



RIDASCREEN® Афлатоксин общий

Арт. No. R4701

Иммуноферментный анализ для количественного определения общего 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® Афлатоксин общий

Описание



RIDASCREEN®Aflatoxin Total (Кат. №.:R4701) представляет собой набор для количественного определения афлатоксина SC в зерне, кормах, орехах, арахисовом масле, пасте из фундука, красном сорго и зелёном кофе методом конкурентного иммуноферментного анализа. Все необходимые для иммуноферментного анализа реагенты, включая стандарты, входят в комплектацию набора. Набор предназначен для 96 измерений (включая стандарт). Для количественного анализа требуется микропланшетный ИФА анализатор (ридер).

Пробоподготовка:	Размельчение, экстракция, фильтрование или центрифугирование и разбавление
Время выполнения:	Подготовка проб (10 проб) – ок. 30 минут Выполнение теста (время инкубации) – 45 мин
Предел обнаружения: (соответствует стандартному веществу) <small>*список расширен на основе валидационного отчета R-biopharm</small>	Злаки и корма.....ок. 1,75 мкг/кг Зелёный кофе.....0,25 мкг/кг Орехи.....0,1 мкг/кг Арахисовое масло.....1,75 мкг/кг Паста из фундука.....1,75 мкг/кг
Скорость извлечения: (соответствует стандартному веществу эталонных образцов загрязненной кукурузы)	ок. 85% коэффициент вариации: 15%
Специфичность:	Афлатоксин В1.....100% Афлатоксин В2.....ок. 48% Афлатоксин G1.....ок. 75% Афлатоксин G2.....ок. 18%

Специфичность теста RIDASCREEN® Aflatoxin Total определяли путем анализа перекрестной реактивности с соответствующими веществами в буферной системе. В образцах специфичность может отличаться от той, что определена в буферной системе, из-за эффектов матрицы. Перед анализом веществ с перекрестной реактивностью Вы должны определить предел обнаружения и степень извлечение вещества в соответствующей матрице образца. Тест не может различать аналиты и перекрестно-реактивные вещества.

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®Aflatoxin Total (Кат. №R4701) представляет собой тест-систему, предназначенную для количественного определения афлатоксина в зерне, кормах, орехах, арахисовом масле, пасте из фундука, красном сорго и зелёном кофе методом конкурентного иммуноферментного анализа.

2. Общая информация

Афлатоксины являются вторичными метаболитами плесневых грибов рода *Aspergillus flavus*, *parasiticus* и *nomius*. Эти грибы встречаются во влажных тропических областях, контаминация растительных продуктов питания происходит в странах культивирования. Афлатоксины относятся к сильнейшим канцерогенным веществам природного происхождения.

Афлатоксин В1, который почти всегда встречается вместе с Афлатоксинами В2, G1 и G2, это аналит с наибольшей токсической значимостью. Обычно его находят в кукурузе, арахисе, бразильских орехах, хлопковом семени и фисташках.

3. Принцип метода

В основе метода – реакция взаимодействия антигенов с антителами. Лунки стрипов микротитровального планшета покрыты антителами захвата, направленными против антиафлатоксиновых антител. При проведении анализа в лунки планшета добавляют растворы стандартов или образцов, ферментный конъюгат афлатоксина и анти-афлатоксиновые антитела. Свободный афлатоксин и афлатоксин ферментного конъюгата конкурируют за центры связывания афлатоксиновых антител (конкурентный иммуноферментный анализ).

Одновременно анти-афлатоксиновые антитела связываются с иммобилизованными на поверхности планшета антителами захвата. Несвязавшийся ферментный конъюгат удаляют в процессе промывки. Далее в

лунки планшета добавляют субстрат/хромоген. Связавшийся ферментный конъюгат преобразует хромоген в конечный продукт голубого цвета.

Добавление стоп-раствора приводит к изменению цвета с голубого на желтый. Измерение оптической плотности раствора проводят при 450 нм. Оптическая плотность раствора в лунках обратно пропорциональна концентрации афлатоксина в пробе.

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 М	-	Готов к использованию	96 лунок
Стандарт 1	Белый	Готов к использованию	0 мкг/л 1,3 мл
Стандарт 2	Белый	Готов к использованию	0,05 мкг/л 1,3 мл
Стандарт 3	Белый	Готов к использованию	0,15 мкг/л 1,3 мл
Стандарт 4	Белый	Готов к использованию	0,45 мкг/л 1,3 мл
Стандарт 5	Белый	Готов к использованию	1,35 мкг/л 1,3 мл
Стандарт 6	Белый	Готов к использованию	4,05 мкг/л 1,3 мл
Солевой промывочный буфер Твин		Соль для растворения	
Конъюгат	Красный	Готов к использованию	6 мл
Антитела	Чёрный	Готов к использованию	6 мл
Субстрат/Хромоген Red Chromogen Pro	Коричневый	Готов к использованию	10 мл
Стоп-реагент	Жёлтый	Готов к использованию	14 мл

5. Необходимые, но не предоставленные материалы

5.1. Оборудование:

- ИФА-анализатор (ридер) с фильтром на 450 нм;
- градуированный цилиндр (пластиковый или стеклянный), 100мл;
- стеклянные фильтровальная воронка и колба (50мл);
- лабораторная мельница;
- лабораторный шейкер (дополнительно);
- фильтровальная бумага: Whatman No.1 или аналог;
- градуированные пипетки;

- дозаторы автоматические на 20 мкл – 200мкл и 200 мкл – 1000мкл.

5.2. Реагенты:

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

6. Меры предосторожности для пользователей

К проведению анализа допускается только специально обученный персонал. Необходимо строго соблюдать инструкцию по использованию набора. Стандартные растворы содержат афлатоксин, 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, S226).

Этот комплект может содержать опасные вещества. Примечания об опасности содержащихся веществ см. в соответствующих паспортах безопасности материалов (MSDS) для этого продукта, доступных онлайн на сайте www.r-biopharm.com.

7. Инструкции по хранению

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

9.1. Злаки и корма

- Взвесьте 2 г измельченной пробы, поместите в подходящую емкость и добавьте 10 мл 70%-го метанола*.

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

- Профильтруйте экстракт через фильтровальную бумагу Whatman No.1 (или аналог) или отцентрифугируйте (10 мин / 3500 g / комнатная температура).

- 100 мкл фильтрата разведите в 600 мкл дистиллированной или деионизированной воды.

- Для анализа используйте 50 мкл разведенного фильтрата на лунку.

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

9.2. Зелёный кофе

Проба должна быть репрезентативной (собрана в соответствии с принятыми методами пробоотбора).

Убедитесь, что образец однороден. В противном случае степень извлечения может отличаться. Образцы следует хранить в прохладном, защищенном от света месте. Для проверки результатов рекомендуется запускать известные холостые образцы и пробы с известной добавкой.

Чтобы уменьшить интерференцию матрицы, для подготовки проб следует использовать колонку RIDA® Aflatoxin. Иммуноаффинные колонки не должны высыхать во время использования.

Реагенты:

- Раствор Карреза I (0,36 М ферроцианид калия (II) x 3 H₂O)

- Раствор Карреза II (1,04 М сульфат цинка x 7H₂O)

- RIDA® Aflatoxin column (Арт. No. R5001/R5002)

Процедура:

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.

- Взвесьте 5 г гомогенизированного образца.

- Добавьте 25 мл 70 % метанола*

- Смешивайте в течение 10 минут с помощью шейкера.

- Центрифугируйте 5 мин/4000 g.

- Осаждение раствором Карреза:

Добавьте 250 мкл раствора Карреза I, быстро и мягко встряхните (реагент должен быть распределен без сильного взбалтывания центрифугируемого материала).

Добавьте 250 мкл раствора Карреза II и снова быстро перемешайте

- Центрифугируйте: 10 мин/4000 g (альтернатива: профильтровать через бумажный фильтр).

- Добавьте 15 мл дистиллированной воды к 5 мл фильтрата и полностью заполните колонку приготовленным раствором образца (20 мл соответствует 1 г образца).

- Промойте колонку 2 мл дистиллированной воды.

- Пропустите разведенный экстракт пробы через колонку со скоростью потока прибл. 1 капля/с; экстракт пробы должен проходить через колонку медленно и непрерывно (используйте положительное давление с помощью шприца или абсорбируйте при использовании вакуумной установки)

- Промойте колонку 10 мл дистиллированной воды и удалите пропущенный раствор.

- Пропустите через колонку немного воздуха убедитесь, что вся остаточная жидкость удалена из колонки.

- Поместите чистый флакон непосредственно под колонку и элюируйте 0,5 мл метанола (100 %) (скорость потока: 1 капля/с).

- Пропустите немного воздуха через колонку, убедитесь, что элюент полностью собран.

- Разбавьте элюент, содержащий токсин, 1:10 дистиллированной водой.

- Используйте 50 мкл разбавленного элюента на лунку в тесте.

9.3. Орехи

Реагенты:

- Метанол (ч.д.а.)

- NaCl (ч.д.а.)

- Фосфатно-солевой буфер (PBS) RP202

Процедура:

- Репрезентативная проба (в соответствии с принятыми методами отбора проб) должна быть измельчена и тщательно перемешана перед тем, как приступить к процедуре экстракции.

- Взвесьте 2 г образца и 0,4 г хлорида натрия в подходящую емкость и добавьте 8 мл 60% метанола. (При необходимости размер образца может быть увеличен, поэтому соотношение NaCl и 60% метанола должно быть постоянным, т.е. 5 г образца, 1 г NaCl и 20 мл 60% метанола).

- Кратко встряхните и встряхните в течение 10 минут с помощью шейкера.

- Отфильтруйте образец через Whatman No. 113 или нет. 4 бумажных фильтра или центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут.

- Разбавьте 2 мл фильтрата 14 мл раствора фосфатно-солевого буфера (PBS).

- Пропустить разбавленный фильтрат (эквивалентно 0,5 г образца) через колонку со скоростью потока 2 мл/мин (или образец может пройти через колонку под действием силы тяжести, если это предпочтительнее). Медленная, постоянная скорость потока необходима для захвата токсинов антителами. Промойте колонку, пропуская 20 мл воды со скоростью потока примерно 5 мл/мин. Пропустите воздух через колонку, чтобы удалить остаточную жидкость.

- Элюируют токсины из колонки со скоростью потока 1 капля/сек, используя 3 мл 100% метанола, и собирают в стеклянную пробирку. Дополнительную информацию см. в разделе «Элюция» инструкции по применению.

Выпаривают до полного высыхания при 60 °С в атмосфере азота или в потоке воздуха.

- Сухой остаток растворяют в 1 мл 10% метанола.

- Используйте 50 мкл разбавленного элюента на лунку в тесте.

9.4. Красный сорго

Из-за неспецифического связывания некоторых ингредиентов, т.е. красители в красном сорго, к специфическим антителам, могут возникнуть фоновые или ложноположительные результаты. Поэтому рекомендуется проверить метод, проанализировав холостые образцы и пробы с добавлением.

Образцы следует хранить в прохладном, защищенном от света месте.

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

Репрезентативная проба (в соответствии с принятыми методами отбора проб) должна быть измельчена и тщательно перемешана до начала процедуры экстракции.

- Взвесьте 2 г измельченного и гомогенизированного образца в подходящий контейнер и добавьте 10 мл 70% метанола *

- Смешивайте в течение 10 минут при комнатной температуре с помощью шейкера.

- Фильтруйте экстракт через фильтр (Whatman № 1 или аналогичный) или центрифугу (10 мин/3500 г/комнатная температура).

- Разбавьте 100 мкл фильтрата 600 мкл дистиллированной воды.

- Используйте 50 мкл разбавленного фильтрата на лунку в тесте.

*Размер образца может быть увеличен, если требуется, но объем метанола/воды должен быть адаптирован соответствующим образом, например, 10 г в 50 мл 70% метанола.

9.5. Арахисовое масло

Реагенты:

- NaCl, ч.д.а.

Процедура:

Проба должна быть репрезентативной (в соответствии с принятыми методами выборки). Убедитесь, что образец однороден. В противном случае восстановление может отличаться. Образцы следует хранить в прохладном, защищенном от света месте. Для контроля метода мы рекомендуем запускать известные холостые образцы и пробы с добавлением.

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 пробоподготовку при комнатной температуре.

- Взвесьте 5 г гомогенизированного образца и 2,5 г NaCl в центрифужной пробирке с завинчивающейся крышкой.

- Добавьте 25 мл 70 % метанола*

- Тщательно перемешайте в течение 10–30 с (вихревая мешалка).

- Смешивайте в течение 10 минут с помощью шейкера.

- Центрифуга: 10 мин/3000 г

- Разбавьте 100 мкл супернатанта 600 мкл дистиллированной воды.

- Используйте 50 мкл разбавленного супернатанта на лунку в тесте.

*При необходимости размер образца может быть увеличен, но количество NaCl и объем метанола/воды должны быть адаптированы соответствующим образом, например: 10 г образца + 5 г NaCl + 50 мл 70 % метанола.

9.6. 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 восстановление 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.

- Экстрагирование перемешиванием (например, переворачиванием) в течение 10 мин при комнатной температуре.

- Центрифуга: 15 мин при 3000 г при комнатной температуре.

- Удалите верхний слой жира (например, путем аспирации слоя жира пастеровской пипеткой или с помощью вакуума).

- Разбавьте прозрачный супернатант 1:7 деминерализованной водой (например, 100 мкл супернатанта + 600 мкл воды).

- Хорошо смешать
- Используйте 50 мкл разведенного образца на лунку в тесте.

Рекомендация: Проведите анализ холостого образца, чтобы распознать возможные фоновые эффекты. Если возникают фоновые эффекты, рекомендуется очищать образцы с помощью IAC (колонка RIDA® Aflatoxin, R5001/5002).

10. Проведение теста

10.1. Предварительные указания

1. Перед использованием доведите все реагенты до комнатной температуры (20 – 25°C). После использования все реагенты необходимо хранить при температуре 2 - 8°C.

2. 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°C в течение 4-6 недель.

Альтернативно. Растворите содержимое пакетика в 100 мл дистиллированной воды (10-ти кратный концентрат). Этот раствор может храниться около 8-12 недель при комнатной температуре (20 - 25°C). Для получения 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.

Избегайте попадания прямых солнечных лучей во время всех инкубаций. Во время инкубации микротитровальные планшеты необходимо накрывать во избежание испарения жидкости из лунок.

1. Вставьте в рамку планшета микролунок в количестве, достаточном для всех стандартов и исследуемых растворов. Запишите расположение лунок со стандартами и исследуемыми растворами.

2. Внесите 50 мкл стандартов или исследуемых проб в соответствующие лунки. Образцы вносятся в дублях. Для каждого образца или стандарта используйте новые наконечники.

3. Внесите в лунки по 50 мкл ферментного конъюгата (красная крышка).

4. Внесите в лунки по 50 мкл раствора анти-афлатоксиновых антител (чёрная крышка). Перемешайте осторожными круговыми движениями, и инкубируйте при комнатной температуре (20 - 25 °C) в течение 30 минут.

5. 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 250 мкл моющего буфера (см. 10.1). Снова вылейте

жидкость из лунок и тщательно выбейте капельки жидкости. Повторите промывку еще два раза.

6. Добавьте по 100 мкл раствора субстрата/хромогена (коричневая крышка) в каждую лунку. Перемешайте осторожными круговыми движениями, инкубируйте при комнатной температуре (20 - 25°C) в течение 15 минут в темноте.

7. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора (жёлтая крышка). Перемешайте осторожными круговыми движениями. Измерьте оптическую плотность при 450 нм в течение 30 минут после добавления стоп-раствора.

11. Результаты

Специальное программное обеспечение, RIDA®SOFT Win.net (Art. Z9996), доступно для оценки результатов иммуноферментного анализа RIDASCREEN®.

Используйте функцию кубического сплайна RIDA®SOFT Win.net для оценки результатов анализа. Стандартная кривая приведена в сертификате качества, прилагаемому к набору.

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, таким образом, к 100%, а величины оптической плотности указываются в процентах. По величинам относительной оптической плотности (в %), вычисленным для стандартных растворов и соответствующим значениям концентрации афлатоксина в нг/кг строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат.

Концентрация афлатоксина в нг/кг считается по калибровочной кривой исходя из соответствующей оптической плотности каждой пробы (в %).

Чтобы получить концентрацию афлатоксина в нг/кг, фактически содержащуюся в образце, концентрацию, считанную с калибровочной кривой, необходимо дополнительно умножить на соответствующий коэффициент разбавления. При работе в соответствии с указанными правилами коэффициент разбавления будет следующим: зерновые и корма, арахисовое масло, красное сорго, ореховая паста – 35, орехи – 2.

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.