



RIDASCREEN® FAST Афлатоксин

Арт. No. R5202

Иммуноферментный анализ для количественного
определения афлатоксина

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® FAST Афлатоксин

Описание

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin (Артикул №R5202) – это конкурентный иммуноферментный анализ для количественного определения афлатоксина в злаках (ячмень, соя, пшеница, овес, рожь, рис, кукуруза), кормах, орехах и пасте из фундука. Все реагенты, необходимые для иммуноферментного анализа – в том числе стандарты – содержатся в наборе.

Набора достаточно для 48 определений (включая стандарты).

Для количественного определения необходим спектрофотометр

Пробоподготовка:	Экстракция, фильтрация, разбавление
Время выполнения:	Подготовка проб (10 проб).....ок. 10 мин Проведение теста (время инкубации)..... 15 мин
Предел обнаружения: (соответствует стандартному веществу)	Злаки, корма.....< 1,7 мкг/кг Паста из фундука.....1,7 мкг/кг Миндаль.....1,9 мкг/кг Фундук.....< 1,3 мкг/кг Грецкий орех.....7,99 мкг/кг Кешью.....2,2 мкг/кг Арахис.....1,4 мкг/кг Фисташки.....1,78 мкг/кг Орех макадамия.....1,1 мкг/кг

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	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

RIDASCREEN® FAST Aflatoxin – это конкурентный иммуноферментный анализ для количественного анализа афлатоксина в злаках (ячмень, соя, пшеница, овес, рожь, рис, кукуруза), орехах (миндаль, макадамия, фисташки, арахис, кешью, грецкие орехи, фундук) и кормах.

2. Общая информация

Афлатоксины являются канцерогенными, высокотоксичными метаболитами плесневых грибов *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Афлатоксин В1, как правило, присутствует вместе с афлатоксинами В2, G1 и G2, главным образом в злаках, кукурузе, семенах хлопка и некоторых орехах.

3. Принцип метода

В основе процедуры анализа лежит взаимодействие антигенов с антителами. Поставляемый в комплекте набора планшет сенсibiliзирова н антителами, направленными против антител к афлатоксину. Исследуемые и стандартные образцы, конъюгат (афлатоксин, конъюгированный с пероксидазой хрена), анти-афлатоксиновые антитела дозируются в лунки активированного планшета. Свободный афлатоксина и афлатоксин конъюгата конкурирует за сайты связывания анти-афлатоксиновых антител (конкурентный иммуноферментный анализ). В то же время антитела против афлатоксина М1 связываются с антителами иммобилизованными на поверхности лунок. Любой несвязанный ферментный конъюгат удаляют на стадии промывки. В лунки добавляют субстрат/хромоген, связанный ферментный конъюгат превращает хромоген в окрашенный продукт. Добавление стоп-раствора приводит к изменению цвета с синего на желтый. Измерение производится фотометрически на длине волны 450 нм. Оптическая плотность пробы обратно пропорциональна концентрации афлатоксина в образце.

4. Предоставляемые реагенты

Каждый набор содержит достаточное количество материалов для 96 анализов, включая стандартные образцы. Каждый тестовый набор содержит:

Компонент	Цвет крышки	Формат		Объём
Микротитрационный планшет, покрытый антителами	-	Готов к использованию		48 лунок (6 стрипов по 8 лунок)
Стандарт 1		Готов к использованию	0 мкг/л	1,3 мл
Стандарт 2		Готов к использованию	1,7 мкг/л	1,3 мл
Стандарт 3		Готов к использованию	5 мкг/л	1,3 мл

Стандарт 4		Готов к использованию	15 мкг/л	1,3 мл
Стандарт 5		Готов к использованию	45 мкг/л	1,3 мл
Конъюгат	Красный	Готов к использованию		3 мл
Антитела	Черный	Готов к использованию		3 мл
Солевой промывочный буфер Твин		Раствор соли	-	
Субстрат/Хромоген Red Chromogen Pro	Коричневый	Готов к использованию		10 мл
Стоп-реагент	Жёлтый	Готов к использованию		14 мл

Примечание: фактор разбавления 10 для проб уже учтен в концентрации стандартов. Следовательно, концентрацию афлатоксина в образцах можно считать непосредственно с калибровочной кривой.

5. Необходимые, но не предоставленные материалы

5.1. Оборудование:

- планшетный спектрофотометр (450 нм);
- центрифуга;
- градуированные пипетки;
- градуированные цилиндры;
- мельница лабораторная;
- фильтровальная бумага Whatman No.1 или аналог;
- посуда для приготовления экстракта пробы: фильтровальная воронка и колба на 50 мл;
- микропипетки на 50, 100 и 1000 мкл.

5.2. Реагенты:

- метанол;
- 70%-й раствор метанола: 70 мл метанола (100%) смешивается с 30 мл дистиллированной или деионизированной воды;
- NaCl;
- дистиллированная или деионизированная вода.

6. Меры предосторожности для пользователей

Тест должен проводиться только обученными сотрудниками лаборатории. Необходимо строго соблюдать инструкцию по применению.

В стандартах содержится афлатоксин, следует соблюдать особую осторожность. Избегайте контакта реагента с кожей (используйте перчатки).

Обеззараживание стеклянной посуды и растворов афлатоксина лучше всего проводить с помощью раствора гипохлорита натрия (отбеливателя) (10% об./об.) в течение ночи (довести раствор с помощью HCl до pH 7).

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

7. Инструкции по хранению

Храните набор при температуре 2 – 8 °C. Не замораживайте компоненты набора.

Верните неиспользованные стрипы в оригинальный пакет из фольги, снова запечатайте пакет вместе с прилагаемым влагопоглотителем и храните при температуре 2–8 °C.

Избегайте воздействия прямого света на раствор субстрат/хромоген.

По истечении срока годности набора гарантия качества не действует (см. этикетку на наборе).

Набор можно использовать регулярно, по крайней мере, до истечения срока годности (указанного на упаковке набора) при правильном хранении.

Не смешивайте реагенты от разных партий.

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. Предоставленную пробу (отобранную в соответствии с действующими техническими нормативными правовыми актами в установленном порядке) перед экстракцией необходимо измельчить и перемешать.

9.1. Злаки, корма

- Взвесьте 5 г измельчённой пробы, поместите в подходящую емкость и добавьте 25 мл 70%-го метанола*.

- Тщательно перемешивайте в течение 10 мин (вручную или на шейкере).

- Профильтруйте экстракт через фильтровальную бумагу Whatman No.1 (или аналог).

- 1 мл фильтрата смешайте с 1 мл дистиллированной или деионизированной воды.

- Для анализа используйте 50 мкл разведённого фильтрата на лунку.

* - объём пробы может быть увеличен пропорционально объёму раствора метанола/воды, например 10 г в 50 мл 70%-го метанола.

9.2. Орехи

- Взвесьте 5 г измельчённой пробы, поместите в подходящую емкость.
- Добавьте в измельченный образец 2,5 г NaCl.
- Добавьте 25 мл 70% (об. / об.) метанола.
- Экстрагируйте путем перемешивания смеси в течение 10 мин при комнатной температуре.
- Центрифугируйте: 15 мин при 3000 г при комнатной температуре.
- Удалите верхний жировой слой (например: отбирая жировой слой пипеткой Пастера).
- Отфильтровать экстракт через бумажный фильтр Whatman № 1, если это необходимо.
- Разбавить прозрачный супернатант 1:2 (1+1) дистиллированной или деионизированной водой, хорошо перемешать.
- Для анализа используйте 50 мкл разведённого фильтрата на лунку.

9.3. Паста из фундука

Реагенты:

- Метанол (70 %): на 1 л смешать 700 мл метанола (100 %) с 300 мл деминерализованной воды.
- NaCl, ч.д.а.

Процедура:

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

- Взвесьте 5 г гомогенизированного образца в пробирку на 50 мл.
- Добавьте в образец 2,5 г NaCl.
- Добавьте 25 мл 70 % (об./об.) метанола.
- Экстрагируйте перемешиванием (например, переворачиванием) в течение 10 мин при комнатной температуре.
- Центрифугируйте: 15 мин при 3000 г при комнатной температуре.
- Удалите верхний слой жира (например, путем аспирации слоя жира пипеткой Пастера или с помощью вакуума).
- Разбавьте прозрачный супернатант 1:2 (1 + 1) деминерализованной водой.
- Хорошо перемешайте
- Используйте 50 мкл разведенного образца на лунку в тесте.

Обратите внимание: Проведите анализ холостого спайк-раствора, чтобы распознать возможные фоновые эффекты. Если возникают фоновые эффекты, мы рекомендуем очищать образцы с помощью IAC (колонка RIDA® Aflatoxin, R5001/5002).

10. Проведение теста

10.1. Предварительные комментарии

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

2. Специфическая реакция начинается с добавления специфических антител. При использовании одноканального дозатора рекомендуется одновременно использовать не более трех стрипов.

3. Не использованные реагенты храните при 2–8 °С.

В качестве промывочного буфера необходим твин-буфер PBS. Используйте промывочный буферный раствор (см. 4.), входящий в набор. Растворите всю соль в одном литре дистиллированной воды. Срок годности готового к использованию промывочного буфера составляет прикл. 4-6 недель при 2-8 С.

Или растворите содержимое пакета в 100 мл дистиллированной воды, чтобы получить 10-кратный промывочный буфер: 1 часть концентрата необходимо растворить в 9 частях дистиллированной воды, чтобы получить готовый к использованию промывочный буфер.

Срок годности 10-кратного концентрата прикл. 8–12 недель, хранить при комнатной температуре (20–25°C).

10.2. Процедура анализа

Не допускайте полного высыхания микролунок и избегайте длительных интервалов между рабочими этапами. Воспроизводимость в любом ИФА во многом зависит от тщательности процедуры промывки лунок. Тщательно следуйте рекомендованной последовательности промывки, как указано в инструкции.

Во время инкубации избегайте попадания прямых солнечных лучей на реагенты. Для этого закрывайте микротитровальные планшеты.

Специфическая реакция начинается с добавления специфического антитела.

При испытании рекомендуется использовать не более трех стрипов одновременно при использовании одноканального дозатора. Можно использовать больше стрипов (до 6), при использовании многоканальной пипетки. Сразу после использования все реагенты необходимо вернуть к температуре 2-8 °С.

Стандарты афлатоксина поставляются готовыми к использованию. Коэффициент разбавления 10 для проб учтен в концентрации стандартов. Следовательно, концентрацию афлатоксина в образцах можно определить непосредственно по калибровочной кривой.

1. Вставьте достаточное количество лунок в держатель микролунок. Запишите позиции стандартов и образцов.

2. Внесите пипеткой 50 мкл стандартного или приготовленного образца в отдельные лунки; используйте новый наконечник пипетки для каждого стандарта или образца.

3. Добавьте 50 мкл ферментного конъюгата (красная крышка) в каждую лунку.

4. Добавьте 50 мкл раствора антитела против афлатоксина (черная крышка) в каждую лунку. Осторожно перемешайте, встряхивая планшет вручную, и инкубируйте в течение 10 минут (+/- 1) при комнатной температуре (20–25° С).

5. 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 (см. 10.1.). Снова опорожните лунки и удалите всю оставшуюся жидкость. Повторите этап промывки еще два раза.

6. Добавьте 100 мкл субстрата/хромогена (коричневая крышка) в каждую лунку. Осторожно перемешайте, встряхивая планшет вручную, и инкубируйте в течение 5 минут (+/- 0,5) при комнатной температуре (20–25°С) в темноте.

7. Добавьте 100 мкл стоп-раствора (желтая крышка) в каждую лунку. Осторожно перемешайте, встряхивая планшет вручную, и измерьте оптическую плотность при 450 нм в течение 10 минут.

11. Результаты

Для обработки результатов иммуноферментного анализа с помощью тест-систем RIDASCREEN® используется специальное программное обеспечение RIDA® SOFT Win (Артикул № Z9996).

Для единичных измерений мы рекомендуем использовать logit/log оценку результатов, а для двойных и множественных определений следует использовать cubic spline. Пример стандартной кривой дан в сертификате на тест-систему. Обработка результатов анализа без использования программного обеспечения:

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

Таким образом, нулевой стандарт приравнивается к 100%, а значения оптической плотности указаны в процентах. Значения, рассчитанные для стандартов, вводят в систему координат на полулогарифмической миллиметровой бумаге относительно концентрации афлатоксина (мкг /кг).

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.