



RIDASCREEN® FAST Охратоксин А 30/15

Арт. No. R1312

Иммуноферментный анализ для количественного
определения охратоксина А

Анализ *in vitro*

Хранить при 2-8°C

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



RIDA® и RIDASCREEN®

являются зарегистрированными торговыми марками R-Biopharm AG.

Производитель: R-Biopharm AG, Дармштадт, Германия

R-Biopharm AG имеет сертификат ISO 9001.

RIDA® and RIDASCREEN®

are registered trademarks of R-Biopharm AG

Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

RIDASCREEN® Охратоксин А 30/15

Описание

RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 (Кат. №: R1312) представляет собой набор для количественного определения охратоксина А в кукурузе, пшенице, ячмене, ржи, овсе, рисе кормах, кофе, детском питании, специях, вине, тканях, кислом солоде методом конкурентного иммуноферментного анализа.

Все необходимые для иммуноферментного анализа реагенты, включая стандарты, входят в комплектацию набора. Набор предназначен для 96 измерений (включая стандарты).

Для количественного анализа требуется микропланшетный ИФА-анализатор (ридер).



Пробоподготовка:	Экстракция, центрифугирование и разбавление
Время выполнения:	Подготовка проб (10 проб): Кукуруза, пшеница, ячмень, рожь, рис.....ок. 20 мин Корма.....ок. 20 мин Проведение теста (время инкубации).....45 мин
Предел обнаружения: (соответствует стандартному веществу)	Кукуруза.....0,5 мкг/кг Пшеница.....0,5 мкг/кг Ячмень.....0,4 мкг/кг Рожь.....1,2 мкг/кг Рис.....0,8 мкг/кг Овсяные хлопья и овсяные отруби.....0,7 мкг/кг Овсяная крупа.....0,7 мкг/кг Овес кормовой (с шелухой).....2,2 мкг/кг Корма.....1,6 мкг/кг Детское питание.....0,03 мкг/кг Специи (паприка, чили, перец).....0,3 мкг/кг Ткани (печень, почки).....0,9 мкг/кг Сухофрукты (инжир, финики, изюм).....1,6 мкг/кг Красное вино.....0,44 мкг/л Белое вино.....0,26 мкг/л Зелёный кофе.....0,19 мкг/кг Жареный кофе.....0,3 мкг/кг Сваренный кофе.....0,03 мкг/кг Кислый солод.....0,6 мкг/кг
Предел количественного определения: (определен не для всех матриц)	Овсяные хлопья и овсяные отруби.....2 мкг/кг Овсяная крупа.....5 мкг/кг Овес кормовой (с шелухой).....5 мкг/кг Сухофрукты (инжир, финики, изюм).....5 мкг/кг Красное вино.....0,5 мкг/л Белое вино.....0,3 мкг/л Зеленый кофе.....0,6 мкг/кг Жаренный кофе.....1,0 мкг/кг

Полнота извлечения (образцы Trilogy, контаминированные естественным способом):*	Кукуруза.....	90-130%
	Пшеница.....	90-140%
	Корма.....	50-100%
Полнота извлечения (образцы, контаминированные спайком):*	Ячмень (FAPAS)	80 - 100 %
	Рожь.....	100 - 130%
	Рис	75 - 130%
	Корма	60 - 100%
Специфичность:**	Охратоксин А.....	ок. 100%
	Охратоксин С.....	ок. 37%
	Охратоксин В.....	ок. 2%
	Охратоксин α.....	ок. 9%
	Охратоксин β.....	< 0,02%
	Дезоксиниваленол.....	<0,02%
	Зеараленон.....	<0,02%
	Афлатоксин В1.....	< 0,02%
Фумонизин В1.....	<0,02%	

* Примечание. Анализ был скорректирован с использованием образцов, загрязненных естественным путем. Возможны отклонения в восстановлении образцов с добавкой.

** Специфичность теста RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 определялась путем анализа перекрестной реактивности с соответствующими микотоксинами в буферной системе. В образцах специфичность может отличаться от тех, что определены в буферной системе из-за матричных эффектов. Перед анализом перекрестно-реактивных веществ пользователь должен определить предел обнаружения и извлечение вещества в соответствующей матрице образца. Тест не позволяет отличить аналиты от перекрестно-реактивных веществ.

Для повышения качества оценки при выполнении процедур ИФА мы дополнительно ссылаемся на Руководство по надлежащей практике ИФА (GEP) в соответствующей версии. В них перечислены минимальные стандарты, касающиеся базовых условий при использовании тест-наборов R-Biopharm AG и проведении ИФА-анализа. Руководство можно найти, распечатать и загрузить с веб-сайта официального дистрибьютора:

ООО «Неотест», РФ	https://neo-test.ru/wp-content/uploads/2021/10/prakticheskoe-rukovodstvo-ifa-rus.pdf	
ОДО «КомПродСервис», РБ	https://komprod.com/wp-content/uploads/2021/10/prakticheskoe-rukovodstvo-ifa-rus.pdf	

1. Применение

Тест RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 – конкурентный иммуноферментный анализ для количественного определения охратоксина А в кукурузе, пшенице, ячмене, ржи, овсе, рисе кормах, кофе, детском питании, специях, вине, тканях, кислом солоде.

2. Общая информация

Микотоксин охратоксин А вырабатывается плесневыми грибами рода *Aspergillus* и *Penicillium*. Наряду с выраженной нефротоксичностью, охратоксин А обладает гепатотоксичными, тератогенными, канцерогенными и иммуносупрессивными свойствами.

Охратоксин может поступать в организм человека не только с растительными продуктами, но и с продуктами животного происхождения. Охратоксин А был обнаружен в свиной крови, почках, а также в крови человека и материнском молоке.

3. Принцип метода

В основе теста – реакция взаимодействия антигенов с антителами. Лунки стрипов микротитровального планшета покрыты специфическими антителами против Охратоксина А. В лунки вносят стандарты и растворы исследуемых образцов, а также ферментный конъюгат. Свободный охратоксин А и конъюгированный с ферментом охратоксин А конкурируют за центры связывания антител охратоксина А (конкурентный иммуноферментный анализ). Не связавшийся ферментный конъюгат затем удаляется в процессе промывки. Далее в лунки планшета добавляется субстрат/хромоген. Связавшийся ферментный конъюгат преобразует хромоген в конечный продукт голубого цвета. Добавление стоп-раствора приводит к изменению цвета с голубого на жёлтый. Измерение проводится фотометрически при 450 нм. Оптическая плотность раствора обратно пропорциональна концентрации охратоксина А в образце.

4. Предоставляемые реагенты

Реагенты одного комплекта рассчитаны на проведение 96 измерений (включая анализы стандартных растворов). Каждая тест-система содержит:

Компонент	Цвет крышки	Формат		Объём
Микротитровальный планшет	-	Готов к использованию		96 лунок
ЭКО Экстрактор	Прозрачный	Концентрат	10x	2x120 мл
Стандарт 1	Белый	Готов к использованию	0 мкг/л	1,3 мл
Стандарт 2	Белый	Готов к использованию	0,03 мкг/л	1,3 мл

Стандарт 3	Белый	Готов к использованию	0,1 мкг/л	1,3 мл
Стандарт 4	Белый	Готов к использованию	0,3 мкг/л	1,3 мл
Стандарт 5	Белый	Готов к использованию	1 мкг/л	1,3 мл
Стандарт 6	Белый	Готов к использованию	3 мкг/л	1,3 мл
Промывочный буфер с Tween 20		Соль для растворения		
Конъюгат	Красный	Готов к использованию		6 мл
Субстрат/Хромоген Red Chromogen Pro	Коричневый	Готов к использованию		13 мл
Стоп-раствор	Жёлтый	Готов к использованию		14 мл

5. Необходимые, но не предоставленные материалы

5.1 Оборудование:

- ИФА-анализатор (ридер) с фильтром на 450 нм;
- центрифуга (>3500 g);
- роторный испаритель или другое оборудование для испарения экстрактов;
- лабораторный шейкер;
- вортекс;
- магнитная мешалка;
- пастеровские пипетки;
- градуированные цилиндры;
- микропипетки на 50 - 100 мкл и 1000 мкл;
- RIDA® Ochratoxin A column (Art. No. R1303);
- блендер (для сухофруктов);
- водяная баня или испаритель;
- 50 мл полипропиленовые пробирки.

5.2 Реагенты

- дистиллированная или деионизированная вода;
- 1 М NaOH (для работы с солодом);
- метанол;
- RIDA® Ochratoxin A column (Art. No. R1303) (для работы с детским питанием);
- Фосфатно-солевой буфер, pH 7.2-7.4 (г/л): 0,55 г NaH₂PO₄ x H₂O, 2.85 г Na₂HPO₄ x 2 H₂O и 9 г NaCl.

6. Меры предосторожности для пользователей

Тест должен проводиться только обученными сотрудниками лаборатории. Инструкцию по применению необходимо строго соблюдать.

В стандартных растворах содержится охратоксин А, при работе с ним необходимо соблюдать особые меры предосторожности. Избегайте контакта реагентов с кожей (используйте перчатки).

Деконтаминацию стеклянной посуды и растворов, содержащих токсины лучше всего проводить, используя 10 % (v/v) раствор гипохлорита натрия. Соляной кислотой доведите рН раствора гипохлорита до 7, погрузите в раствор загрязненную посуду и оставьте на ночь.

Набор может содержать опасные вещества. Информацию об опасности содержащихся в нем веществ см. В соответствующих паспортах безопасности (SDS) этого продукта, доступных на сайте www.r-biopharm.com.

Обеспечьте надлежащую и ответственную утилизацию всех реагентов и материалов после их использования. При утилизации соблюдайте национальные правила.

7. Инструкции по хранению

Храните набор при температуре 2 - 8° С. Не замораживайте реагенты из комплекта набора.

Неиспользованные микролунки поместите в оригинальную упаковку из фольги и плотно закройте её вместе с прилагающимся осушителем. Храните при температуре 2 - 8° С.

Охратоксин А светочувствителен, поэтому избегайте попадания прямого света на растворы охратоксина А.

Раствор субстрата/хромогена светочувствителен, поэтому избегайте попадания на него прямого света.

По истечении срока годности, указанного на этикетке, гарантия качества аннулируется.

Не заменяйте реагенты в составе одного комплекта реагентами из другого комплекта с другим номером партии.

8. Признаки непригодности реагентов

- Окрашивание красноватого раствора субстрата/хромогена в голубой цвет ещё до проведения тестирования

- Значение оптической плотности в лунке с нулевым стандартом ниже 0,8 ($A_{450 \text{ нм}} < 0,8$)

9. Подготовка образцов

Пробы должны храниться в прохладном месте, защищенном от попадания прямого света.

9.1. Буфер для экстракции

Для экстракции необходим разбавленный Eсо Extractor. Чтобы получить готовый к использованию экстрактор ECO, разбавьте экстракты Eсо (10х концентрат) 1:10 дистиллированной или деионизированной водой. Разбавленный Eсо Extractor стабилен в течение одной недели при 2-8° С. Если в разбавленных экстрактах Eсо появляется помутнение (возможно, из-за загрязнения), не используйте его.

9.2. Экстракт из кукурузы, пшеницы, ячменя, риса и кормов

Перед использованием доведите все реагенты и образцы до комнатной температуры (20–25 ° С) и проведите подготовку образцов при комнатной температуре.

Репрезентативный образец (в соответствии с принятыми методами отбора образцов) следует измельчить и тщательно перемешать перед тем, как приступить к процедуре экстракции (рекомендуемый размер частиц: 500 мкм).

- Взвесьте 10 г измельченной и гомогенизированной пробы в подходящий контейнер (например, 125 мл флакон) и добавьте 50 мл разбавленного экстрактора Eсо.

- Кратковременно перемешайте образец (10 секунд).

- Энергично встряхивайте образец в течение 5 минут (вручную или с помощью шейкера при 420 об / мин).

- Центрифуга 5 мин при комнатной температуре и 3.500 g (20-25° С).

- Разбавьте 1 мл супернатанта 1 мл готового к использованию промывочного буфера (буфер для образцов, см. 10.1.).

- Используйте 50 мкл разбавленного супернатанта в анализе.

Примечание: образцы кукурузы, пшеницы, риса и корма, измеренные за пределами диапазона измерений > 30 мкг/кг (частей на миллиард), следует дополнительно разбавить 1:10 готовым к использованию промывочным буфером (см. 10.1.).

9.3. Экстракция из ржи

- Взвесьте 5 г измельченной и гомогенизированной пробы в подходящий контейнер (например, 125 мл флакон) и добавьте 50 мл разбавленного экстрактора Eсо.

- Кратковременно перемешайте образец (10 секунд).

- Энергично встряхивайте образец в течение 5 минут (вручную или с помощью шейкера при 420 об / мин).

- Центрифуга 5 мин при комнатной температуре и 3500 g (20-25 °С).

- Разбавьте 1 мл супернатанта 1 мл готового к использованию промывочного буфера (буфер для образцов, см. 10.1.).

- Используйте 50 мкл разбавленного супернатанта в анализе.

Примечание. Образцы ржи, измеренные вне диапазона измерений > 60 мкг/кг (частей на миллиард), следует дополнительно разбавить 1:10 готовым к использованию промывочным буфером (см. 10.1.).

9.4. Экстракция из вина

- Отберите 5 мл образца во флакон из полипропилена на 50 мл и добавьте 20 мл разбавленного экстрактора Есо (см. 9.1 инструкции по эксплуатации арт. № R1312).

- Перемешайте образец на вортексе (10 секунд).

- Энергично встряхивайте образец в течение 5 минут с помощью (горизонтального) встряхивателя при 420 об/мин.

- Центрифугируйте образец в течение 5 минут при 3,500 g и комнатной температуре (20–25 ° C).

- Разбавьте 1 мл супернатанта 1 мл готового к использованию промывочного буфера (см. 10.1 инструкции по эксплуатации, арт. № R1312).

- Используйте 50 мкл разбавленного супернатанта в анализе.

9.5 Пробоподготовка образцов кофе с использованием иммуноаффинной колонки

Реагенты, оборудование и расходные материалы, необходимые дополнительно

- иммуноаффинная колонка RIDA® Ochratoxin A column (Art. No. R1303)

- метанол

- 50 мл полипропиленовые флаконы

- испаритель.

Иммуноаффинные колонки не должны высыхать во время использования.

- Взвесьте 2 г образца во флаконе из полипропилена на 50 мл и добавьте 40 мл разбавленного экстрактора ЕСО (см. 9.1 инструкции по эксплуатации арт. № R1312).

- Кратковременно перемешайте образец на вортексе (10 секунд).

- Энергично встряхивайте образец в течение 5 минут с помощью горизонтального встряхивателя при 420 об/мин.

- Центрифугируйте образец в течение 10 минут при 3000 g и комнатной температуре (20–25 ° C).

- Разбавьте 5 мл супернатанта 5 мл приготовленного промывочного буфера (см. п. 10.1 инструкции).

- Заполните иммуноаффинную колонку RIDA®Ochratoxin A (арт. № R1303) 5 мл разбавленного экстракта (= 0,125 г образца), дайте экстракту пройти через колонку под действием силы тяжести.

- Дважды промойте колонку 5 мл промывочного буфера, удалите остатки буфера, пропуская через колонку воздух.

- Элюируйте микотоксин 1 мл 100% метанола; примечание: рекомендуется обратная промывка колонки метанолом.

- Выпарить элюат досуха при 65 °С.

- Растворите высушенный остаток в смеси экстрактора ЕСО 1,25 мл и промывочного буфера (соотношение: 1:1; например, 1 мл разбавленного экстрактора ЕСО + 1 мл готового к использованию промывочного буфера).

- Используйте 50 мкл разбавленного образца в анализе.

9.6. Экстракция из тканей животных (печень, почки) (0,9 – 90 мкг/кг)

Вследствие возможного неспецифического связывания определенных ингредиентов со специфическими антителами, могут возникать фоновые или ложноположительные результаты. Поэтому мы рекомендуем тестировать метод в эксперименте с холостыми пробами и искусственно контаминированными образцами.

В первую очередь убедитесь, что образец однороден. В противном случае степень извлечения может различаться.

- Взвесьте 1 г измельченного и гомогенизированного образца в 15 мл центрифужной полипропиленовой пробирке.

- Добавьте 10 мл разбавленного (готового к использованию) ЭКО-экстрактора.

- Перемешайте образец в течение 10 секунд.

- Энергично встряхивайте образец в течение 5 мин (вручную или с помощью встряхивателя).

- Центрифугируйте образец в течение 10 мин при 4000 g и комнатной температуре (20 – 25 °С).

- Если супернатант все еще мутный, перенесите 1 мл супернатанта в небольшую центрифужную пробирку и центрифугируйте в течение 5 мин на высокой скорости ($\geq 10\ 000\ g$).

- Перенесите 0,5 мл супернатанта в новую пробирку и добавьте 0,25 мл разбавленного ЭКО-экстрактора.

- К полученному раствору добавьте 0,75 мл готового к использованию промывочного буфера (разбавление 1:2).

- Используйте 50 мкл разбавленного супернатанта в анализе.

9.8. Экстракция из сухофруктов (инжир, финики, изюм и пр.).

- Разрежьте образец на мелкие кусочки (например, ножом).
- Взвесьте 10 г подготовленного образца в чаше блендера.
- Добавьте 100 мл готового к использованию ЕСО Экстрактора.
- Экстрагируйте путем смешивания на высокой скорости в течение 2 минут.
- Оставьте на 1 - 5 минут для отстаивания.
- Перенесите супернатант в 50 мл пробирку и центрифугируйте (5 минут при ≥ 2000 g).

- Разбавьте 1 мл супернатанта 1 мл готового к использованию промывочного буфера (PBS-Tween) (1:2).

- Используйте 50 мкл разбавленного супернатанта на лунку в анализе.

9.9. Экстракция из солода (0,6-60 мкг/кг)

Вследствие возможного неспецифического связывания определенных ингредиентов со специфическими антителами, могут возникать фоновые или ложноположительные результаты. Поэтому мы рекомендуем тестировать метод в эксперименте с холостыми пробами и искусственно загрязненными образцами.

В первую очередь убедитесь, что образец однороден. В противном случае степень извлечения может различаться.

- Взвесьте 5 г измельченного и гомогенизированного образца в подходящем контейнере (например, в бутылке объемом 125 мл) и добавьте 50 мл разбавленного ЭКО-экстрагента.

- Быстро взболтайте образец (10 секунд).

- Энергично встряхивайте образец в течение 5 минут (вручную или с помощью шейкера).

- Проверьте pH и при необходимости отрегулируйте его до 8,0 с помощью 1 M NaOH.

- Центрифугируйте в течение 5 минут при 3500 g и комнатной температуре (20 – 25 °C).

- Разбавьте 1 мл супернатанта 1 мл готового к использованию промывочного буфера (разбавление 1:2).

- Используйте 50 мкл разбавленного супернатанта на лунку в анализе.

Примечание: Образцы, содержащие охратоксин выше диапазона измерения > 60 мкг/кг (ppb), должны быть дополнительно разбавлены 1:10 с помощью готового к использованию промывочного буфера.

9.10. Экстракция из детского питания (0,03-3 мкг/кг)

Для уменьшения влияния матрицы и повышения чувствительности теста в процессе подготовки пробы рекомендуется использовать колонку RIDA® Ochratoxin A (арт. R1303).

В первую очередь убедитесь, что образец однороден. В противном случае степень извлечения может различаться.

- Репрезентативный образец (в соответствии с принятыми методами отбора проб) должен быть тщательно измельчен перед началом процедуры экстракции (рекомендуемый размер частиц: 500 мкм).

- Взвесьте 4 г образца (измельченного) в центрифужной пробирке объемом 50 мл и добавьте 40 мл готового к использованию ЭКО-экстрактора*.

- Коротко взболтайте образец (10 секунд).

- Энергично встряхивайте образец в течение 5 минут на горизонтальном шейкере при 420 об/мин.

- Центрифугируйте в течение 5 минут при 3500 g и комнатной температуре (20 - 25 °C).

- Перенесите 5 мл экстракта (соответствующего 0,5 г образца) в новую пробирку, добавьте 5 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и перемешайте.

Очистка:

- Нанесите все 10 мл разбавленного экстракта образца на иммуноаффинную колонку RIDA® Ochratoxin A и дайте ему пройти через колонку без давления.

- Промойте колонку 10 мл раствором ФСБ/метанол (90/10).

- Удалите остатки буфера, продавив воздух через колонку.

- Элюируйте охратоксин 1 мл 100 % метанола. Рекомендуется обратная промывка.

- Выпарите элюат досуха при 65 °C.

- Восстановите сухой остаток в 0,25 мл готового к использованию экстрактора ЕСО.

- Добавьте 0,25 мл готового к использованию промывочного буфера и перемешайте на вортексе.

- Добавьте 50 мкл разбавленного образца в каждую лунку анализа.

* Количество образца может быть изменено. В этом случае необходимо отрегулировать объем готового к использованию ЭКО-экстрактора, то есть: соотношение экстракции образца и готового к использованию ЭКО-экстрактора должно оставаться постоянным 1:10.

9.11. Экстракция из сваренного кофе

Чтобы уменьшить интерференцию матрицы, для подготовки проб следует использовать колонку RIDA® Ochratoxin A. Доведите все реагенты и образцы до комнатной температуры (20–25 °C/68–77 °F) перед использованием и выполняйте подготовку образцов при комнатной температуре. Иммуноаффинные колонки не должны высыхать во время использования.

Обратите внимание: с помощью рекомендуемой процедуры измеряется только концентрация охратоксина А в жидкости (вареный кофе). Чтобы

определить загрязнение охратоксином А в кофейном порошке, измеренная концентрация должна быть окончательно соотнесена с количеством использованного кофейного порошка/зерен. Этот этап расчета не рассматривается в рекомендации.

- Охладите прокипяченный образец до комнатной температуры (20–25 °C/68–77 °F).

- Центрифугируйте: 10 мин/3000 г

- Удалите и выбросьте верхний слой жира с помощью пипетки Пастера.

- Если есть плавающие частицы, отфильтруйте надосадочную жидкость через складчатый бумажный фильтр.

- Перенесите 5 мл фильтрата/супернатанта в новую пробирку и добавьте 5 мл готового к использованию промывочного буфера Tween. (см. инструкцию по применению, глава 10.1; арт. № R1312)

- Смешайте или перемешайте

Очистка:

- Заполните иммуноаффинную колонку RIDA® Ochratoxin A 5 мл разведенного образца и пропустите ее без давления.

- Дважды промойте колонку 5 мл промывочного буфера и удалите остатки буфера сжатием воздуха.

- Поместите чистую пробирку непосредственно под колонку и элюируйте микотоксин 1 мл метанола (100 %);

рекомендуется обратная промывка

- Пропустите немного воздуха через колонку или примените легкий вакуум, чтобы убедиться, что элюент полностью собран.

- Выпаривайте элюат досуха при 65 °C в токе воздуха или азота.

- Восстановите сухой остаток с помощью 2,5 мл готового к использованию ESO Extractor/промывочного буфера (50/50 по объему).

- Используйте 50 мкл разведенного образца на лунку в анализе.

9.12. Экстракция из специй (паприка, чили, перец)

Чтобы уменьшить влияние матрицы, мы рекомендуем использовать колонку RIDA® с охратоксином А (арт. № R1303) для подготовки проб.

Необходимые материалы:

- Колонка RIDA® с охратоксином А (R1303)

- PBS pH 7,2–7,4 (г/л):

0,55 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 2,85 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ и 9 г NaCl

- 0,01% Tween 20 в PBS (на 1 л): удалите 100 мкл PBS в отходы и добавьте 100 мкл Tween 20. Хорошо перемешайте. Раствор можно хранить до 5 дней при температуре 2–8 °C.

- Метанол, ч.д.а.

- Складной бумажный фильтр
- Водяная баня или испаритель

Процедура подготовки:

Убедитесь, что образец однородный. В противном случае восстановление может отличаться.

- Взвесьте 1 г образца в центрифужной пробирке на 50 мл и добавьте 20 мл готового к использованию экстрактора ЕСО.
- Кратковременно перемешайте/встряхните (около 10 секунд).
- Энергично встряхивайте образец в течение 10 минут (вручную или с помощью шейкера).
- Центрифугировать в течение 10 мин при 4000 g при комнатной температуре (20–25 °C).
- Удалите жировой слой пипеткой Пастера.
- Если есть плавающие частицы, отфильтруйте надосадочную жидкость через складчатый бумажный фильтр.
- Перенесите 5 мл фильтрата в новую пробирку и добавьте 5 мл буфера PBS.
- Смешайте или перемешайте

Очистка:

- Медленно непрерывно пропускайте через колонку 5 мл разбавленного экстракта (соответствует примерно 0,125 г пробы).
- Промойте колонку 10 мл 0,01% Tween 20 в PBS и удалите пропущенный раствор.
- Убедитесь, что вся жидкость удалена путем подачи воздуха или азота через колонку.
- Поместите чистую пробирку непосредственно под колонку и элюируйте 1 мл метанола (100%) (обратная промывка рекомендуемые)
- Пропустите немного воздуха через колонку или примените легкий вакуум, чтобы убедиться, что элюент собран.
полностью
- Выпаривать элюат досуха при 65 °C в токе воздуха или азота.
- Восстановите сухой остаток с помощью 1,25 мл готового к использованию экстрактора/промывочного буфера ЕСО (50/50 по объему).
- Используйте 50 мкл разведенного образца на лунку в анализе.

9.13. Экстракция из овсяных хлопьев, овсяных отрубей, овсяной крупы, овса кормового (с шелухой)

Выборка должна быть репрезентативной (в соответствии с принятыми методами выборки).

Убедитесь, что образец однородный. В противном случае степень извлечения будет отличаться.

Образцы следует хранить в прохладном, защищенном от света месте.

Доведите все реагенты и образцы до комнатной температуры (20–25 °C/68–77 °F) перед использованием и выполняйте подготовку образцов при комнатной температуре.

Процедура:

- Мелко измельчите образец
- Взвесьте 5 г измельченного и гомогенизированного образца в подходящую ёмкость (например, пробирка из полиэтилена высокой плотности на 125 мл).
- Добавьте 50 мл разбавленного экстрактора ЕСО.
- Встряхивайте образец 10 с.
- Энергично встряхивайте образец в течение 5 минут (вручную или с помощью шейкера при 420 об/мин).
- Центрифугируйте: 5 мин/3500 г
- Разбавьте 1 мл супернатанта 1 мл готового к использованию промывочного буфера.
- Добавьте 50 мкл разбавленного супернатанта на лунку анализа.
- Для оценки результатов необходимо настроить коэффициент разбавления в программе RIDASOFT® Win.NET (Арт. № Z9996) до 20.

Примечание. Образцы овса, измеренные за пределами диапазона измерения > 60 мкг/кг, должны быть дополнительно разбавлены 1:10 готовой к использованию буферной смесью ЕСО Extractor-wash (50:50 по объему).

10. Проведение теста

10.1 Предварительные указания

1. Перед использованием доведите все реагенты до комнатной температуры (20–25 °C) и проведите тест при комнатной температуре.

2. Сразу после использования верните все реагенты к хранению при 2 – 8°C.

Для приготовления моющего буфера (фосфатно-солевой буфер с твином) растворите содержимое прилагаемого пакетика буферной соли (см. п. 4) в 1 л дистиллированной воды. Готовый моющий буфер может храниться при 2 - 8° С в течение 4-6 недель.

Альтернатива: растворите содержимое пакетика в 100 мл дистиллированной воды (10-ти кратный концентрат). Раствор может храниться около 8-12 недель при комнатной температуре (20 - 25°C). Для приготовления готового к работе моющего буфера растворите одну часть 10-ти кратного концентрата в 9 частях дистиллированной воды.

10.2 Процедура анализа

Внимательно следуйте рекомендованной процедуре промывки. В процессе выполнения анализа не допускайте высыхания микролунок.

1. Вставьте в рамку планшета микролунок в количестве, достаточном для анализа всех стандартных и исследуемых растворов в двух повторностях. Запишите схему расположения лунок со стандартами и исследуемыми растворами на планшете.

2. Внесите в лунки по 50 мкл стандартов и исследуемых растворов для тестирования в дублях. Для каждого стандарта или пробы используйте новый наконечник для пипеток.

3. Добавьте в каждую лунку по 50 мкл конъюгата. Перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию при комнатной температуре (20 - 25°C) в течение 30 мин в темноте.



4. Вылейте жидкость из лунок, переверните рамку планшета и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Заполните все лунки по 250 мкл моющего буфера (см. п. 10.1). Повторите процедуру отмывки лунок ещё два раза.

5. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл раствора субстрата/хромогена. Перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию при комнатной температуре (20 - 25 °C) в течение 15 минут (+/- 1 мин) в темноте.

6. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора. Перемешайте, осторожно вращая планшет рукой. Измерьте оптическую плотность при 450 нм в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

11. Результаты

Для обработки результатов иммуноферментного анализа имеется специальное программное обеспечение RIDA® SOFT Win (Артикул № Z9999). Метод расчёт – кубический сплайн. Программное обеспечение RIDA® SOFT Win и инструкцию к нему Вы можете бесплатно скачать на сайте официальных дистрибьюторов:

ООО «Неотест», Россия	https://neo-test.ru/programmnoe-obespechenie/	
ОДО «КомПродСервис», Беларусь	https://komprod.com/programmnoe-obespechenie/	

Пример калибровочной кривой дан в сертификате на тест-систему.

Для того чтобы вычислить концентрацию охратоксина А в мкг/кг (ppb) в пробе, величину концентрации охратоксина А, полученную по калибровочной кривой, следует умножить на соответствующий фактор разбавления. При выполнении анализа в соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения:

Матрица	Фактор разбавления
Кукуруза, пшеница, ячмень, рис, корма	10
Рожь	ок. 20
Вино	10
Зелёный и жаренный кофе	10
Сваренный кофе	1
Сухофрукты	20
Детское питание	1
Солод	20
Ткани животных	30
Специи	10
Овсяные хлопья, отруби, крупа; овёс кормовой	20

Данные соответствуют нашему нынешнему состоянию технологий и предоставляют информацию о наших продуктах и их использовании. R-Biopharm не дает никаких гарантий, явных или подразумеваемых, за исключением того, что материалы, из которых изготовлены ее продукты, имеют стандартное качество. Дефектные продукты будут заменены. Нет никаких гарантий товарной пригодности этого продукта или пригодности продукта для каких-либо целей. R-Биофарм не несет ответственности за любой ущерб, в том числе фактический или косвенный ущерб, или расходы, возникшие прямо или косвенно от использования этого продукта.