролуночки; каждый образец и стандартный раствор следует выполнять в двух экземплярах;
5. Добавьте 50 мкл образца или стандартного раствора в лунки, добавить 50 мкл ферментного конъюгата, затем добавьте 50 мкл рабочего раствора антител в каждую лунку. Перемешайте осторожным встряхиванием, закройте микропланшет мембраной и инкубируйте при 25°С в течение 30 минут.
6. Промойте микропланшет промывочным буфером из расчета 250 мкл/лунка от четырех до пяти раз; заполните лунку промывочным буфером на 15-30 секунд. Слейте жидкость из лунок в раковину. Выбейте оставшуюся воду из лунок, перевернув их вверх дном и постукивая лунками о чистое фильтровальное полотенце (три раза подряд). Используя многоканальную пипетку, заполните лунки (250 мкл на лунку) промывочным буфером. Снова опорожните лунки и удалите всю оставшуюся жидкость.
7. Добавьте 50 мкл раствора субстрата А и 50 мкл раствора В в каждую лунку. Аккуратно смешайте встряхиванием и инкубируйте при 25°С в течение 15 мин в темноте;
8. Добавьте 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку. Смешайте легким встряхиванием. Установите длину волны ридера на 450 нм. Рекомендуется считывать оптическую плотность на двойной длине волны 450/630 нм не позднее 5 минут после остановки реакции.

7. Оценка результатов

Есть два способа оценить результаты измерений: первый – это грубая качественная оценка, а второй – количественная оценка. Обратите внимание, что значение ОП образца отрицательно коррелирует с содержанием энрофлоксацина в образце.

7.1 Качественная оценка

Диапазон концентраций (нг/мл) в пределах которых находится энрофлоксацин в образце может быть получен путем сравнения среднего значения ОП тестируемого образца со значением ОП стандартного раствора и последующим умножением на фактор разведения. Предположим, что значение ОП образца I равно 0.238, а значения образца II равно 0.946, значение ОП стандартных растворов составляет: 1.845 для 0 ppb, 1.542 для 1 ppb, 1.130 для 3 ppb, 0.635 для 9 ppb, 0.326 для 27 ppb, 0.156 для 81 ppb, соответственно, диапазон концентраций энрофлоксацина в образце I составляет от 27 до 81 ppb, а диапазон концентраций энрофлоксацина в образце II – от 3 до 9 ppb.

Количественная оценка

Значения ОП для стандартных растворов и проб (среднее значение двух параллельных измерений) делят на среднее значение ОП нулевого стандартного раствора и умножают на 100. Таким образом, нулевой стандартный раствор принимается за 100% (максимальная оптическая плотность) и другие значения ОП приводятся в процентах от максимальной ОП.

$$\frac{B}{B_0} \times 100\% = \% \text{ от максимальной ОП}$$

B – среднее (значений двух лунок) ОП тестируемого образца или стандартного раствора,
B₀ – среднее (значений двух лунок) ОП стандартного раствора 0 нг/мл.

Нарисуйте стандартную кривую с процентами поглощения стандартных растворов и полулогарифмическими значениями концентраций энрофлоксацина в стандартных растворах (нг/мл) в качестве значений осей Y и X соответственно. Рассчитайте соответствующую концентрацию энрофлоксацина в тестируемом образце из стандартной кривой, соотнесите, на стандартной кривой, процент поглощения образца и соответствующую концентрацию энрофлоксацина. Полученное значение концентрации умножьте на соответствующую кратность разведения, и в итоге получите реальную концентрацию энрофлоксацина в образце.

8. Меры предосторожности

1. Комнатная температура ниже 25 °C или использование реагентов и тестовых образцов не прогретых до 20-25 °C приведет к снижению значений ОП.
2. Не допускайте высыхания лунок перед внесением следующего реагента это может привести к нарушению линейности стандартной кривой и нарушению воспроизводимости,

поэтому переходите к следующему этапу анализа сразу после промывки. Перед использованием встряхните реагенты, избегая образования пузырей.

3. Смешайте реагенты равномерно, в противном случае будет нежелательная воспроизводимость.

4. Стоп-раствор – это 2 М раствор серной кислоты, избегайте контакта раствора с кожей.

5. Не используйте набор с истекшим сроком годности. Использование разбавленных или фальсифицированных реагентов из наборов приведет к изменению чувствительности и искажению значений ОП. Не используйте компоненты из разных партий.

6. Поместите неиспользованные стрипы в пакет, запечатайте его. Стандарты и окрашивающий реагент чувствительны к свету, поэтому не подвергайте их прямому воздействию света.

7. Окрашивающий раствор должен быть бесцветным, при появлении любого окрашивания раствор считается непригодным к использованию. Оптическая плотность нулевого стандарта должна быть не менее 0,5 единиц поглощения ($A_{450\text{ нм}} > 0,5$).

8. Оптимальная температура реакции составляет 25 °С, а слишком высокая или слишком низкая температура приведет к изменениям чувствительности обнаружения и изменению значений оптической плотности.

9. Хранение и срок годности

Хранение: хранить при 2-8 °С, не замораживать.

Срок годности: 12 месяцев; дата изготовления указана на коробке.

Примечание: тест можно использовать даже при поврежденной упаковке микропланшета.



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

