Тест-система для определения никарбазина в пищевых продуктах методом иммуноферментного анализа «МУЛЬТИСКРИН®НИКАРБАЗИН»

Иммуноферментный метод
для количественного определения никарбазина

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

Данный тест-набор основан на непрямом конкурентном иммуноферментном анализе для обнаружения никарбазина. Лунки микропланшета предварительно покрываются связанным антигеном. Никарбазин в образце, конкурируя с антигенами на поверхности микролунок, связывается с антителом. После добавления ферментного конъюгата добавляется субстрат ТМБ для окрашивания. Оптическая плотность (OD) обратно пропорциональна концентрации никарбазина в образце. Это значение сравнивается со стандартной кривой, после чего определяется остаток никарбазина.

2 Технические характеристики

Чувствительность: 0.1 ppb

Температура инкубации: 25°C

Время инкубации: 30 мин～15 мин

Предел обнаружения:

Ткани	10 ppb
Корм	20 ppb

Перекрестная чувствительность:

Никарбазин	100%

Степень извлечения:

Ткани, Корм	70%-120%

3 Состав набора

1	Микро-стрипы	12 стрипов с 8 съемными лунками каждый	
2	6× раствор стандарта (по 1 мл каждый)	**0 ppb** **0.1 ppb** **0.3 ppb** **0.9 ppb** **2.7 ppb** **8.1 ppb**	
3	Ферментный конъюгат	7 мл	красная крышка
4	Раствор антител	7 мл	голубая 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 концентрации 20x	15 мл	белая крышка
9	Растворитель для образцов	50 мл×2	прозрачная крышка

4 Необходимые, но не предоставляемые материалы и оборудование

1) Оборудование:

- ИФА-ридер (длин волны – 450 нм/630 нм)
- Гомогенизатор
- Шейкер
- Центрифуга
- Высокоточные весы ценой деления 0.01 г
- Инкубатор

- Градуированные пипетки
- Принтер

2) **Пипет-дозаторы переменного объема**
   - одноканальные 20 мкл ~ 200 мкл, 100 мкл ~ 1000 мкл
   - многоканальный 30～300 мкл
3) **Реагенты:** Ацетонитрил**.**

5 Предварительная обработка образцов

Инструкции (Перед предварительной обработкой необходимо выполнить следующие пункты)

1) Для проведения экспериментов можно использовать только одноразовые наконечники, которые необходимо менять при использовании для забора различных реагентов;
2) Все лабораторные принадлежности должны быть чистыми и при необходимости повторно очищаться, чтобы избежать загрязнения, мешающего получению результатов теста.

Пробоподготовка

5.1 Приготовление проб ткани

1) Отобрать 1.0±0.05 г образца ткани в пробирку на 10 мл для центрифугирования, добавить 2 мл ацетонитрила, смешать на вортексе в течение 5 мин;
2) Центрифугировать на 4000 об./мин при комнатной температуре (20℃ - 25℃) в течение 5 мин;
3) Отобрать 50 мкл супернатанта, добавить 950 мкл растворителя для образцов, интенсивно встряхивать для полного смешивания в течение 30 сек;
4) Отобрать 50 мкл для теста.

Коэффициент разбавления: 40

5.2 Приготовление проб корма

5) Отобрать 5.0±0.05 г пробы корма в пробирку на 50 мл для центрифугирования, добавить 20 мл ацетонитрила, смешать на вортексе в течение 5 мин;

1) Центрифугировать на 4000 об./мин при комнатной температуре (20℃ - 25℃) в течение 5 мин;
2) Отобрать 50 мкл супернатанта, добавить 950 мкл растворителя для образцов, интенсивно встряхивать для полного смешивания в течение 30 сек;
3) Отобрать 50 мкл для теста.

Коэффициент разбавления: 80

6 Процедура ИФА

6.1 Инструкции

1. Перед использованием доведите реагенты для ИФА до комнатной температуры (20 – 25 °C).
2. Сразу после использования верните реагенты для ИФА в условия 2 – 8 ºC.
3. Воспроизводимость ИФА в процессе анализа в значительной степени зависит от последовательности промывки планшета, правильная промывка планшета имеет ключевое значение ИФА.

4. В процессе инкубации при постоянной температуре, во избежание воздействия света, закройте микропланшет покровной мембраной.

6.2 Порядок действий

1. Доведите тест-набор до комнатной температуры (20 – 25 ºС) в течение не менее 30 минут, обратите внимание, что перед использованием каждый реагент необходимо равномерно взболтать;
2. Поместите нужное количество микрострипов в рамку планшета. Неиспользованные стрипы храните в плотно закрытом пакете при температуре 2 – 8 °С, не замораживайте.
3. Приготовление раствора: возьмите 15 мл 20-кратно концентрированного промывочного буфера, разведите деионизированной водой в соотношении 1:19 (1 часть концентрированного моющего буфера + 19 частей деионизированной воды), или приготовьте необходимое количество.
4. Количество исследований: пронумеруйте микролунки в соответствии с образцами и стандартным раствором; каждый образец и стандарт должны быть выполнены в двух экземплярах; запишите их положение.
5. Добавление стандарта/образца: Добавьте 50 мкл образца или стандартного раствора в отдельные дублирующие лунки, затем добавьте ферментный конъюгат, 50 мкл/лунку; затем раствор антител, 50 мкл/лунку. Осторожно перемешайте, встряхивая планшет вручную, закройте микропланшет покровной мембраной, **инкубируйте при 25 °С в течение 30 мин в темноте**.
6. Промывка микропланшета: Осторожно откройте покровную мембрану, вылейте жидкость из микропланшета; добавьте 250 мкл/лунку моющего буфера, полностью промойте по 15 – 30 секунд 4 – 5 раз. Просушите с помощью впитывающей бумаги (оставшиеся пузырьки воздуха можно удалить с помощью неиспользованного наконечника).
7. Окрашивание: добавьте 50 мкл субстрата А, затем 50 мкл субстрата В в каждую лунку. Осторожно перемешайте, встряхивая планшет вручную, и **инкубируйте при 25 °С в течение 15 мин в темноте.**
8. Измерение: добавьте 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку. Осторожно перемешайте, встряхивая планшет вручную. Оптическую плотность измеряют в каждой лунке на микропланшетном ридере при длине волны 450 нм (Рекомендуется измерять оптическую плотность с помощью двухволнового прибора с длиной волны 450/630 нм в течение 5 минут).

7 Результаты

Существует два метода оценки результатов; первый – грубая оценка, второй – количественное определение. Обратите внимание, что оптическая плотность образца обратно пропорциональна концентрации никарбазина в образце.

7.1 Количественное определение

Диапазон концентрации (ppb) может быть получен путем сравнения среднего значения оптической плотности со стандартами. Предположим, что оптическая плотность первой пробы составляет 0,3, второй пробы – 1,0, а стандарты составляют: 0ppb – 2,243; 0,1ppb – 1,816; 0,3ppb – 1,415; 0,9ppb – 0,74; 2,7ppb – 0,313; 8,1ppb – 0,155. Тогда концентрация образца один находится в диапазоне

2,7 ppb ~ 8,1 ppb; образца два – 0,3 ppb ~ 0,9 ppb. Для расчета диапазона концентрации никарбазина в образцах необходимо полученный результат умножить на соответствующий коэффициент разведения образца.

7.2 Количественное определение

Чтобы рассчитать концентрацию образцов, необходимо построить стандартную кривую. Перед построением стандартной кривой необходимо вычислить значение оптической плотности в процентах.

Расчет оптической плотности в процентах:

$$\text{процент связывания} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

B— оптическая плотность стандарта (или пробы)

B_0— оптическая плотность раствора стандарта (0 нг/мл)

Таким образом, нулевой стандарт равен 100 %, а значение оптической плотности приводится в процентах. Значения, рассчитанные для стандартов, вносятся в систему координат на полулогарифмической графической бумаге относительно концентрации никарбазина [нг/л]. Концентрация никарбазина в нг/л (ppb), соответствующая оптической плотности каждого образца, может быть считана по калибровочной кривой.

Для оценки результатов ИФА для точного и быстрого анализа разработано специальное программное обеспечение, которое может быть предоставлено по запросу.

8 Меры предосторожности

1. Средние значения оптической плотности стандартов и проб уменьшаются при несоответствии температуры реагентов и проб комнатной температуре (20 – 25°C).
2. Не допускается высыхание лунок планшета между отдельными этапами анализа, следующий этап анализа необходимо проводить сразу после завершения осушения лунок.
3. Равномерно перемешайте перед добавлением реагентов.
4. При обращении со стоп-реагентом требуется осторожность, стоп-реагент содержит серную кислоту.
5. Не допускается использование реагентов по истечении срока годности. Замена отдельных реагентов на реагенты из наборов других партий не допускается, так как это приведет к изменению чувствительности и значений оптической плотности.
6. Условия хранения:

   Тест-набор следует хранить в холодильнике при температуре от +2 до +8 °C. Не допускается замораживание реагентов. Неиспользованные стрипы (лунки) следует хранить в холодильнике при температуре от +2 до +8 °C в плотно закрытом оригинальном фольгированном пакете. Следует избегать попадания прямых солнечных лучей на градуировочные растворы и раствор хромогена, т.к. они являются светочувствительными.
7. Признаки распада реагентов:

– окраска раствора субстрата до внесения его в лунки;
– оптическая плотность меньше 0,5 для стандарта с концентрацией 0 мкг/л.

8. Оптимальная температура проведения реакции 20 – 25°С. Более высокая либо более низкая температура может повлиять на чувствительность и изменение оптической плотности.

9 Условия и срок хранения

Условия хранения: 2 – 8 °С, не замораживать.

Срок хранения: 12 месяцев, срок изготовления указан на упаковке.

Примечание: Если вакуумная упаковка микропланшета негерметична, она все еще пригодна для использования, не влияет на результат теста.

КомПродСервис

НеоТест

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