



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®

Зеараленон
40-1000 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	10
8. Расчет и интерпретация результатов	17
9. Дополнительная информация	19

www.dtsbiotech.com

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 Зеараленона в зерновых, орехах, кормах для животных, а также готовых пищевых продуктах методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа. Предел обнаружения составляет 30 мкг/кг. Диапазон количественного анализа составляет от 40 до 1000 мкг/кг. Набор прошел метрологическую аттестацию для кукурузы, кукурузной муки, риса, пшеницы, ячменя, показана

высокая сходимость результатов анализа с референсным методом ВЭЖХ.

3. Принцип работы набора для ИФА

Работа набора для ИФА ТЕСТСИП основана на принципе прямого конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA). Зеараленон экстрагируется из размолотого образца 70% метанолом. Производится смешивание экстракта и конъюгата Зеараленон-Пероксидаза хрена, полученную смесь вносят в лунки планшета с иммобилизованными моноклональными антителами. Свободный зеараленон из образца или стандартов и конъюгированный с ферментной меткой зеараленон конкурируют за ограниченное количество антител. После промывки, в ходе которой из лунок удаляется не связавшиеся с антителами зеараленон, в систему добавляют хромогенный субстрат, который позволяет визуализировать результаты реакции антиген-антитело.

Интенсивность цветовой реакции обратно пропорциональна концентрации зеараленона 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 зеараленона строится калибровочная кривая, с помощью которой можно определить содержание зеараленона в анализируемых образцах.

4. Меры предосторожности

1. Храните реагенты при температуре 2-8°C. Не используйте набор для ИФА 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. Зеараленон обладает анаболическим и эстрогенным действием. 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 модульный планшет (12 стрипов по 8 лунок) с иммобилизованными моноклональными антителами (запаян в фольгированный пакет)
- 96-луночный модульный планшет (12 стрипов по 8 лунок) для смешивания (в прозрачном пакете, лунки с синей каемкой).
- 5 флаконов со стандартами Зеараленона (диапазон концентраций: 0, 40, 100, 300, 1000 мкг/кг)

- 1 флакон с концентратом конъюгата Зеараленон-Пероксидаза хрена
- Флакон объемом 25 мл с раствором для конъюгата Зеараленон-Пероксидаза хрена (Зелёная крышка)
- Флакон объемом 15 мл с хромогенным 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 125 мл
- Фильтровальная бумага «Синяя лента» или аналогичная
- Сито с размером ячейки 20 меш.
- Метанол
- Дистиллированная или деионизованная вода
- Воронка с фильтром

- *Анализ:*
- Восьмиканальная пипетка с рабочим объемом 20 – 200 мкл.
- Одноканальная пипетка с рабочим объемом 20 – 200 мкл.
- Одноканальная пипетка с рабочим объемом 200 – 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» или аналогичную.
6. Полученный экстракт разведите в смеси метанол: вода = 70:30 в 5 раз, т.е. к 1 объёму экстракта добавьте 4 объёма смеси, полученный образец используйте в анализе.

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» или аналогичную.
6. Полученный экстракт разведите в смеси метанол: вода = 70:30 в 5 раз, т.е. к 1 объёму экстракта добавьте 4 объёма смеси, полученный образец используйте в анализе.

Примечание 1: Экстракт образца должен иметь рН в диапазоне 6-8. При необходимости доведите рН 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 набора перед проведением исследования должны достичь комнатной температуры (20 - 27°C). Для проведения исследования рекомендуется использовать 8-канальную пипетку. Не следует использовать более 6 стрипов в одном исследовании.

Перед проведением анализа разведите конъюгат в 10 раз раствором для конъюгата из флакона с зеленой крышкой. Например: 20мкл конъюгата + 1980мкл раствора.

Протокол исследования:

1) Запишите схему расположения стандартов и образцов в прилагаемую таблицу.

- 2) Установите необходимое количество стрипов для смешивания (с синей каемкой) в держатель. Для каждого стандарта 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 ванночку для конъюгата. Восьмиканальной пипеткой внесите по 200 мкл конъюгата в каждую лунку стрипов для смешивания.
- 5) Используя одноканальную пипетку, внесите по 100 мкл стандартов или образцов в соответствующие лунки стрипов для смешивания, в которых уже находится 200 мкл конъюгата. Используйте индивидуальные

наконечники для каждого стандарта или образца.

- 6) Используя восьмиканальную пипетку (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 10 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 или восьмиканальной пипетки 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 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 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 зеараленона в анализируемых образцах можно воспользоваться 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 зеараленона в анализируемых образцах.

Интерпретация результатов

Если по результатам анализа содержание зеараленона не превышает 40 мкг/кг, в протоколе испытаний следует указать «менее предела количественного определения (40 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

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ

РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



ВНИИМС

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