

Набор для определения глифосата методом иммуоферментного анализа



Abraxis

Иммуоферментный анализ для определения
содержания глифосата в пробах воды

**Артикул №500205
500087**

1. Описание

Комплект Eurofins Abraxis glyphosate ELISA Plate для иммуноанализа предназначен для количественного скрининга глифосата в образцах воды. Этот тест подходит для количественного и/или качественного скрининга глифосата в подземных водах, поверхностных водах, водах из скважины и образцах водопроводной воды (см. п. С Отбор и подготовка проб). Для анализа почвы и образцов пищи запросите инструкцию у Eurofins Abraxis. Образцы, которым требуется какой-либо официальный документ, должны быть подтверждены ВЭЖХ, GC/MS или другими методами.

2. Меры предосторожности

Стандартные в тестовом наборе содержат небольшое количество глифосата. Разрушителем дериватизации является диметилсульфоксид (ДМСО). Раствор субстрата содержит тетраметилбензидин, а стоп-раствор содержит разбавленную серную кислоту. Избегайте контакта этих растворов с кожей и слизистыми оболочками. Если эти реагенты попадают на кожу, тщательно промойте её водой.

3. Стабильность реагентов и хранение

Набор для ИФА для определения глифосата должен храниться в холодильнике (4-8°C). Растворы нужно нагреть до комнатной температуры (20-25°C) перед использованием. Реагенты могут использоваться до истечения срока годности. Утилизируйте реагенты в соответствии с законодательством Вашей страны.

4. Принцип работы теста

Тест представляет собой прямой конкурентный ИФА, основанный на распознавании глифосата поликлональными антителами. Анализируемый образец дериватизируется (см. п. В разделе D, Подготовка к анализу), а затем добавляется в микролунку планшета, покрытые козьими антикроличьими антителами. Раствор кроличьих антител против глифосата добавляется в лунки с дериватизированными образцами и инкубируется в течение 30 минут. Затем добавляется конъюгат фермента глифосата и возникает конкурентная реакция между глифосатом, который может присутствовать в образце, и меченым ферментом, для связывания с кроличьими антителами против глифосата, связанными с козьими антителами против кроликов, иммобилизованными на микротитрационном планшете. Реакция продолжается в течение 60 минут. После стадии промывки и добавления раствора субстрата генерируется цветовой сигнал. Интенсивность синего

цвета обратно пропорциональна концентрации глифосата, присутствующей в образце. Цветовая реакция останавливается после указанного времени, и результат оценивается с использованием ИФА ридера. Концентрации образцов определяются интерполяцией с использованием стандартной кривой, построенной с каждым прогоном.

5. Ограничения определения глифосата, возможные помехи при тестировании

Многочисленные органические и неорганические соединения, обычно встречающиеся в образцах, были проанализированы; установлено, что они не мешают анализу. Однако из-за изменчивости соединений, которые могут быть обнаружены в образцах, тестовые помехи, вызванные матричными эффектами, не могут быть полностью исключены. Было обнаружено, что присутствие следующих веществ до 10 000 ppm не оказывает существенного влияния на результаты теста: нитрат, фосфат, сульфат, фторид натрия, кальций, магний, медь, цинк, железо и тиосульфат натрия. Марганец до 100 ppm, гуминовая кислота до 10 ppm и хлорид натрия до 1M также не оказывал существенного влияния на результаты.

Растворители, обычно используемые для извлечения пестицидов из почвы или растительных матриц, такие как метанол и ацетон, оказались неподходящими для использования в концентрациях до 100% с набором ИФА на глифосат.

Пробы, содержащие крупные твердые частицы, должны быть отфильтрованы (см. п. C, Отбор и подготовка проб). Образцы, консервированные монохлоруксусной кислотой или другими кислотами, должны быть нейтрализованы (pH ~ 7) перед анализом. Стандарты и образцы должны быть дериватизированы перед каждым анализом с помощью набора ИФА на глифосат (см. п. D Подготовка к анализу).

Вы можете получить неправильные результаты. К возможным источникам таких ошибок относятся: неподходящие условия хранения тест-набора, неправильная последовательность пипетирования или неточные объемы реагентов, слишком длительное или слишком короткое время инкубации во время иммунной и/или субстратной реакции, воздействие прямого или непрямого солнечного света во время субстрата, воздействие экстремальных температур (ниже 10°C или выше 30°C) во время проведения анализа. Как и в случае любого аналитического метода (ГХ, ВЭЖХ и т. д.), положительные результаты, которые вносятся в какие-либо официальные документы, должны быть подтверждены альтернативным методом.

А. Реагенты и материалы, входящие в состав набора

Бокс 1 (арт. №500086)

1. Планшет для микротитрования, покрытый вторичным антителом (антикроличьим), в повторно закрывающемся алюминиевом пакете с влагопоглотителем
2. Раствор антител к глифосату, 6 мл
3. Раствор конъюгата глифосата, 6 мл
4. Стандарты глифосата (6): 0, 0,075, 0,20, 0,5, 1,0, 4,0 ppb (мкг/кг), по 2 мл каждый
5. Контроль $0,75 \pm 0,2$ ppb (мкг/кг), 2 мл
6. Разбавитель/Нулевой стандарт (разбавитель образца)*, 30 мл
7. Концентрат промывочного буфера (5X), 100 мл, необходимо развести перед использованием, см. раздел «Подготовка к анализу» (раздел D)
8. Раствор субстрата (цветной) (ТМВ), 16 мл
9. Стоп-раствор, 12 мл (обращаться осторожно)

Бокс 2 (арт. №500087)*

1. Буфер для анализа, 125 мл
2. Реагент для дериватизации, 3 флакона по 100 мкл
3. Разбавитель реагента для дериватизации, 3 флакона по 4 мл

**(для приобретения дополнительного количества компонентов свяжитесь с Вашим поставщиком)*

В. Дополнительные материалы (не входят в состав набора)

1. Микропипетки с одноразовыми пластиковыми наконечниками (10-200 и 200-1000 мкл)
2. Многоканальная пипетка (10–300 мкл), ступенчатая пипетка (10–300 мкл) или электронная пипетка с одноразовыми пластиковыми наконечниками (способна ввести 50–1000 мкл)
3. Одноразовые стеклянные пробирки
4. Покровное стекло парафильма или планшета для микротитрования
5. Промывочная машина для микротитровальных планшетов (дополнительно)
6. Ридер для микротитровальных планшетов (длина волны 450 нм)
7. Деионизированная или дистиллированная вода
8. Контейнер емкостью 500 мл (информацию о разбавленном промывочном буфере 1X см. в разделе «Подготовка к тесту», раздел D)
9. Бумажные полотенца или аналогичный абсорбирующий материал
10. Таймер

С. Отбор и подготовка проб

Соберите пробы воды в стеклянные или пластиковые контейнеры для проб. Образцы питьевой воды следует обрабатывать аскорбиновой кислотой (0,1 мг/мл) сразу после отбора для удаления остаточного хлора. Образцы, консервированные монохлоруксусной кислотой или другими кислотами, должны быть нейтрализованы (pH ~ 7) перед анализом.

Образцы, содержащие крупные твердые частицы, должны быть отфильтрованы перед анализом с использованием любого из следующих

шприцевых фильтров: Environmental Express 0,2 мм PES (номер по каталогу SF020E), Pall Acrodisc® 0,2 мм PVDF (номер по каталогу 4450), Whatman™ 0,2 мм Anotop™ 25 Plus (кат. , № 6809-4022), или стекловолокно Environmental Express 1,2 мм (номер по каталогу SF012G).

Храните образцы в холодильнике до 2 недель. При сроках хранения более 2 недель образцы следует хранить в замороженном виде.

D. Подготовка к анализу

Необходимо оборудование для микропипетирования и наконечники для дозирования стандартов и образцов. Для добавления ферментного конъюгата, антител, субстрата (красителя) и стоп-растворов рекомендуется многоканальная, ступенчатая или электронная пипетка, чтобы уравнивать периоды инкубации по всему микротитровальному планшету. Пожалуйста, используйте реагенты и стандарты только из одной партии упаковки в одном тесте, так как они были скорректированы в комбинации.

1. Перед использованием нагрейте микротитрационный планшет, реагенты и образцы до комнатной температуры.
2. Стандартные растворы, контроли, антитела, конъюгат, субстрат и стоп-раствор готовы к использованию и не требуют дополнительных разведений.
3. Разбавьте концентрат промывочного буфера (5X) в соотношении 1:5. Если вы используете всю бутылку (100 мл), добавьте 400 мл деионизированной или дистиллированной воды.
4. Со стоп-раствором следует обращаться осторожно, так как он содержит разбавленную H_2SO_4 .
5. Достаньте необходимое количество стрипов для титрационного микропланшета из пакета. Остальные полоски хранятся в пакете из фольги с влагопоглотителем и застегиваются на молнию.
6. После анализа остальные компоненты набора храните в холодильнике (4–8°C).

7. Дериватизация стандартов, контролей и образцов (должна выполняться перед каждым анализом):

- a. Разбавьте реагент для дериватизации с 3,5 мл реагента для разбавления. Тщательно перемешайте на вортексе.

Примечание. Разбавленный реагент для дериватизации необходимо использовать в течение 8 часов после приготовления. Если дополнительные образцы должны быть проанализированы более чем через 8 часов после разбавления, утилизируйте флакон и приготовьте новый реагент для дериватизации.

- b. Промаркируйте одиночные одноразовые стеклянные пробирки для стандартов, контролей и образцов.
- c. Пипеткой внесите 250 мкл стандарта, контроля или образца в стеклянную пробирку с соответствующей маркировкой.
- d. Добавьте 1 мл буфера для анализа в каждую пробирку. Смешайте с помощью вортекса.

е. Добавьте в каждую пробирку по 100 мкл разбавленного реагента для дериватизации. Немедленно перемешивайте каждую пробирку на вортексе после добавления разбавленного реагента до тех пор, пока не исчезнут закрученные линии.

ф. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 10 минут.

г. Дериватизированные стандарты, контроль и образцы готовы к анализу. Перейдите к процедуре анализа, раздел F, шаг 1.

Е. Рабочая схема

Планшет для микротитрования состоит из 12 полосок по 8 лунок, которые можно использовать для теста по отдельности. Стандарты должны запускаться с каждым тестом. Никогда не используйте значения стандартов, которые были определены в ходе ранее проведенного теста.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Станд. 0	Станд. 4	Обр. 2									
B	Станд. 0	Станд. 4	Обр. 2									
C	Станд. 1	Станд. 5	и т.д.									
D	Станд. 1	Станд. 5										
E	Станд. 2	Контр.										
F	Станд. 2	Контр.										
G	Станд. 3	Обр. 1										
H	Станд. 3	Обр. 1										

Станд. 0 – Станд. 5: Дериватизированные стандарты калибровки

Контр.: Дериватизированный контроль

Обр. 1, Обр. 2 и т. д.: Дериватизированные образцы

F. Процедура анализа

1. Добавьте по **50 мкл дериватизированных стандартов, контроля или образцов** (см. Раздел D, Подготовка к анализу) в лунки тест-полосок в соответствии с приведенной рабочей схемой. Рекомендуется анализ в двух или трех параллелях.

2. Добавьте по **50 мкл раствора антител** в отдельные лунки последовательно, используя многоканальную пипетку, ступенчатую или электронную пипетку. Накройте лунки парафильмом или лентой и перемешайте содержимое, круговыми движениями по столешнице в течение 60 секунд. Будьте осторожны – не пролейте содержимое. Инкубируйте полоски в течение **30 минут** при комнатной температуре.

3. Снимите покрытие и последовательно добавьте **50 мкл раствора ферментного конъюгата** в отдельные лунки с помощью многоканальной, ступенчатой или электронной пипетки. Накройте лунки парафильмом или

лентой и перемешайте содержимое круговыми движениями по столешнице в течение 60 секунд. Будьте осторожны – пролейте содержимое. Инкубируйте полоски в течение **60 минут** при комнатной температуре.

4. Снимите покрытие, слейте содержимое лунок в раковину и промокните перевернутый планшет стопкой бумажных полотенец. **Трижды** промойте лунки разбавленным промывочным буфером. Используйте не менее **250 мкл промывочного буфера 1X** для каждой лунки на каждом этапе промывки.

Промокните перевернутый планшет после каждой промывки стопкой бумажных полотенец. После последней промывки проверьте лунки на наличие остатка буфера в лунках и, при необходимости, удалите его с помощью дополнительного этапа промывки.

5. Добавьте **по 150 мкл раствора субстрата (цветного)** в отдельные лунки, последовательно используя многоканальную пипетку, ступенчатую или электронную пипетку. Накройте лунки парафильмом или лентой и перемешайте содержимое круговыми движениями по столешнице в течение 30 секунд. Будьте осторожны – не пролейте содержимое. Инкубируйте полоски в течение **20-30 минут** при комнатной температуре. Не допускайте паодания солнечных лучей на лунки.

6. Добавьте в лунки **по 100 мкл стоп-раствора** в той же последовательности, что и раствор субстрата, используя многоканальную пипетку, ступенчатую или электронную пипетку.

7. Измерьте оптическую плотность при 450 нм с помощью ИФА ридера в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

G. Измерения

Оценка результатов может быть выполнена с использованием коммерческих программ оценки ИФА (4 параметра (предпочтительно) или Logit/Log). Для оценки вручную рассчитайте среднее значение абсорбции для каждого из стандартов. Рассчитайте $\%B/B_0$ для каждого стандарта, разделив среднее значение поглощения для каждого стандарта на среднее значение поглощения нулевого стандарта (стандарт 0). Постройте стандартную кривую, отложив $\%B/B_0$ для каждого стандарта на вертикальной линейной оси (y) в зависимости от соответствующей концентрации глифосата на горизонтальной логарифмической оси (x) на миллиметровой бумаге. Затем $\%B/B_0$ для контроля и образцов даст уровни глифосата в ppb (мкг/кг) путем интерполяции с использованием стандартной кривой. Результаты также можно определить с помощью макроса электронной таблицы, который можно получить в компании Abbraxis или у Вашего поставщика по запросу.

Концентрации образцов определяют, используя стандартную кривую для каждого теста. Образцы, показывающие более низкую концентрацию глифосата, чем стандарт 1 (0,075 ppb), следует сообщать как записывать <0,075 ppb глифосата. Образцы, показывающие более высокую концентрацию, чем стандарт 5 (4,0 ppb), должны быть зарегистрированы как содержащие >4,0 ppb глифосата или должны быть разбавлены с использованием разбавителя/нулевого стандарта (разбавитель образца) и

повторно проанализированы для получения точных результатов. Концентрация положительного контроля должна составлять $0,75 \pm 0,2$ ppb.

Полуколичественные результаты можно получить путем простого сравнения оптической плотности образца с оптической плотностью стандартов. Образцы с более низкой абсорбцией, чем у стандарта, будут иметь концентрации глифосата выше, чем у этого стандарта. Образцы с более высокой абсорбцией, чем у стандарта, будут иметь концентрации глифосата ниже, чем у этого стандарта.

Как и в случае любого аналитического метода (ГХ, ВЭЖХ и т. д.), положительные результаты, которые вносятся в какие-либо официальные документы, должны быть подтверждены альтернативным методом.

Важность определения глифосата

Глифосат, системный гербицид широкого спектра действия, был представлен в 1974 году компанией Monsanto под торговым названием Roundup®. Глифосат (N-(фосфонометил)глицин или 2-[(гидроксидифосфорил)метиламино]уксусная кислота) является самым продаваемым агрохимикатом в мире и продается под десятками торговых наименований разными производителями. Глифосат используется для контроля вегетации многолетних и однолетних растений, широколиственных сорняков, трав, древесных растений и водных сорняков, а также для высушивания зерна для повышения урожайности. Внедрение генетически модифицированных культур, устойчивых к глифосату (например, Roundup Ready®), привело к более широкому использованию глифосата, что позволило фермерам бороться с сорняками, не нанося вреда их посевам. Появление устойчивых к глифосату сорняков также привело к увеличению частоты и объема применения глифосата в сочетании с другими гербицидами. Глифосат стал повсеместным в окружающей среде и продуктах питания. Глифосат может адсорбироваться почвой и хорошо растворяется в воде, что может вызвать загрязнение поверхностных и грунтовых вод стоками, эрозией почвы и вымыванием, особенно после сильных дождей. Долгосрочное воздействие на окружающую среду и здоровье человека вызывает все большую озабоченность. В марте 2015 года Международное агентство по изучению рака Всемирной организации здравоохранения классифицировало глифосат как «вероятно канцерогенный для человека» (категория 2A). Некоторые исследования показывают корреляцию между воздействием гербицидов на основе глифосата и неходжкинской лимфомой у людей, а другие демонстрируют доказательства того, что глифосат вызывает рак у лабораторных животных. В Европейском союзе комбинированный максимальный остаточный уровень (MRL) глифосата и его соответствующих метаболитов в питьевой воде составляет 0,1 нг/мл. В феврале 2016 года Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США объявило, что будет проверять продукты питания США на наличие глифосата.

Анализ Eurofins Abraxis Glyphosate ELISA может быть выполнен примерно за 2 часа и требует всего несколько миллилитров образца.

Технические характеристики

Чувствительность: Расчетный предел обнаружения глифосата ELISA (90% V/B₀) составляет 0,05 ppb (мкг/л). Среднее значение (50% V/B₀) составляет примерно 0,5 ppb. Наиболее точные результаты дают определения ближе к середине калибровочной кривой.

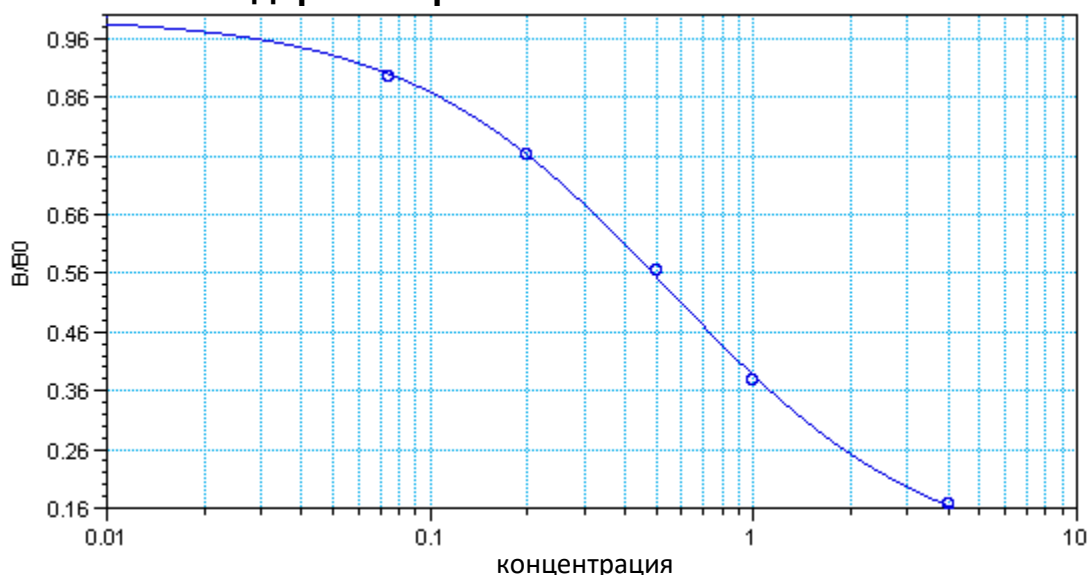
Воспроизводимость: Внутри и между анализами: <17%

Извлечение:	Уровень (ppb)	% извлечения
	0.25	102
	0.50	105
	1.00	103
	2.00	106

Специфичность: Перекрестная реактивность ИФА глифосата для различных родственных аналогов, выраженная как наименьшая определяемая доза (LDD) или 90% V/B₀ и как доза, необходимая для 50% ингибирования (50% V/B₀), выглядит следующим образом:

Соединение	LDD (ppb)	50% (ppb)
Глифосат	0.05	0.5
Глифосин	50	3000
Глюфосинат	2000	70,000
АМРА	35,000	>1,000,000
Глицин	>10,000	>1,000,000

Калибровочная стандартная кривая:



Только для демонстрационных целей. Не для использования в интерпретации образцов.

Roundup® и Roundup Ready® являются зарегистрированными товарными знаками компании Monsanto.

Общая ограниченная гарантия: Eurofins Abraxis гарантирует отсутствие дефектов и качество изготовления продуктов, произведенных Компанией, при использовании в соответствии с применимыми инструкциями в течение периода, не превышающего напечатанную дату истечения срока годности продукта. Eurofins Abraxis не дает никаких других явных или подразумеваемых гарантий. Нет никаких гарантий товарной пригодности или пригодности для конкретной цели.

Поставщик в Беларуси:

ОДО «КомПродСервис»
ул. Филимонова, 25Г, пом. 1000, г. Минск
+375 17 336 50 54
info@komprod.com
www.komprod.com

Техническая поддержка:

support@komprod.com
+375 17 336 50 54



Поставщик 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

