



## **RIDASCREEN® Зеараленон**

**Арт. No. R1401**

Иммуноферментный анализ для количественного определения зеараленона

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](http://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](http://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® ДОН

## Описание

RIDASCREEN® Zearalenon (Кат. №R1401) представляет собой набор для количественного определения зеараленона в злаках, кормах, пиве, сыворотке, моче, мясе и молоке 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: зерновые и корма: экстракция, фильтрация и разбавление  
пиво: удаление CO<sub>2</sub> и разбавление  
сыворотка и моча: хроматографическая очистка RIDA® C18 (арт. №: R2002)

Время выполнения: Подготовка проб (10 проб):  
Злаки и корма.....ок. 20 мин  
пиво.....ок. 10 мин  
Сыворотка и моча.....ок. 3,5 ч  
Проведение теста (время инкубации).....2,5 ч

Предел обнаружения: (соответствует стандартному веществу) Пиво.....250 нг/кг  
сыворотка и моча.....50 нг/кг  
злаки и корма.....1750 нг/кг  
мясо.....275 нг/кг  
молоко.....ок. 60 нг/кг



Предел количественного определения: (соответствующий стандартному веществу) Пшеница, рожь, ячмень.....ок. 20 мкг/кг

Степень извлечения: (соответствующий стандартному веществу) Злаки и корма.....ок. 80%  
(коэффициент вариации 15%)

Специфичность: Зеараленон.....100%  
α-Зеараленол.....ок. 41,6%  
Зеранол (Zearalanol).....ок. 27,7%  
β-зеараленол.....ок. 13,8%

Специфичность теста RIDASCREEN® Zearalenone была установлена путем анализа перекрестной реактивности с соответствующими микотоксинами.

Для повышения качества оценки при выполнении процедур ИФА мы дополнительно ссылаемся на наше 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	<a href="https://neo-test.ru/wp-content/uploads/2021/10/prakticheskoe-rukovodstvo-ifa-rus.pdf">https://neo-test.ru/wp-content/uploads/2021/10/prakticheskoe-rukovodstvo-ifa-rus.pdf</a>	
ОДО «КомПродСервис», РБ	<a href="https://komprod.com/wp-content/uploads/2021/10/prakticheskoe-rukovodstvo-ifa-rus.pdf">https://komprod.com/wp-content/uploads/2021/10/prakticheskoe-rukovodstvo-ifa-rus.pdf</a>	

### 1. Применение

RIDASCREEN® Zearalenon представляет собой набор для количественного определения зеараленона в злаках, кормах, пиве, сыворотке и моче методом конкурентного иммуноферментного анализа.

### 2. Общая информация

Микотоксин зеараленон образуется грибами рода *Fusarium*. Зеараленон - это фитогормон, который помимо своих анаболических свойств проявляет эстрогенные эффекты. Из-за его эстрогенных свойств зеараленон может вызвать расстройства фертильности у животных. Зеараленон потенциально опасен для здоровья человека.

### 3. Принцип метода

В основе теста лежит реакция антиген-антитело. Микротитровальные лунки покрыты антителами, направленными против антител к зеараленону. Стандарты или образцы, конъюгат и анти-зеараленоновые антитела вносятся в лунки планшета. Свободный зеараленон и конъюгат конкурируют за сайты связывания анти-зеараленоновых антител (конкурентный иммуноферментный анализ). В то же время анти-зеараленоновые антитела связываются с иммобилизованным антителами захвата. Несвязанный конъюгат затем удаляется на этапе промывки. Субстрат/хромоген добавляют в лунки и инкубируют. Связанный конъюгат превращает хромоген в синий продукт. Добавление стоп-раствора приводит к изменению цвета с синего на желтый. Измерение проводят фотометрически при 450 нм. Уровень оптической плотности обратно пропорционален концентрации зеараленона в пробе.

#### 4. Предоставляемые реагенты

Каждый набор содержит достаточное количество материалов для 96 измерений (включая анализы стандартных растворов). Каждая тест-система содержит:

Компонент	Цвет крышки	Формат		Объём
Микротитровальный планшет	-	Готов к использованию		96 лунок
Стандарт 1		Готов к использованию	0 нг/кг	1,3 мл
Стандарт 2		Готов к использованию	50 нг/кг	1,3 мл
Стандарт 3		Готов к использованию	150 нг/кг	1,3 мл
Стандарт 4		Готов к использованию	450 нг/кг	1,3 мл
Стандарт 5		Готов к использованию	1350 нг/кг	1,3 мл
Стандарт 6		Готов к использованию	4050 нг/кг	1,3 мл
Конъюгат	Красный	Готов к использованию		0,7 мл
Субстрат	Зелёный	Готов к использованию		7 мл
Хромоген	Синий	Готов к использованию		7 мл
Стоп-реагент	Жёлтый	Готов к использованию		14 мл
Буфер 1	Белый	Готов к использованию		50 мл

#### 5. Необходимые, но не предоставленные материалы

##### 5.1. Оборудование:

- ИФА-анализатор (ридер), предназначенный для работы с микротитровальными планшетами или стрипами и оснащенный фильтром на 450 нм
  - измельчитель
  - шейкер
  - стеклянная посуда для приготовления экстракта образца: фильтровальная воронка и колба на 100 мл
  - фильтровальная бумага: ватман № 1 или эквивалент
  - центрифуга
  - роторный испаритель или другое оборудование для испарения растворителей
  - пастеровские пипетки
  - градуированные пипетки
  - микропипетки с переменным объемом 20 - 200 мкл и 200 - 1000 мкл

## 5.2. Реагенты:

- метанол

5.3. Дополнительно для приготовления образцов сыворотки/мочи/молока/мяса:

- Глюкуронидаза / арилсульфатаза *Helix pomatia* (Merck, арт. №: 4114)
- 50 мМ натрий-ацетатный буфер, pH 4,8
- 20 мМ Трис-буфер, pH 8,5 / метанол (80/20)
- RIDA® Колонка C18 (арт. №: R2002)
- дихлорметан (для мяса)
- изооктан (для мяса)

## 6. Меры предосторожности для пользователей

К проведению анализа допускается только специально обученный персонал. Необходимо строго соблюдать инструкцию по использованию набора.

Стандартные растворы содержат зеараленон, при работе 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 pH раствора гипохлорита до 7, погрузите в раствор загрязненную посуду и оставьте на ночь.

Стоп-раствор содержит в своем составе 1N серную кислоту (R36/38, S2-26).

Тест-набор содержит опасные вещества. Для получения информации о рисках, связанных с содержащимися в ней компонентами, обратитесь к соответствующим документам по безопасности компонентов (MSDS), доступным по ссылке [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 7. Инструкции по хранению

Храните комплект при температуре 2 - 8°C (35 - 46°F). Не замораживайте компоненты набора.

Неиспользованные микролунки поместите в оригинальную фольгированную упаковку и плотно закройте её вместе с прилагаемым осушителем. Храните при 2 - 8°C (35 - 46°F).

Афлатоксины светочувствительны, поэтому избегайте попадания прямого света на стандартные растворы или экстракты. 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 0,6 ( $A_{450 \text{ нм}} < 0,6$ )

## 9. Подготовка образцов

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

### 9.1. Зерновые и корма

Репрезентативный образец растирают и тщательно перемешивают в миксере.

- взвесить 5 г измельченного образца в подходящей емкости и добавить 25 мл смеси метанол/вода (70/30)\*;

- энергично встряхивать в течение трех минут (вручную или с помощью шейкера);

- центрифугировать экстракт: 10 мин / 3500 g / комнатная температура (20 – 25 °C) или фильтровать экстракт через фильтр Whatman № 1;

- разбавить супернатант или фильтрат 1:7 (1 + 6) буфером для разведения образца (буфер 1) (например, 100 мкл супернатанта или фильтрата + 600 мкл буфера 1)\*\* ;

- используйте в тесте 50 мкл разбавленного экстракта на лунку;

\* - размер пробы может быть увеличен при необходимости, но объем метанол / вода должен быть адаптирован, например, 10 г в 50 мл метанола / воды (70/30);

\*\* - разбавленные экстракты образцов пшеницы могут стать мутными. Поэтому рекомендуется центрифугировать разбавленный экстракт на высокой скорости (3 мин/ 20000 g/ комнатная температура (20 - 25 ° C)) и использовать 50 мкл очищенного супернатанта в тесте.

Примечание: метанольный экстракт (супернатант или фильтрат) можно хранить при температуре 2 - 8 ° C в течение 2 недель и при -20 ° C в течение 2 месяцев. Хранить экстракт хорошо запечатанным в стеклянном флаконе (коричневое стекло) в защищенном от света месте. Если ожидаются образцы с более высокими концентрациями зearаленона то необходимо разбавить раствор буфером для разведения образцов (буфер 1).

### 9.2. Пиво

- используйте достаточный объем пива, удалите CO<sub>2</sub> до прекращения образования пузырьков;

- разбавьте образец 1:5 (1 + 4) буфером для разведения образца (буфер 1) (например, 100 мкл образца + 400 мкл буфера 1);

- используйте 50 мкл раствора на лунку в анализе.

Замечание: в случае мутных образцов рекомендуется стерильная фильтрация перед использованием образца в анализе!

### 9.3. Сыворотка и моча

Подготовка проб только для мочи:

- разбавить 0,5 мл мочи 3 мл 50 мМ ацетатного буфера, pH 4,8;
- добавить 8 мкл глюкуронидазы / арилсульфатазы из Helix promatia;
- инкубировать раствор в течение 3 ч при 37 ° C;

3,5 мл гидролизованной мочи или 0,5 мл сыворотки (без дополнительной пробоподготовки) очищают путем колонки RIDA® C18 (арт. №: R2002):

- скорость потока 1 капля / сек;
- промыть колонку 3 мл метанола (100%);
- уравновесить колонку 2 мл 20 мМ Трис-буфера, pH 8,5/метанол (80/20; об/об) ;
- нанести 3,5 мл гидролизованной мочи или 0,5 мл образца сыворотки;
- промыть колонку 2 мл 20 мМ Трис-буфера, pH 8,5/метанол (80/20; об./об.);
- промыть колонку 3 мл метанола (40%);
- просушить колонку потоком воздуха или азота в течение 1 мин;
- медленно элюировать образец (скорость потока 15 капель в минуту) с 1 мл метанола (80%);
- выпаривать элюат досуха при температуре не выше 60 ° C (возможно, при слабом токе азота);
- повторно растворить сухой остаток в 50 мкл метанола, затем добавьте 450 мкл буфера для разведения образцов (буфер 1) и тщательно перемешайте;
- используйте 50 мкл раствора на лунку в тесте.

### 9.4. Молоко

- центрифугировать молоко: 15 мин / прим. 3000 g / центрифугирование при пониженной температуре (прим. 4°C) или охлаждение образца в холодильнике до центрифугирования;
- удалить верхний слой жира;
- добавить 20 мкл глюкуронидазы / арилсульфатазы из Helix promatia в 1 мл образца и инкубировать раствор 3 часа при 37°C;
- добавить 0,1 мл метанола к 0,9 мл гидролизованного и обезжиренного молока и использовать в тесте 50 мкл раствора на лунку.

Примечание. Стандарты должны быть приготовлены на обезжиренном молоке, содержащем 10% метанола. Готовят стандарты по следующей схеме:

- растворите 1 г сухого обезжиренного молока в 8 мл дистиллированной воды + 1 мл метанола (100%) при перемешивании;



- добавить 100 мкл стандартного раствора зеараленона (40,5 нг/мл) к 900 мкл смеси обезжиренного молока и метанола, что дает стандарт молока 6 (4050 ppt);

- возьмите 200 мкл стандарта молока 6 и разбавьте 400 мкл смеси обезжиренного молока и метанола, в результате чего получится стандарт молока 5 (1350 ppt);

- продолжайте разбавление стандарта молока 5 таким же образом, чтобы получить стандарт молока 4 (450 ppt), разбавьте стандарт 4 для получения стандарта 3 (150 ppt) и разбавьте стандарт 3 для получения стандарта 2 (50 ppt);

- чистая смесь обезжиренного молока и метанола используется в качестве стандарта молока 1 (0 ppt).

Смесь обезжиренного молока с метанолом и стандарты готовят каждый день!

Хранение образцов: экстракты образцов можно хранить при 2-8 ° С в течение 2 дней.

#### 9.5. Мясо

- хорошо измельчают репрезентативное количество образца;

- 2 г измельченного образца смешивают с 3 мл 50 мМ ацетатного буфера pH 4,8 и 8 мкл глюкуронидазы/арилсульфатазы *Helix pomatia*, раствор инкубируют при 37 °С в течение 3 часов;

- добавляют 7 мл метанола и перемешивают 20 мин;

- центрифугируют: прибл. 2,300 g / 15 мин / при комнатной температуре;

- 2 мл супернатанта разбавляют 2 мл дистиллированной воды;

- добавляют 3 мл дихлорметана и встряхивают 60 сек;

- центрифугируют: прибл. 2300 g / 15 мин / при комнатной температуре;

- верхний водный слой удаляют полностью, нижний слой дихлорметана высушивают полностью (при 60 ° С, предпочтительно в потоке азота) ;

- осадок растворяют в 2 мл буфера 1, смешивают с 1 мл изооктана и встряхивают 30 сек;

- центрифугируют: прибл. 2,300 g / 15 мин / при комнатной температуре;

- полностью удаляют верхний слой;

- отбирают 450 мкл буферного (нижнего) слоя и добавляют 50 мкл метанола, используйте 50 мкл полученного раствора на лунку в тесте.

Примечание. Хранение образцов: высушенный остаток, полученный на этапе выпаривания, можно хранить в замороженном виде до одного месяца. Готовый экстракт можно хранить при 2-8 °С в течение 2 дней.

## **10. Проведение теста**

### **10.1. Предварительные указания**

Перед использованием доведите все реагенты до комнатной температуры (20 – 25° С).

Ферментный конъюгат зеараленона (флакон с красной крышкой) предоставляется в виде концентрата. Поскольку разведенный ферментный конъюгат имеет ограниченную стабильность, только объем, который необходим, должен быть восстановлен. Перед использованием, конъюгат следует тщательно встряхивать. Для восстановления, концентрат разбавляют 1:11 (1 + 10) в буфере 1 (флакон с белой крышкой, например, 200 мкл концентрата + 2,0 мл буфера, достаточно для 4 стрипов).

### **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 тестирования всех стандартных растворов и проб в двух повторностях. Запишите схему расположения лунок со стандартными растворами и пробами на планшете.

2. Добавьте 50 мкл стандартных и исследуемых растворов в соответствующие парные лунки.

3. Добавьте в лунки по 50 мкл раствора ферментного конъюгата, осторожно перемешайте, вращая планшет вручную, и оставьте на инкубацию в темноте при комнатной температуре (20 - 25 °С) в течение 2 часов.

4. Вылейте жидкость из лунок и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Заполните каждую лунку 250 мкл дистиллированной воды и снова вылейте жидкость. Повторите процедуру отмывки ещё два раза.



5. Добавьте в каждую лунку по 50 мкл раствора субстрата и 50 мкл раствора хромогена. Осторожно перемешайте, вращая планшет вручную, и оставьте на инкубацию при комнатной температуре (20 – 25°С) в течение 30 минут в темноте.

6. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора (жёлтая крышка). Осторожно перемешайте, вращая планшет вручную и измерьте оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм относительно воздуха в течение 30 минут после добавления стоп-раствора.

## **11. Результаты**

Для обработки результатов иммуноферментного анализа с помощью тест-систем RIDASCREEN® имеется специальное программное обеспечение RIDA® SOFT Win (Артикул № Z9999). Программное обеспечение RIDA® SOFT Win и

инструкцию к нему Вы можете бесплатно скачать на сайте официальных дистрибьюторов:

ООО «Неотест», Россия	<a href="https://neo-test.ru/programmnoe-obespechenie/">https://neo-test.ru/programmnoe-obespechenie/</a>	
ОДО «КомПродСервис», Беларусь	<a href="https://komprod.com/programmnoe-obespechenie/">https://komprod.com/programmnoe-obespechenie/</a>	

Пример стандартной кривой дан в сертификате качества на тест-систему.

Обработка результатов анализа без использования программного обеспечения:

$$\frac{\text{оптическая плотность стандарта/пробы}}{\text{оптическая плотность нулевого стандарта}} \times 100\% = \% \text{ оптической плотности}$$

Нулевой стандарт приравнивается к 100%, а величины оптической плотности выражаются в процентах. По величинам относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим значениям концентрации зеараленона в нг/л строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат.

Для того чтобы вычислить концентрацию зеараленона в нг/кг в исходной пробе необходимо значение полученное по калибровочной кривой, умножить на соответствующий фактор разбавления. При выполнении анализа в соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения:

- Злаковые и корма – 35
- Пиво – 5
- Сыворотка и моча – 1
- Молоко – 1,1
- Мясо – 5,5

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.