

**ИП2005 НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПРОИЗВОДНОГО НИТРОФУРАЗОНА (SEM)
МЕТОДОМ ИФА**

ИНСТРУКЦИЯ



ОГЛАВЛЕНИЕ

1. РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ, УКАЗАННЫХ НА КОМПОНЕНТАХ НАБОРА.....	3
2. ПРИНЦИП ТЕСТА И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА.....	4
3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	4
4. СОСТАВ НАБОРА	5
5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ЕГО СОСТАВ	6
6. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ	7
7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ	7
8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	9
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	13
10. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА	15
11. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ	16
12. КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА.....	17
13. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ В РАБОТЕ НАБОРА И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ	18
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 производное нитрофуразона (SEM) в таких образцах, как молоко, сухое молоко, яйца, яичный порошок, мёд, ткани домашнего скота, рыба, креветки, печень, корм и т.д.

В ходе реакции SEM в образцах или стандартах конкурирует с SEM на твёрдой фазе за центры связывания антител к SEM. 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 SEM. Концентрацию SEM 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: молоко, сухое молоко, яйца, яичный порошок, мёд, ткани домашнего скота, рыба, креветки, печень, корм и т.д.

Режим реакции: при 25 °С, 45 минут - 15 минут.

Нижний предел чувствительности:

- ткани, печень, мёд, молоко, яйца - 0,1 мкг/кг;
- рыба, креветки - 0,15 мкг/кг;
- сухое молоко, корм, яичный порошок - 0,1 мкг/кг.

Кросс-реактивность:

- SEM, производное нитрофуразона (семикарбазид) - 100%;
- AOZ, метаболит фуразолидона (3-амино-2-оксазолидинон) - <0,1%;
- AMOZ, метаболит фуральтадона (3-амино-5-морфолинометил-2-оксазолидинон) - <0,1%;
- AHD, метаболит нитрофурантоина (1-аминогидантоин) - <0,1%.

Степень извлечения:

- ткани, печень, яйца ($90 \pm 15\%$);
- мёд, молоко ($80 \pm 15\%$);
- сухое молоко, яичный порошок, корм ($85 \pm 25\%$).

Количество тестов: 96.

4. СОСТАВ НАБОРА

№ п/п	Наименование реагента	Количество	Объём
1.	96-луночный планшет с сорбированным SEM.	1 шт.	-
2.	Стандартные растворы с концентрацией SEM:*		
	- 0 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 0,05 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 0,15 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 0,45 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 1,35 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 4,05 мкг/кг.	1 шт.	1 мл
3.	Реагент для дериватизации	1 шт.	10 мл
4.	Конъюгат с пероксидазой хрена.	1 шт.	5,5 мл
5.	Рабочий раствор антител.	1 шт.	5,5 мл
6.	Субстрат А.	1 шт.	6 мл
7.	Субстрат В.	1 шт.	6 мл
8.	Стоп-реагент.	1 шт.	6 мл
9.	Промывающий буфер,	1 шт.	40 мл

	20-кратный концентрат.		
10.	Восстанавливающий буфер, 2-кратный концентрат.	1 шт.	50 мл
11.	Плѐнка для заклейки планшета.	4 шт.	-
12.	Зип-пакет (запасной).	1 шт.	-
13.	Трафарет.	1 шт.	-
14.	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, гомогенизатор, вортекс, азотный испаритель, водяная баня, центрифуга, весы, шейкер, холодильник, высокоточные дозаторы (одно- и многоканальные) с переменным объѐмом дозирования, мерные цилиндры, пробирки, фильтровальная бумага.

Реагенты: этилацетат, Н-гексан, гидроксид натрия (NaOH), концентрированная соляная кислота (HCl), гидроортофосфат калия кристаллогидрат ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$), нитропруссид натрия кристаллогидрат ($Na_2Fe(CN)_5(NO) \cdot 2H_2O$), сульфат цинка кристаллогидрат ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), 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 SEM.



- 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 0,36 М раствора $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$ (для образцов молока, сухого молока и яичного порошка).

Растворить 10,7 г $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в деионизированной или дистиллированной воде, доводя объём до 100 мл. Тщательно перемешать.

7.2. Приготовление 1,04 М раствора ZnSO_4 (для образцов молока, сухого молока, яичного порошка).

Растворить 29,8 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ в деионизированной или дистиллированной воде, доводя объём до 100 мл. Тщательно перемешать.

7.3. Приготовление 0,1 М раствора K_2HPO_4 .

Растворить 11,4 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ в деионизированной или дистиллированной воде, доводя объём до 500 мл. Тщательно перемешать.

7.4. Приготовление 1 М раствора HCl.

Разбавить 8,6 мл концентрированной соляной кислоты в деионизированной или дистиллированной воде, доводя объём до 100 мл. Тщательно перемешать.

7.5. Приготовление 1 М раствора NaOH.

Растворить 4 г NaOH в деионизированной или дистиллированной воде, доводя объём до 100 мл. Тщательно перемешать.

7.6. Приготовление рабочего раствора восстанавливающего буфера.

Развести восстанавливающий буфер (2-кратный концентрат) деионизированной или дистиллированной водой в соотношении 1:1 соответственно. Полученный раствор может храниться при температуре 4 °C в течение 1 месяца.

7.7. 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 кристаллы полностью не растворятся.

Развести промывающий буфер (20-кратный концентрат) деионизированной или дистиллированной водой в соотношении 1:19 соответственно.

8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

8.1. Подготовка молока.

8.1.1. Поместить 5 мл молока в центрифужную пробирку.

8.1.2. Добавить в пробирку 250 мкл 0,36 М раствора $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$ (п. 7.1.).

8.1.3. Перемешать на вортексе 30 секунд.

8.1.4. Добавить 250 мкл 1,04 М раствора ZnSO_4 (п. 7.2.).

8.1.5. Перемешать на вортексе 30 секунд.

8.1.6. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут при температуре 15 °С. При отсутствии центрифуги с охлаждением охладите образцы молока до 15 °С перед центрифугированием.

8.1.7. Отобрать 1,1 мл надосадочной жидкости.

8.1.8. Добавить последовательно 4 мл деионизированной или дистиллированной воды, 0,5 мл 1 М раствора HCl (п. 7.4.) и 100 мкл реагента для дериватизации.

8.1.9. Перемешать на вортексе 5 минут.

8.1.10. Инкубировать в течение ночи (около 16 часов) при 37 °С или на водяной бане при 50 °С в течение 3 часов.



- не проводить инкубацию при температуре выше 50°С, так как это может привести к расслоению образца.

8.1.11. Добавить 5 мл 0,1 М раствора K_2HPO_4 (п. 7.3.), 0,4 мл 1 М

раствора NaOH (п. 7.5.) и 5 мл этилацетата.

8.1.12. Перемешать на вортексе в течение 5 минут.

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

8.1.14. Отобрать 2,5 мл жидкости из верхнего слоя в другую пробирку и высушить при температуре 50-60 °С с помощью азотного испарителя или на водяной бане.



п. 8.1.14. проводить в вентилируемом помещении.

8.1.15. Растворить сухой остаток в 1 мл Н-гексана.

8.1.16. Добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.6.).

8.1.17. Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.

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

8.1.19. Удалить верхний слой Н-гексана.

8.1.20. Взять 50 мкл из нижнего слоя для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образца - 2, минимально определяемая концентрация - 0,1 мкг/кг.

8.2. Подготовка сухого молока и яичного порошка.

8.2.1. Взвесить $1 \pm 0,05$ г образца и поместить его в центрифужную пробирку.

8.2.2. Добавить в пробирку: 4 мл деионизированной или дистиллированной воды, 0,5 мл 1 М раствора HCl (п. 7.4.) и 100 мкл реагента для дериватизации.

8.2.3. Перемешать на вортексе 5 минут.

8.2.4. Инкубировать в течение ночи (около 16 часов) при 37 °С или на водяной бане при 50 °С в течение 3 часов.



- не проводить инкубацию при температуре выше 50°С, так как это может привести к расслоению образца.

8.2.5. Добавить 250 мкл 0,36 М раствора $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$ (п. 7.1.).

8.2.6. Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.

8.2.7. Добавить 250 мкл 1,04 М раствора ZnSO_4 (п. 7.2.).

8.2.8. Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.

8.2.9. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут при температуре 15 °С.

8.2.10. Отобрать надосадочную жидкость в другую центрифужную пробирку.

8.2.11. Добавить: 5 мл 0,1 М раствора K_2HPO_4 (п. 7.3.), 0,4 мл 1 М раствора NaOH (п. 7.5.) и 5 мл этилацетата.

8.2.12. Перемешать на вортексе в течение 5 минут.

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

8.2.14. Отобрать 2,5 мл жидкости из верхнего слоя в другую пробирку и высушить при температуре 50-60 °С с помощью азотного испарителя или на водяной бане.

8.2.15. Растворить сухой остаток в 1 мл *n*-гексана.

8.2.16. Добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.6.).

8.2.17. Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.

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

8.2.19. Удалить верхний слой Н-гексана.

8.2.20. Взять 50 мкл из нижнего слоя для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образца - 2, минимально определяемая концентрация - 0,1 мкг/кг.

8.3. Подготовка мёда, тканей домашнего скота, рыбы, креветок, печени, корма, яиц.

8.3.1. Удалить жир из образцов, за исключением мёда, корма и яиц.

8.3.2. Измельчить образцы до однородной массы (гомогената).

8.3.3. Взвесить $1 \pm 0,05$ г гомогенизированного образца в центрифужную пробирку, добавить 4 мл деионизированной или дистиллированной воды, 0,5 мл 1 М раствора HCl (п. 7.4.) и 100 мкл реагента для дериватизации.

8.3.4. Перемешать на вортексе в течение 5 мин.

8.3.5. Инкубировать в течение ночи при 37 °С (около 16 часов) или инкубировать на водяной бане при 50 °С в течение 3 часов.



- не проводить инкубацию при температуре выше 50 °С, так как это может привести к расслоению образца.

8.3.6. Добавить 5 мл 0,1 М раствора K_2HPO_4 (п. 7.3), 0,4 мл 1 М раствора NaOH (п. 7.5) и 5 мл этилацетата.

8.3.7. Перемешать на вортексе в течение 5 мин.

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

8.3.9. Отобрать 2,5 мл жидкости из верхнего слоя в другую пробирку, высушить при 50-60 °С на азотном испарителе или водяной бане.

8.3.10. Растворить сухой остаток в 1 мл Н-гексана.

8.3.11. Добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.6.).

8.3.12. Перемешать на вортексе в течение 30 с.

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

8.3.14. Удалить верхний слой Н-гексана.

8.3.15. Взять 50 мкл раствора из нижнего слоя для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образца - 2, минимально определяемая концентрация - 0,1 мкг/кг, минимально определяемая концентрация для рыбы и креветок - 0,15 мкг/кг.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Нумерация.

Пронумеровать анализируемые образцы по порядку. Составить схему расположения стандартов и анализируемых образцов 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 конъюгата во все лунки,

а затем - по 50 мкл рабочего раствора антител в каждую лунку. Заклеить планшет плёнкой. Аккуратно шейкировать планшет в течение 5 секунд, затем инкубировать его в течение 45 минут при 25 °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 300 мкл рабочего раствора промывающего буфера (п. 7.7.) и оставить на 30 секунд, после чего удалить жидкость путём стряхивания. **Провести процедуру промывки 5 раз**.

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

9.6. 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 25 °С **в темноте**.

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

9.7. Остановка реакции.

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

9.8. 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 SEM или исследуемого образца;

B₀ - 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 SEM в мкг/кг (0; 0,05; 0,15; 0,45;

1,35; 4,05) построить калибровочную кривую в полулогарифмической системе координат (например, рис. 1).

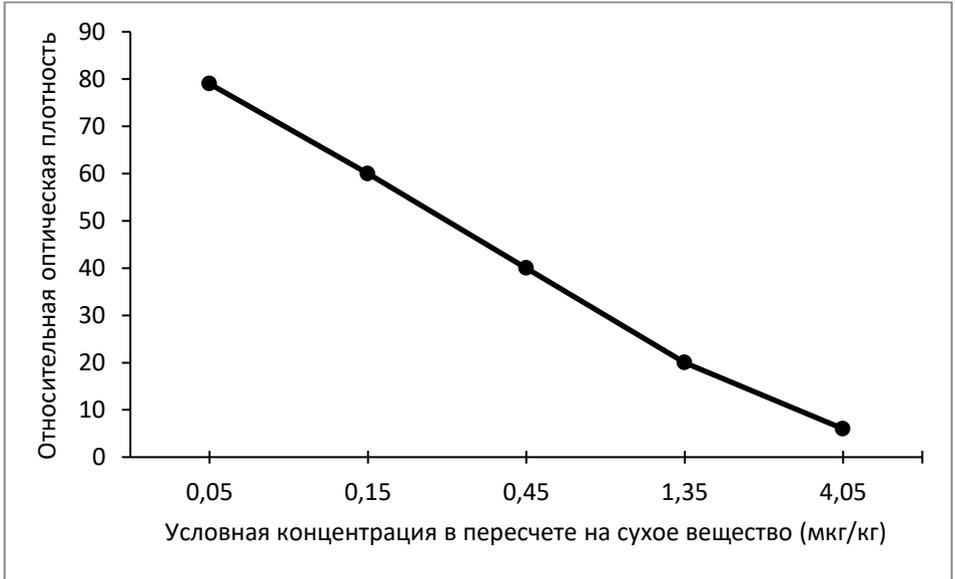


Рис. 1. Пример калибровочной кривой.

10.4. Нахождение концентрации SEM в анализируемых образцах.

Концентрацию SEM (x) 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. Набор хранить при температуре 2-8 °С в течение 1 года с даты изготовления. Избегать замораживания.

11.2. Открытый набор хранить при температуре 2-8 °С, защищая от света и влажности. Срок хранения открытого набора - 1 месяц.

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

12. КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА



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 адекватное 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 SEM 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 плёнкой. Избегать нахождения реагентов на ярком свете;
- 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 SEM 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.