

## **Сакситоксин ИФА**

*5191SAXI [7]05.23*

Конкурентный иммуноферментный анализ для количественного определения сакситоксина в различных матрицах

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

+7 499 911 02 01

info@neo-test.ru

[www.neo-test.ru](http://www.neo-test.ru)

***Техническая поддержка***

support@neo-test.ru

+7 499 444 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

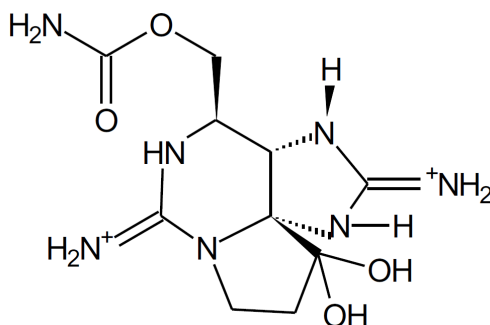
+375 17 336 50 54



## КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ

Тест-набор для ИФА сакситоксина это конкурентный иммуноферментный анализ для скрининга и количественного анализа паралитического яда моллюсков (сакситоксина) в различных матрицах. Основой тест-набора являются кроличьи поликлональные антитела к сакситоксину. С помощью этого ИФА-набора возможно проведение 96 определений. Анализ проб и градуировочных растворов выполняется в параллелях, таким образом, с помощью одного набора может быть осуществлен анализ 40 проб. Тест-набор содержит все реагенты, включая готовые градуировочные растворы, необходимые для проведения анализа. Материалы и реагенты, необходимые для экстрагирования сакситоксина из пробы, не включены в тест-набор.

### 1. ВВЕДЕНИЕ



Химическая структура сакситоксина (STX)

Морские биотоксины, также называемые фитотоксинами или токсинами моллюсков, представляют собой природные соединения, вырабатываемые водорослями и фитопланктоном. В нормальных условиях эти соединения не вызывают никаких проблем. Однако фильтраторы, такие как моллюски, мидии, устрицы и ракообразные, могут потреблять большие количества этих водорослей, когда условия окружающей среды приводят к вредоносному цветению водорослей, также известному как «красные приливы». Высокие концентрации токсинов моллюсков затем накапливаются в организме этих животных, вызывая заболевания среди людей, которые их едят. Существует четыре синдрома, называемых отравлением моллюсками: паралитическое отравление моллюсками (PSP), нейротоксическое отравление моллюсками (NSP), диарейное отравление моллюсками (DSP) и амнестическое отравление моллюсками (ASP). Сообщается, что эти отравления вызывают различные симптомы, включая спазмы желудка, боли в животе, диарею, головные боли, потерю памяти, паралич и в некоторых случаях даже смерть.

ПСП вызывается сакситоксином и его аналогами. DSP в первую очередь вызывается оокадаиновой кислотой (OA) и несколькими аналогами OA, тогда как ASP вызывается домоевой кислотой (DA).

Сакситоксин (STX) — один из самых мощных известных природных токсинов. Он действует как селективный блокатор натриевых каналов и продуцируется некоторыми видами морских динофлагеллят (*Alexandrium* sp., *Gymnodinium* sp., *Pyrodinium* sp.) и цианобактериями (*Anabaena* sp., некоторые виды *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* sp., *Lyngbya* sp., и *Planktothrix* sp.). Термин сакситоксин может также относиться ко всему набору родственных нейротоксинов, продуцируемых этими микроорганизмами, таких как чистый сакситоксин (STX), неосакситоксин (neoSTX), декарбамоилсакситоксин (dcSTX) и гониаутоксины (GTX).

В Европейском Союзе Регламент (ЕС) № 853/2004 предусматривает, что живые двустворчатые моллюски не должны содержать токсины паралитического отравления моллюсками (сакситоксин и его аналоги) в общем количестве (измеренном во всем теле или в любой съедобной части отдельно), превышающем предел 800 мкг на килограмм.

### 2. ПРИНЦИПЫ ИФА НИТРОФУРАНА АНД

Тест-набор для проведения ИФА включает 12 стрипов по 8 лунок, сенсibilизированных антителами к кроличьим иммуноглобулинам. Антитела (кроличьи поликлональные антитела к сакситоксину), сакситоксин, маркированный пероксидазой хрена (ферментно маркированный

конъюгат), градуировочные растворы либо растворы проб вносятся в лунки планшета. Во время инкубации кроличьи антитела к сакситоксину связываются с иммобилизованными антителами захвата в лунках планшета, одновременно с этим сакситоксин, присутствующий в пробе либо градуировочном растворе, конкурируя с ферментно маркированным сакситоксином, связывается с антителами к сакситоксину (конкурентный ИФА). После 30-минутной инкубации несвязанные реагенты удаляются на стадии промывки

Количество связанного ферментно маркированного сакситоксина визуализируется внесением смеси субстрат/хромоген. Бесцветный хромоген окрашивает фермент (пероксидазу хрена) в голубой цвет. Большое количество сакситоксина в пробе или градуировочном растворе вызывает более слабое окрашивание. Реакция окрашивания останавливается внесением серной кислоты. В кислой среде голубой цвет изменяется на желтый. Интенсивность окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм, она обратно пропорциональна концентрации сакситоксина в пробе.

### 3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для данного набора ИФА для определения сакситоксина используют специфическое антитело, полученное путем иммунизации кроликов конъюгатом с белком домовой кислоты.

Перекрестная реактивность:

Сакситоксин	100%
Декарбамоилсакситоксин	19,2%
Гониаутоксины, GTX 2/3	5,6%
GTX 5	26,2%
Декарбамоил GTX 2/3	2,5%
Неосакситоксин	1,4%
Декарбамоилнеосакситоксин	0,5%
Гониаутоксины GTX 1/4	< 0,1%
C 1/2	0,2%

Перекрестную реактивность определяют в буферной системе. Полученные значения могут отличаться от значений, полученных для реальных образцов из-за влияния эффектов матрицы.

Тест не позволяет отличить аналиты от перекрестно-реактивных веществ.

Предел обнаружения (LOD) определяется в оптимальных условиях. Критерии CUT-OFF требуют критического рассмотрения.

Матрица	LOD (ppb)
Мидии	10
Устрицы	5

Если установлено, что образец не соответствует требованиям, результаты должны быть проверены путем повторного анализа образца с использованием подтверждающего метода.

### 4. УСЛОВИЯ ОБРАЩЕНИЯ И ХРАНЕНИЕ

- Сакситоксин подвергается деградации при воздействии света или тепла.
- Набор реагентов должен храниться при температуре от +2°C до +8°C в темном месте. Не замораживать.
- Неиспользованные лунки планшета должны храниться закрытыми в оригинальной упаковке.
- После истечения срока годности невозможно гарантировать приемлемое качество.
- Восстанавливать или разводить компоненты набора необходимо непосредственно перед использованием, но после того, как компоненты согрелись до комнатной температуры.
- Необходимо избегать любого прямого воздействия света на раствор субстрата/хромогена.
- Окрашивание хромогена является признаком порчи реагентов. Реагент должен быть утилизирован.
- Стоп-реагент содержит серную кислоту. Следует избегать контакта с кожей.
- Разведение реагентов либо их замена по истечении срока годности тест-набора может повлиять на чувствительность тест-набора.

- Оптическая плотность нулевого градуировочного раствора менее 0,8 опт. единиц может означать порчу реагентов

- Избегайте попадания пузырьков воздуха в лунки при проведении анализа. Перед считыванием результатов на фотометре убедитесь в отсутствии пузырьков в лунках, т.к. это может повлиять на результат считывания оптической плотности.

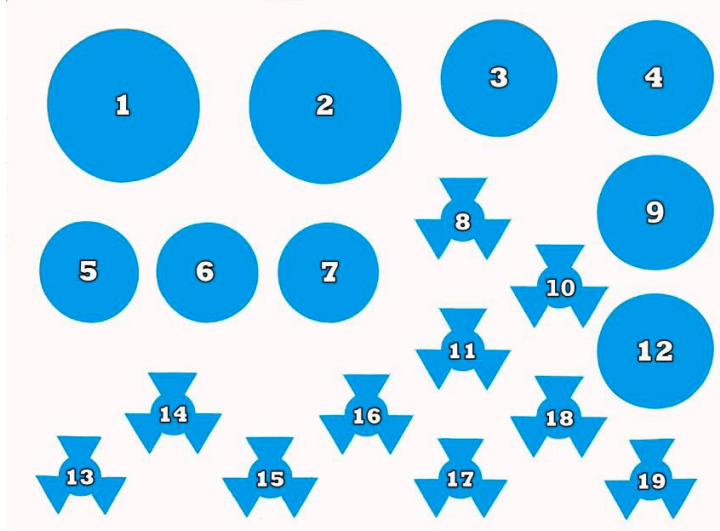
- Сакситоксин распадается при воздействии света или тепла.

## 5. СОСТАВ НАБОРА

Инструкция

Один запечатанный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок),

Позиции реагентов в наборе. Для приготовления реагентов смотрите раздел 8.



1. **Буфер для разведения** (30 мл, 10х концентрат)
2. **Промывочный буфер** (10 мл, 20х концентрат)
3. **Раствор субстрата** (12 мл, готов к использованию)
4. **Стоп-раствор** (6 мл, готов к использованию)
5. **Конъюгат** (лиофилизат, синяя крышка)
6. не используется
7. не используется
8. не используется
9. не используется
10. **Антитела** (100х концентрат, желтая крышка)
11. не используется
12. не используется
13. **Нулевой стандарт, раствор** (2 мл, готов к использованию)
14. **Стандартный раствор 1** (1 мл, готов к использованию) 0.0125 нг/мл
15. **Стандартный раствор 2** (1 мл, готов к использованию) 0.025 нг/мл
16. **Стандартный раствор 3** (1 мл, готов к использованию) 0.05 нг/мл
17. **Стандартный раствор 4** (1 мл, готов к использованию) 0.1 нг/мл
18. **Стандартный раствор 5** (1 мл, готов к использованию) 0.2 нг/мл
19. **Стандартный раствор 6** (1 мл, готов к использованию) 0.3 нг/мл

## 6. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- весы
- перчатки
- вытяжной шкаф
- центрифуга (4000 g)
- гомогенизатор (вортекс, миксер)
- автоматическое устройство для промывки планшетов либо многоканальный пипет-дозатор

100-300 мкл

- шейкер для микротитровальных планшетов
- микропланшетный фотометр с фильтром 450 нм
- пипет-дозаторы
- ацетат натрия

## 7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Стоп-реагент содержит серную кислоту концентрации 0,5 М. Не допускать контакта реагента с кожей.

- Избегать контакта проб с кожей и слизистыми.
- Не пипетировать ртом.
- Не допускается есть, пить, курить, хранить или готовить пищу или применять косметику в пределах обозначенной рабочей области.
- Тетраметилбензидин является токсичным при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании. Поэтому будьте внимательны при работе с субстратом.
- Не используйте компоненты тест-набора после истечения их срока годности и не перемешивайте компоненты из разных партий.
- Каждая лунка используется как оптическая кювета. Поэтому не прикасайтесь к поверхности лунок, не допускайте их повреждения и загрязнения.
- Все компоненты должны быть полностью растворены перед применением. Обращайте особое внимание на субстрат, который имеет тенденцию к кристаллизации при температуре +4°C.
- Оптимальные результаты могут быть получены при строгом соблюдении протокола анализа.
- Точность и воспроизводимость результатов анализа зависит от точности пипетирования и равномерного промывания лунок.

## 8. ПРОБОПОДГОТОВКА

### Мидии, устрицы, гребешки

- Гомогенизировать 1 г мяса моллюска
- Добавить 5 мл натрий-ацетатного буфера \*
- Перемешать на вортексе в течение 1 минуты
- Центрифугировать в режиме 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20-25°C)
- Отобрать супернатант
- Развести супернатант буфером для разведения проб в пропорции 1:50
- В тесте используют 50 мкл на лунку

\* натрий-ацетатный буфер концентрации 0,2М: Растворить 3,28 г безводного ацетата натрия в 200 мл дистиллированной воды (рН 5).

## 9. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием тест-системы доведите температуру всех реагентов до комнатной (20 - 25°C). Неиспользуемые реагенты должны быть немедленно помещены в оригинальную упаковку на хранение при +2°C—+8°C. Для длительного хранения см. раздел 4 (Условия обращения и хранения).

### Микротитровальный планшет

Не требуемые стрипы должны храниться с осушителем в плотно закрытом оригинальном пакете при температуре 2 - 8 °C.

### Буфер для промывки

Буфер для промывки поставляется в концентрации 20х. Раствор должен готовиться непосредственно перед использованием. Для каждого стрипа необходимо 40 мл разведенного буфера для промывки (2 мл концентрированного буфера + 38 мл дистиллированной воды).

### Раствор субстрата

Раствор субстрата (готовый к применению) осаждается при температуре +4°C. Бутылочку с ним необходимо довести до комнатной температуры (в темноте) и перемешать содержимое перед внесением в лунки.

### Буфер для разведения (концентрации 10х)

Буфер для разведения поставляется в концентрации 10х. Перед разведением (10 мл концентрата буфера + 90 мл дистиллированной воды) буфер необходимо довести до комнатной температуры и тщательно перемешать. Раствор буфера может кристаллизоваться при температуре +4°C, поэтому его необходимо тщательно перемешать перед разведением дистиллированной водой. Разведенный буфер может храниться в холодильнике (+2°C - +8°C) до окончания срока годности, указанного на этикетке.

### Конъюгат

Ферментно маркированный конъюгат сакситоксина поставляется в лиофилизированном виде. Восстановите флакон лиофилизированного конъюгата с 4 мл буфера для разведения, тщательно перемешайте и храните в темноте до использования. Восстановленный состав можно хранить в холодильнике (от 2°C до 8°C) не более одной недели. Для более длительного хранения сделайте аликвоты и заморозьте их при - 20°C.

### Антитела к сакситоксину

Антитела к сакситоксину поставляются в концентрированном виде. Центрифугированием (в течение 1 минуты при 1000g) обеспечивают стекание концентрата на дно бутылочки. Концентрат разводят буфером для разведения (напр. 5 мкл концентрата антител + 495 мкл буфера для разведения). На 2 стрипа по 8 лунок требуется 400 мкл раствора антител. Не требуемый концентрат антител должен сразу же быть помещен в темное холодное место (+2°C - +8°C).

### Буфер ацетата натрия (0,2 М)

3,28 г безводного ацетата натрия в 200 мл воды (pH 5)

## **10. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

### Протокол промывки

При ИФА между каждым этапом иммунологической инкубации должны удаляться несвязанные компоненты. Это достигается посредством соответствующей процедуры промывки. Очевидно, что каждая процедура промывания должна проводиться с большой тщательностью для гарантирования хороших результатов повторяемости и воспроизводимости.

В принципе, промывка вручную или с помощью автоматического вошера может осуществляться следующим образом:

### Промывка вручную

1. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета
2. Все лунки заполняют буфером для промывания до края лунки (300 мкл)
3. Этот процесс промывки (этапы 1 и 2) повторяют трижды.
4. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета
5. После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.

6. Не допускайте высыхания лунок перед внесением следующего реагента.

### Промывание с помощью автоматического вошера

При использовании автоматического вошера проверьте, чтобы из всех лунок жидкость удалялась полностью, чтобы раствор для промывания тщательно распределялся, заполняя до края каждую лунку во время каждого цикла промывания. Вошер должен быть запрограммирован на выполнение трех циклов промывки.

### Протокол анализа

1. Подготовьте пробы в соответствии с разделом 8 (Подготовка проб) и подготовьте реагенты в соответствии с разделом 9 (Подготовка реагентов). Микротитровальный планшет готов к использованию.

2. Вносят 100 мкл нулевого градуировочного раствора в двух повторностях (лунки H1, H2).

Вносят 50 мкл нулевого градуировочного раствора в двух повторностях (лунки A1, A2).

Вносят 50 мкл каждого градуировочного раствора в двух повторностях (лунки от B1,2 до G1,2, т.е. 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 и 0.3 нг/мл).

Вносят по 50 мкл каждой пробы в двух повторностях (40 проб, 80 лунок).

3. Вносят по 25 мкл конъюгата во все лунки за исключением Н1 и Н2.
4. Вносят по 25 мкл раствора антител во все лунки за исключением Н1 и Н2.
5. Планшет запечатывают и аккуратными круговыми движениями в течение 1 мин. перемешивают его содержимое.
6. Планшет инкубируют в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре (20°C - 25°C).
7. Удаляют раствор из микротитровального планшета и промывают 3 раза буфером для промывания.
8. Вносят по 100 мкл раствора субстрата во все лунки. Тщательно перемешивают и инкубируют планшет в течение 15 минут при комнатной температуре (20°C - 25°C).
9. Вносят по 100 мкл стоп-реагента во все лунки.
10. Сразу же измеряют оптическую плотность при 450 нм.

## 11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

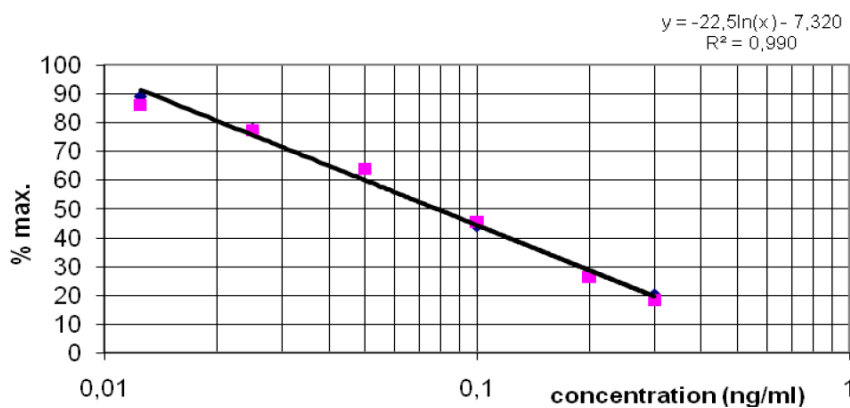
Вычитите среднее значение оптической плотности (O.D.) для лунок Н1 и Н2 из отдельных значений O.D. для лунок, содержащих градуировочные растворы и пробы.

Значения O.D. для шести градуировочных растворов и проб (среднее значение двух повторностей) делят на среднее значение O.D. нулевого градуировочного раствора (лунки А1 и А2) и умножают на 100. Таким образом, нулевой градуировочный раствор принимается за 100% (максимальная оптическая плотность) и другие значения O.D. приводятся в процентах от максимальной оптической плотности.

$$\frac{\text{ОП стандарта (или образца)}}{\text{ОП стандарта 0 нг/мл}} \times 100\% = \% \text{ от максимальной оптической плотности}$$

### Градуировочная кривая:

Значения (% от максимальной оптической плотности), вычисленные для градуировочных растворов, наносятся на график (по оси Y) напротив эквивалентной концентрации сакситоксина (нг/мл) по логарифмической оси X. Градуировочная кривая должна быть практически линейна в диапазоне 0,0125 – 0,3 нг/мл.



**Пример градуировочной кривой**

Количество сакситоксина в пробе выражается как эквивалент сакситоксина. Эквивалент сакситоксина в пробе (нг/мл), соответствующий % от максимальной оптической плотности каждого экстракта, может быть получен по градуировочной кривой.

Значение концентрации сакситоксина, полученное по градуировочной кривой, должно быть умножено на 300 для получения значения концентрации сакситоксина в пробе.



## **12. ЛИТЕРАТУРА**

М. Dubois, L. Demoulin, C. Charlier, G. Singh, S.B. Godefroy, K. Campbell, C.T. Elliott, and Ph. Delahaut (2010). Development of ELISA's for detecting domoic acid, okadaic acid, and saxitoxin and their applicability for the detection of marine toxins in samples collected in Belgium. *Food Additives Contam.* 27(6): 859-868.

European Commission 2004. Commission regulation 853/2004/EC of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Off. J. Eur. Comm.* L226: 22-82.

К, Campbell, А-С. Huet, С. Charlier, С. Higgins, Р. Delahaut, and С.Т. Elliott (2009). Comparison of ELISA and SPR biosensor technology for the detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Chromatogr.В* 877: 4079-4089.

## **13. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА**

Для заказа тест-системы используйте артикул 5191SAXI.

## **14. ИСТОРИЯ ИЗМЕНЕНИЙ**

Изменения по тексту и дополнение п. 3.