Общество с ограниченной ответственностью
Научно-производственное объединение «Иммунотэкс»

ИП1686 НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А МЕТОДОМ ИФА

ИНСТРУКЦИЯ

355021, Россия, г. Ставрополь, ул. Доваторцев, 177г, стр. 1.
Телефон/факс: +7(8652) 28-34-60, e-mail: sales@immunotex.ru

Иммунотэкс

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ, УКАЗАННЫХ НА КОМПОНЕНТАХ НАБОРА..... 3
2. ПРИНЦИП ТЕСТА И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА..... 4
3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 4
4. СОСТАВ НАБОРА..... 6
5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ЕГО СОСТАВ 6
6. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ 7
7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ 8
8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 9
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА..... 10
10. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА 13
11. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ 15
12. КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА..... 16
13. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ В РАБОТЕ НАБОРА И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ. 17
14. ПРИМЕЧАНИЕ 20

1. РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ, УКАЗАННЫХ НА КОМПОНЕНТАХ НАБОРА.

- дата изготовления.

- годен до.

- изготовитель.

- номер серии.

- каталожный номер.

- температурный диапазон хранения.

2. ПРИНЦИП ТЕСТА И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор основан на конкурентном методе ИФА. Он позволяет определить охратоксин А в таких образцах, как крупы (рисовая, кукурузная, пшено и пр.) и корм.

В ходе реакции охратоксин А в образцах или стандартах конкурирует с охратоксином А на твёрдой фазе за центры связывания антител к охратоксину А. Затем в каждую лунку планшета добавляется конъюгат с пероксидазой хрена, а также ТМБ для ферментативной реакции. Существует обратная зависимость между значениями оптической плотности образцов и концентрацией охратоксина А. Концентрацию охратоксина А в образцах можно рассчитать с помощью стандартной кривой.

- не для использования в клинической лабораторной диагностике.
- внимательно прочитайте инструкцию до использования набора.

3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Анализируемые образцы: крупы (рисовая, кукурузная, пшено и пр.), корм.

Чувствительность: 1 мкг/кг.

Специфичность: данный набор отличается высокой специфичностью обнаружения охратоксина А. Перекрёстной реактивности или интерференции между охратоксином А и другими видами охратоксинов не наблюдалось.

Стабильность: стабильность набора определяется степенью потери активности. Для данного набора степень потери активности составляет менее 5% на момент истечения срока годности при соблюдении условий хранения. Для минимизации влияния на качество анализа операционные процедуры и условия в лаборатории, в частности, температура, влажность воздуха, температура инкубации должны строго контролироваться. Кроме того, рекомендуется, чтобы один анализ от начала и до конца проводил один и тот же специалист.

Степень извлечения:

- крупы (81-103%);
- корм (74-102%).

Количество тестов: 96.

4. СОСТАВ НАБОРА

№ п/п	Наименование реагента	Коли-чество	Объём
1.	96-луночный планшет с сорбированным охратоксином А.	1 шт.	-
2.	Стандартные растворы с концентрацией охратоксина А:* - 0 мкг/кг; - 1 мкг/кг; - 3 мкг/кг; - 9 мкг/кг; - 27 мкг/кг; - 81 мкг/кг.	 1 шт. 1 шт. 1 шт. 1 шт. 1 шт. 1 шт.	 1 мл 1 мл 1 мл 1 мл 1 мл 1 мл
3.	Конъюгат с пероксидазой хрена.	1 шт.	11 мл
4.	Рабочий раствор антител.	1 шт.	5,5 мл
5.	Субстрат А.	1 шт.	6 мл
6.	Субстрат В.	1 шт.	6 мл
7.	Стоп-реагент.	1 шт.	6 мл
8.	Промывающий буфер, 20-кратный концентрат.	1 шт.	40 мл
9.	Плёнка для заклейки планшета.	4 шт.	-
10.	Зип-пакет (запасной).	1 шт.	-
11.	Трафарет.	1 шт.	-
12.	Инструкция.	1 шт.	-

* - концентрации считать условными в пересчете на сухое вещество.

5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ЕГО СОСТАВ

Оборудование и материалы: микропланшетный ридер, принтер, весы, гомогенизатор, шейкер, вортекс, центрифу-

га, холодильник, высокоточные дозаторы (одно- и многоканальные) с переменным объёмом дозирования, мерные цилиндры, пробирки, фильтровальная бумага.

Реагенты: метиловый спирт концентрированный, $NaHCO_3$, деионизированная или дистиллированная вода.

- допускается использование других типов посуды, оборудования и материалов с аналогичными функциональными свойствами.

6. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

6.1. Отобрать необходимое количество стрипов планшета с сорбированным охратоксином А, хранящихся при температуре минус 20 °С.

- все неиспользованные стрипы планшета как можно скорее поместить в запасной зип-пакет (с расположенным внутри влагопоглотителем) и хранить далее при температуре 2-8 °С.

6.2. Реагенты, входящие в состав набора, стрипы планшета и анализируемые образцы перед проведением исследования довести до комнатной температуры (25 °С).

6.3. Заранее включить микропланшетный ридер (чтобы прибор прогрелся) и настроить параметры считывания.

- все используемое оборудование и материалы должны быть чистыми;
- деионизированная или дистиллированная вода не должна иметь признаки контаминации;
- дозаторы должны быть снабжены сменными наконечниками во избежание перекрёстной контаминации в ходе эксперимента.

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

7.1. **Приготовление 70% раствора метилового спирта.**

Разбавить концентрированный метиловый спирт деионизированной или дистиллированной водой в соотношении 7:3 соответственно.

7.2. **Приготовление 0,1 М раствора $NaHCO_3$.**

Растворить 4,2 г $NaHCO_3$ в деионизированной или дистиллированной воде, доводя объём до 500 мл. Тщательно перемешать.

7.3. **Приготовление рабочего раствора промывающего буфера.**

В мерный цилиндр отлить необходимое количество промывающего буфера (20-кратного концентрата). В случае наличия в растворе кристаллов, осторожно перемешать его при комнатной температуре до тех пор, пока кри-

сталлы полностью не растворятся. Для приготовления 800 мл рабочего раствора промывающего буфера необходимо разбавить 40 мл промывающего буфера (20-кратного концентрата) 760 мл деионизированной или дистиллированной воды.

8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

8.1. Подготовка круп (рисовой, кукурузной, пшена и пр.).

8.1.1. Измельчить крупу до однородной массы (гомогената).

8.1.2. Взвесить 2 г гомогената и поместить его в центрифужную пробирку.

8.1.3. Добавить в пробирку 10 мл 70% раствора метилового спирта (п. 7.1.).

8.1.4. Перемешать на вортексе 5 минут.

8.1.5. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре.

8.1.6. Отобрать 1 мл надосадочной жидкости и добавить к ней 1 мл 0,1 М раствора $NaHCO_3$ (п. 7.2.). Тщательно перемешать.

8.1.7. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образца - 10.

8.2. Подготовка корма.

8.2.1. Измельчить корм до однородной массы (гомогената).

8.2.2. Взвесить 2 г гомогената и поместить его в центрифужную пробирку.

8.2.3. Добавить в пробирку 20 мл 70% раствора метилового спирта (п. 7.1.).

8.2.4. Перемешать на вортексе 5 минут.

8.2.5. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре.

8.2.6. Отобрать 1 мл надосадочной жидкости и добавить к ней 1 мл 0,1 М раствора $NaHCO_3$ (п. 7.2.). Тщательно перемешать.

8.2.7. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образца - 20.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. **Нумерация.**

Пронумеровать анализируемые образцы по порядку. Составить схему расположения стандартов и анализируемых образов на трафарете, входящем в состав набора.

Стандарты и образцы рекомендуется тестировать в

дублях для повышения достоверности.

9.2. **Добавление реагентов.**

В лунки планшета внести по 50 мкл стандартов и образцов (в соответствии со схемой), добавить по 50 мкл рабочего раствора антител в каждую лунку. Заклеить планшет плёнкой. Аккуратно шейкировать планшет в течение 5 секунд, затем инкубировать его в течение 30 минут при 37 °С **в темноте**.

9.3. Осторожно снять плёнку. Удалить жидкость из лунок планшета путём стряхивания.

9.4. **Промывка.**

Немедленно добавить во все лунки планшета по 350 мкл рабочего раствора промывающего буфера (п. 7.3.) и оставить на 30 секунд, после чего удалить жидкость путём стряхивания. **Процедуру промывки провести всего 5 раз.**

9.5. После окончания последней промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевёрнутым планшетом по фильтровальной бумаге. Если в лунках остались пузырьки, удалить их, используя сменные наконечники.

9.6. **Добавление конъюгата.**

Добавить 100 мкл конъюгата с пероксидазой хрена в каждую лунку. Заклеить планшет плёнкой. Инкубировать планшет в течение 30 минут при 37 °С **в темноте.**

9.7. **Промывка.**

Повторить п. 9.3.-9.5.

9.8. **Ферментативная реакция.**

Добавить по 50 мкл субстрата А, а затем по 50 мкл субстрата В в каждую лунку. Аккуратно шейкировать планшет в течение 5 секунд, затем инкубировать его в течение 15 минут при 37 °С **в темноте**.

Примечание: если голубой цвет лунок слишком бледный, можно продлить время инкубации.

9.9. **Остановка реакции.**

Добавить по 50 мкл стоп-реагента в каждую лунку. Осторожно и тщательно шейкировать планшет.

9.10. **Измерение оптической плотности (ОП).**

Измерить значение ОП для каждой лунки при 450 нм с помощью микропланшетного ридера (по возможности, рекомендуется проводить измерение ОП относительно длины волны сравнения - 630 нм). Время от внесения стоп-реагента до измерения ОП не должно превышать 10 минут.

- после проведения анализа, оставшиеся реагенты необходимо хранить при температуре 2-8 °С **плотно** закрытыми, во избежание испарения или микробной контаминации.

10. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

10.1. Рассчитать средние значения оптической плотности стандартов и исследуемых образцов, полученные по 2 параллельным лункам в результате двух параллельных измерений.

10.2. Оптическую плотность каждой лунки сравнить с нулевым стандартом (значение которого принимается за 100%), определив процент поглощения по формуле:

$$A = B_i / B_0 * 100, \text{ где}$$

A *- значение относительной оптической плотности, выраженное в процентах, от оптической плотности нулевого стандарта, % поглощения;*

B_i *- среднее значение оптической плотности каждого из стандартных растворов охратоксина А или исследуемого образца;*

B_0 *- среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.*

10.3. **Построение калибровочной кривой.**

По величинам значений относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов (п.

10.2.), и соответствующим им значениям концентрации охратоксина А в мкг/кг (0; 1; 3; 9; 27; 81) построить калибровочную кривую в полулогарифмической системе координат (например, рис. 1).

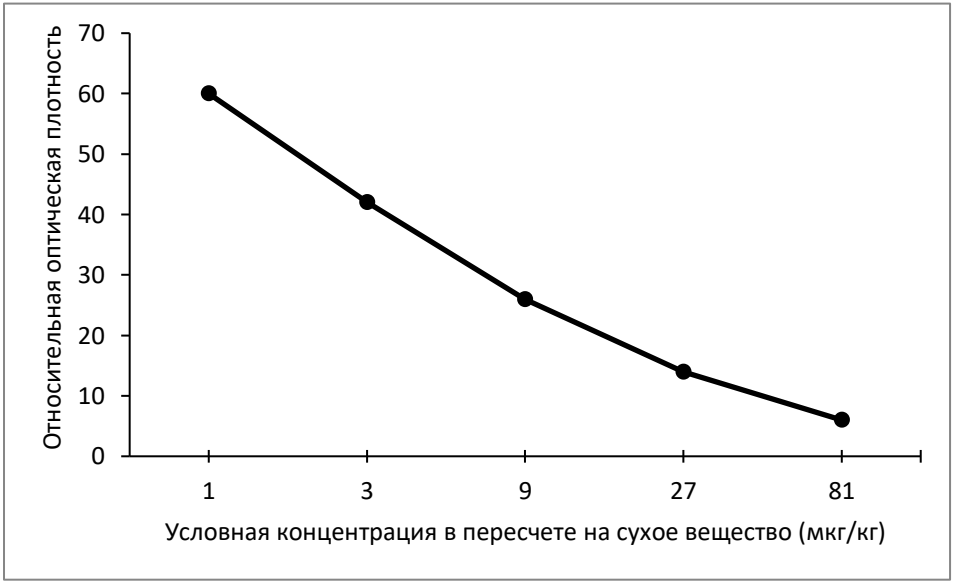

Рис. 1. Пример калибровочной кривой.

10.4. **Нахождение концентрации охратоксина А в анализируемых образцах.**

Концентрацию охратоксина А (х) в мкг/кг считать по калибровочной кривой, после чего обязательно умножить её на фактор разведения (указан для каждого типа образцов при его подготовке).

11. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ

11.1. Невскрытые компоненты набора (за исключением планшета) хранить при температуре 2-8 °С в течение 1 года с даты изготовления. Избегать замораживания!

11.2. Планшет хранить отдельно от остальных компонентов при температуре минус 20 °С в течение 1 года с даты изготовления.

11.3. Открытый набор (включая неиспользованные стрипы планшета) хранить при температуре 2-8 °С, защищая от света и влажности. Срок хранения открытого набора - 3 месяца.

11.4. Дата изготовления и срок годности набора указаны на упаковке.

12. КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА

1	ПОДГОТОВИТЬ	РЕАГЕНТЫ, ОБРАЗЦЫ И СТАНДАРТЫ.
2	ВНЕСТИ	ПО 50 МКЛ СТАНДАРТОВ И ОБРАЗЦОВ В ЛУНКИ ПЛАНШЕТА (В ДУБЛЯХ).
3	ДОБАВИТЬ	ПО 50 МКЛ РАБОЧЕГО РАСТВОРА АНТИТЕЛ.
4	ШЕЙКИРОВАТЬ	5 СЕКУНД.
5	ИНКУБИРОВАТЬ	30 МИНУТ, ПРИ 37 °С В ТЕМНОТЕ.
6	ПРОМЫТЬ	РАБОЧИМ РАСТВОРОМ ПРОМЫВАЮЩЕГО БУФЕРА (ПО 350 МКЛ В КАЖДУЮ ЛУНКУ), ОСТАВИТЬ НА 30 СЕКУНД, СТРЯХНУТЬ. ВСЮ ПРОЦЕДУРУ ПОВТОРИТЬ 5 РАЗ.
7	УДАЛИТЬ	ОСТАТКИ ВЛАГИ.
8	ДОБАВИТЬ	ПО 100 МКЛ КОНЪЮГАТА.
9	ИНКУБИРОВАТЬ	30 МИНУТ, ПРИ 37 °С В ТЕМНОТЕ.
10	ПОВТОРИТЬ	ШАГИ 6 И 7.
11	ВНЕСТИ	ПО 50 МКЛ СУБСТРАТА А, ЗАТЕМ ПО 50 МКЛ СУБСТРАТА В.
12	ШЕЙКИРОВАТЬ	5 СЕКУНД.
13	ИНКУБИРОВАТЬ	15 МИНУТ, ПРИ 37 °С В ТЕМНОТЕ.
14	ДОБАВИТЬ	ПО 50 МКЛ СТОП-РЕАГЕНТА.
15	ИЗМЕРИТЬ	ЗНАЧЕНИЯ ОП ПРИ 450 НМ.

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

13. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ В РАБОТЕ НАБОРА И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ.

Проблема	Возможная причина	Корректирующее действие
Неправильная стандартная кривая.	Неправильное построение стандартной кривой.	Обеспечьте точность при выполнении операций во время разведения.
	Плохое качество выполнения процедуры промывки. Недостаточно тщательное удаление остатка влаги после процедуры промывки.	Выполняйте процессы промывки и аспирации лунок в точном соответствии с инструкцией.
	Погрешности в дозировании.	Используйте в работе дозаторы, прошедшие периодическую поверку. Проведите калибровку дозаторов.
Низкая точность.	Недостаточная промывка лунок планшета.	Выполняйте промывку в точном соответствии с инструкцией.
	Недостаточное смешивание и аспирация реагентов.	Обеспечьте адекватные смешивание и аспирацию реагентов.
	Повторное использование наконечников для дозаторов, ёмкостей для реагентов и плёнок для заклейки планшетов.	Используйте наконечники, ёмкости для реагентов и плёнки для заклейки планшетов однократно.

	Погрешности в дозировании.	Используйте в работе дозаторы, прошедшие периодическую поверку. Проведите калибровку дозаторов.
Низкие значения оптических плотностей.	Нарушения в дозировке при внесении реагентов.	Используйте в работе дозаторы, прошедшие периодическую поверку. Проведите калибровку дозаторов.
	Несоблюдение времени инкубации.	Тщательно следите за временем инкубации планшета.
	Несоблюдение температуры инкубации.	Тщательно следите за температурой инкубации планшета.
	Проблемы с конъюгатом и/или субстратами А и В.	Смешайте конъюгат и субстраты, должно немедленно произойти изменение цвета.
	Не был добавлен стоп-реагент.	Не нарушайте процедуру проведения анализа.
	Было превышено время от внесения стоп-реагента до измерения ОП.	Не нарушайте процедуру проведения анализа.
Неправильные значения.	Неправильное хранение образцов.	Соблюдайте сроки и температуру хранения образцов, используйте свежие образцы.
	Неправильный сбор и подготовка образцов к анализу.	Четко следуйте указаниям инструкции по применению.

	Низкая концентрация охратоксина А в образцах.	Используйте новые образцы и повторите анализ.

14. ПРИМЕЧАНИЕ

ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ СЛЕДУЕТ УЧИТЫВАТЬ, ЧТО:

• если не довести реагенты перед анализом до комнатной температуры - значения оптической плотности будут понижены. Аналогичный результат будет при температуре в помещении ниже 25 °С;

• нельзя допускать высыхания лунок во время процедуры промывки, так как это неизбежно приведет к получению плохой стандартной кривой и плохой воспроизводимости. После промывки незамедлительно переходите к следующему шагу;

• необходимо тщательно промывать планшет. Качество выполнения процедуры промывки может сильно повлиять на качество работы набора;

• нужно заклеивать планшет специальной пленкой. Избегать нахождения реагентов на ярком свету;

• недопустимо использовать реагенты с истекшим сроком годности, реагенты из разных серий и реагенты других производителей;

• субстрат А и субстрат В должны быть забракованы, если они приобрели голубую окраску;

• если значение ОП стандарта с концентрацией охратоксина А 0 мкг/кг меньше 0,5 ед. опт. плотн., это указывает на ухудшение качества реагента;

• стоп-реагент является едким! Избегайте его попадания на кожу и в глаза;

• поскольку значения ОП стандартов могут варьироваться в зависимости от условий проведения анализа (например, лаборант, техника пипетирования и промывки, температура), рекомендуется строить стандартную кривую для каждого анализа;

• даже один и тот же лаборант может получить разные результаты в двух отдельных экспериментах. Чтобы получить воспроизводимые результаты, необходимо контролировать работу на каждом этапе анализа;

• если используемый Вами тип образцов не указан в инструкции, необходим предварительный эксперимент для определения обоснованности и возможности применения набора.