



РОССИЙСКИЕ
ИННОВАЦИОННЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ
КОНТРОЛЯ
БЕЗОПАСНОСТИ
ПИЩЕВОЙ
ПРОДУКЦИИ

СВИДЕТЕЛЬСТВО
№ 01.00225/205-43-15
от 06 ноября 2015 г.



www.dtsbiotech.com

Набор для
иммуноферментного
анализа

ТЕСТСИП®

***T-2 токсин
25-500 мкг/кг***

ИНСТРУКЦИЯ
по применению

Совместное производство
ООО «ИЛ Тест-Пушино» и
ООО «ДТС Биотех»



Инструкция по применению
набора для ИФА ТЕСТСИП®

Содержание

1. Введение.....	3
2. Область применения.....	3
3. Принцип работы набора для ИФА.....	4
4. Меры предосторожности	6
5. Материалы, входящие в комплект набора для ИФА.....	7
6. Материалы, не входящие в комплект набора для ИФА.....	8
7. Рабочие протоколы	11
8. Расчет и интерпретация результатов	17
9. Дополнительная информация	19

1. Введение

Уважаемый пользователь!

Благодарим Вас за выбор Набора для иммуноферментного анализа (ИФА) ТЕСТСИП. Прежде чем приступить к работе, пожалуйста, внимательно изучите это руководство. Помимо рабочих протоколов, здесь перечислены необходимые меры предосторожности и правила техники безопасности, выполнение которых сведет к минимуму риск повреждений оборудования и травм персонала.

2. Область применения

Набор для ИФА ТЕСТСИП предназначен для количественного определения содержания Т-2 токсина в зерновых, орехах, кормах для животных, а также готовых пищевых продуктах методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа. Предел обнаружения составляет 25 мкг/кг. Диапазон количественного анализа составляет от 25 до 500 мкг/кг. Набор для ИФА прошел метрологическую

аттестацию для кукурузы, кукурузной муки, пшеницы, ячменя, показана высокая сходимость результатов анализа с референсным методом ВЭЖХ.

3. Принцип работы набора для ИФА

Работа набор для ИФА ТЕСТСИП основана на принципе прямого конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA). Т-2 токсин экстрагируется из размолотого образца 70% метанолом. Производится смешивание экстракта и конъюгата Т-2 токсин - Peroксидаза хрена, полученную смесь вносят в лунки планшета с иммобилизованными моноклональными антителами. Свободный Т-2 токсин из образца или стандартов и конъюгированный с ферментной меткой Т-2 токсин конкурируют за ограниченное количество антител. После промывки, в ходе которой из лунок удаляется не

связавшийся с антителами Т-2 токсин, в систему добавляют хромогенный субстрат, который позволяет визуализировать результаты реакции антиген-антитело. Интенсивность цветовой реакции обратно пропорциональна концентрации Т-2 токсина в образце (или стандарте). Затем добавляется стоп-раствор, останавливающий цветовую реакцию и, одновременно, усиливающий окраску. Далее с помощью планшетного фотометра регистрируется поглощение при 450 нм (при желании можно также использовать дифференциальный фильтр на 630 нм). По результатам для стандартов с известным содержанием Т-2 токсина строится калибровочная кривая, с помощью которой можно определить содержание Т-2 токсина в анализируемых образцах.

4. Меры предосторожности

1. Храните реагенты при температуре 2-8°C. Не используйте тест-набор после истечения срока годности.
2. Соблюдайте время инкубации, указанное в протоколе. При несоблюдении этого правила возможно получение недостоверных результатов.
3. Метанол является сильным ядом. Не допускайте контакта с кожей и глазами. Манипуляции с метанолом следует выполнять в перчатках!
4. Метанол огнеопасен! Соблюдайте меры предосторожности при хранении и использовании.
5. Стоп-раствор содержит кислоту! Не допускайте контакта с кожей и глазами. В случае попадания немедленно промойте

- пораженный участок большим количеством воды!
6. Т-2 токсин вызывает расстройство системы пищеварения. Соблюдайте меры предосторожности при манипуляциях с образцами, экстрактами и стандартами для калибровки!
7. Утилизируйте использованные реагенты в соответствии с законодательством.
- 5. Материалы, входящие в комплект набора для ИФА**
- 96-луночный разборный планшет (12 стрипов по 8 лунок) с иммобилизованными моноклональными антителами (запаян в фольгированный пакет)
 - 96-луночный разборный планшет (12 стрипов по 8 лунок) для смешивания (в прозрачном пакете, лунки с синей каемкой).

- 5 флаконов с градуировочными растворами Т-2 токсина (соответствуют: 0, 25, 100, 250, 500 мкг/кг)
 - 1 флакон с концентратом конъюгата Т-2 токсин - Пероксидаза хрена
 - Флакон объемом 25 мл с раствором для конъюгата Т-2 токсин - Пероксидаза хрена (Зелёная крышка)
 - Флакон объемом 15 мл с субстратом (Синяя крышка)
 - Флакон объемом 15 мл со стоп-раствором (Красная крышка)
- 6. Материалы, не входящие в комплект набора для ИФА**
- *Экстракция:*
 - Мельница для размола образцов, либо другое оборудование для размола.
 - Блендер со стеклянным сосудом или лабораторный встряхиватель для колб.

- Весы до 400 г.
- Мерный цилиндр до 100 мл.
- Колбы емкостью не менее 200 мл
- Фильтровальная бумага «Синяя лента» или аналогичная
- Сито с размером ячейки 20 меш.
- Метанол
- Дистиллированная или деионизованная вода
- Воронка с фильтром
- *Анализ:*
- Дозатор пипеточный восьмиканальный с варьируемым объемом, номинальный объем дозы 300 мкл.
- Дозатор пипеточный одноканальный с варьируемым объемом, номинальный объем дозы 100 мкл.

- Дозатор пипеточный одноканальный с варьируемым объемом, номинальный объем дозы 1000 мкл.
- Лабораторный таймер.
- Промыватель планшетов (необязательно) или пластиковая промывалка.
- Планшетный фотометр с фильтром на 450 нм (дополнительно с фильтром на 630 нм).
- 3 Ванночки для восьмиканальной пипетки.
- Наконечники для автоматических пипеток соответствующих объемов.
- Фильтровальная бумага или салфетки.
- Дистиллированная или деионизованная вода.

7. Рабочие протоколы

Экстракция

Протокол 1:

1. Отберите репрезентативный образец и измельчите его с использованием соответствующего оборудования так, чтобы 75% образца проходило через сито с ячейкой 20 меш. Тщательно гомогенизируйте полученный образец.
2. Отберите 20 грамм размолотого образца в чистый сосуд для блендера.
3. Добавьте 100 мл смеси метанол: вода = 70:30 (Соблюдайте соотношение масса образца: объем экстрагента = 1:5).
4. Перемешивайте на блендере не менее 3 минут с высокой скоростью.
5. Дайте осесть взвеси и профильтруйте экстракт через фильтровальную бумагу «Синяя лента».

Протокол 2:

1. Отберите репрезентативный образец и измельчите его с использованием соответствующего оборудования так, чтобы 75% образца проходило через сито с ячейкой 20 меш. Тщательно гомогенизируйте полученный образец.
2. Отберите 20 грамм размолотого образца в чистую колбу.
3. Добавьте 100 мл смеси метанол:вода = 70:30 (Соблюдайте соотношение масса образца:объем экстрагента = 1:5).
4. Перемешивайте на встряхивателе не менее 40 минут.
5. Дайте осесть взвеси и профильтруйте экстракт через фильтровальную бумагу «Синяя лента».

Примечание 1: Экстракт образца должен иметь рН в диапазоне 6-8. При необходимости доведите

pH экстракта с помощью соляной кислоты или гидроксида натрия.

Примечание 2: Протокол №1 имеет меньшую точность по сравнению с протоколом №2.

Примечание 3: Вы можете использовать и другие протоколы экстракции, если показано, что они позволяют получить сопоставимые результаты.

Анализ

Примечание: Все реагенты и компоненты тест-системы перед проведением исследования должны достичь комнатной температуры (20 - 27°C). Для проведения исследования рекомендуется использовать 8-канальный дозатор. Не следует использовать более 6 стрипов в одном исследовании.

Перед проведением анализа разведите конъюгат в 100 раз раствором для конъюгата из флакона с

зеленой крышкой. Например: 20 мкл конъюгата + 1980 мкл раствора.

Протокол исследования:

- 1) Запишите схему расположения градуировочных растворов и образцов в прилагаемую таблицу.
- 2) Установите необходимое количество стрипов для смешивания (с синей каемкой) в держатель. Для каждого градуировочного раствора или образца требуется одна лунка.
- 3) Установите такое же количество стрипов с иммобилизованными антителами в держатель. Неиспользованные стрипы незамедлительно верните в фольгированный пакет, запаяйте (заклейте липкой лентой) и уберите пакет в холодильник.
- 4) Отмерьте необходимый объем конъюгата из расчета 2 мл на стрип и налейте в отдельную емкость (ванночку) для конъюгата.

Восьмиканальным дозатором внесите по 200 мкл конъюгата в каждую лунку стрипов для смешивания.

5) Используя одноканальный дозатор, внесите по 100 мкл градуировочных растворов или образцов в соответствующие лунки стрипов для смешивания, в которых уже находится 200 мкл конъюгата. Используйте индивидуальные наконечники для каждого градуировочного раствора или образца.

6) Используя восьмиканальный дозатор (новые наконечники для каждого стрипа), аккуратно перемешайте содержимое стрипа для смешивания (пипетируя вверх и вниз три раза) и немедленно перенесите 100 мкл полученной смеси в стрип с иммобилизованными антителами. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 15 минут.

Примечание: Не используйте шейкер, так как встряхивание планшета может привести к перекрестной контаминации

7) По завершении инкубации промойте планшет 5 раз дистиллированной или деионизованной водой с помощью автоматического промывателя планшет или восьмиканального дозатора или пластиковой промывалки.

8) После промывки переверните планшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге, так чтобы в лунках не осталось жидкости.
Примечание: следите за тем, чтобы стрипы не выпали из держателя!

9) Отмерьте необходимый объем субстрата из расчета 1 мл на стрип и налейте в отдельную емкость (ванночку) для субстрата. Внесите по 100 мкл субстрата в каждую лунку промытого планшета.

- 10) Инкубируйте при комнатной температуре 5 минут.
- 11) Отмерьте необходимый объем стоп-раствора из расчета 1 мл на стрип и налейте в отдельную емкость (ванночку) для стоп-раствора. Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку планшета. Цвет должен измениться с синего на желтый. Избегайте образования пузырьков!
- 12) Зарегистрируйте поглощение при 450 нм в спектрофотометре (при желании можно использовать дифференциальный фильтр 630 нм).

8. Расчет и интерпретация результатов

Построение калибровочной кривой и расчет концентраций

Для построения калибровочной кривой и расчета концентрации Т-2 токсина в анализируемых образцах можно воспользоваться прилагающимся шаблоном в формате Microsoft

Excel, или программным обеспечением сторонних производителей (например, встроенное программное обеспечение спектрофотометра).

Расчет результатов с помощью шаблона

Внесите в соответствующие значения таблицы значения поглощения для стандартов и анализируемых образцов. Программа автоматически построит калибровочную кривую и рассчитает концентрацию Т-2 токсина в анализируемых образцах.

Интерпретация результатов

Если по результатам анализа содержание Т-2 токсина не превышает 25 мкг/кг, в протоколе испытаний следует указать «менее предела количественного определения (25 мкг/кг).

9. Дополнительная информация

Срок годности компонентов набора указан на упаковке. Если вы обнаружили изменение цвета хромогенного субстрата с прозрачного на голубой, не используйте этот реагент и свяжитесь с производителем.

Компоненты набора хранятся при температуре 2-8°C.

Техническая поддержка:

142290, Московская область, г. Пущино,

ул. Грузовая, д.1г, офис 2

Тел. (495) 226 21 33

info@dtsbiotech.com



ИННИМС

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ

РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ

МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ

119361 Москва, Озёрная ул., д. 46

E-mail: analyt-vm@vniims.ru

Тел. (495) 437 9419

Факс: (495) 437 5666

СВИДЕТЕЛЬСТВО № 01.00225/205-43-15

ОБ АТТЕСТАЦИИ МЕТОДИКИ ИЗМЕРЕНИЙ

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВОЙ ДОЛИ

МИКОТОКСИНОВ В ПРОБАХ ЗЕРНА, ПРОДУКТОВ

ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ И КОРМОВ МЕТОДОМ ПРЯМОГО

КОНКУРЕНТНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-НАБОРОВ «ТЕСТСИП»

Методика измерений массовой доли микотоксинов в пробах зерна, продуктов его переработки и кормов методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа с использованием тест-наборов «ТЕСТСИП» (количество страниц – 15, 2015 г.), разработанная Обществом с ограниченной ответственностью «ИЛ Тест-Пущино» (ООО «ИЛ Тест-Пущино») (142290, Российская Федерация, Московская обл., г. Пущино, ул. Грузовая, д. 1г), аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563–2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002.

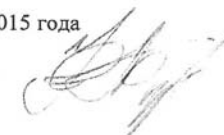
Аттестация осуществлена по результатам теоретических и экспериментальных исследований методики измерений.

В результате аттестации установлено, что методика измерений соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает основными метрологическими характеристиками, приведенными на обороте настоящего свидетельства.

При реализации методики в лаборатории обеспечивают контроль стабильности результатов анализа на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения промежуточной прецизионности и показателя правильности.

Дата выдачи 6 ноября 2015 года

И.о. директора



Ф.В. Булыгин