

**ИП3178 НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МЕЛАМИНА 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.....	6
5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ЕГО СОСТАВ.....	7
6. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ	7
7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ	8
8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	9
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	15
10. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА	17
11. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ.....	19
12. КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА.....	20
13. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ В РАБОТЕ НАБОРА И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ.....	21
14. ПРИМЕЧАНИЕ	24

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 меламина в таких образцах, как молоко, сухое молоко, сыворотка, яйца, ткани (включая печень, рыбу, креветки, утку, свинину, курицу), корм и др.

В ходе реакции меламина в образцах или стандартах конкурирует с меламинам на твёрдой фазе за центры связывания антител к меламинам. 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 меламина. Концентрацию меламина 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, сыворотка, яйца, ткани (включая печень, рыбу, креветки, утку, свинину, курицу), корм и т.д.

Чувствительность: 2 мкг/кг.

Специфичность: данный набор отличается высокой специфичностью обнаружения меламина. Перекрёстной реактивно-

сти или интерференции между меламином и другими пищевыми добавками 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:

- молоко, сухое молоко (92-103%);
- ткани (81-97%);
- корм (85-106%);
- яйца (78-98%).

Количество тестов: 96.

4. СОСТАВ НАБОРА

№ п/п	Наименование реагента	Количество	Объём
1.	96-луночный планшет с сорбированным меламинам.	1 шт.	-
2.	Высококонцентрированный стандарт (концентрация 1 000 мкг/кг).*	1 шт.	1 мл
3.	Стандартные растворы с концентрацией меламина:* - 0 мкг/кг; - 2 мкг/кг; - 6 мкг/кг; - 18 мкг/кг; - 54 мкг/кг; - 162 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
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, 20-кратный концентрат.	1 шт.	40 мл
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, весы, азотный испаритель, рН-метр, гомогенизатор, шейкер, вортекс, центрифуга, холодильник, высокоточные дозаторы (одно- и многоканальные) с переменным объёмом дозирования, мерные цилиндры, пробирки, фильтровальная бумага.

Реагенты: ацетонитрил, концентрированная соляная кислота, гидроксид натрия, Н-гексан, метанол, деионизированная или дистиллированная вода.

6. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

6.1. Отобрать необходимое количество стрипов планшета с сорбированным меламином, 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 накопечниками во избежание перекрёстной контаминации в ходе эксперимента.



7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

7.1. Приготовление 1 М раствора соляной кислоты.

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

7.2. Приготовление смеси ацетонитрила с 0,1 М раствором гидроксида натрия (п. 7.3.).

Взять 84 мл ацетонитрила и 16 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия (п. 7.3.). Тщательно перемешать.

7.3. Приготовление 0,1 М раствора гидроксида натрия.

Тщательно растворить 0,4 г гидроксида натрия в деионизированной или дистиллированной воде, доводя объём до 100 мл.

7.4. Приготовление 1 М раствора гидроксида натрия.

Тщательно растворить 4 г гидроксида натрия в деионизированной или дистиллированной воде, доводя объём до 100 мл.

7.5. Приготовление рабочего раствора восстанавливающего буфера.

Разбавить восстанавливающий буфер 2-кратный концентрат деионизированной или дистиллированной водой в соотношении 1:1. Полученный раствор может храниться при температуре 4 °С в течение 1 месяца.

7.6. 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. 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 сыворотки.

8.1.1. Отобрать 0,5 мл сыворотки в центрифужную пробирку объемом 50 мл.

8.1.2. Добавить 2 мл смеси ацетонитрила с 0,1 М раствором гидроксида натрия (п. 7.2.).

8.1.3. Перемешать на вортексе в течение 2 минут.

8.1.4. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут

при комнатной температуре.

8.1.5. Отобрать 1 мл надосадочной жидкости в другую пробирку и высушить при температуре 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

8.1.6. Растворить сухой остаток в 1 мл н-гексана.

8.1.7. Добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).

8.1.8. Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.

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

8.1.10. Удалить верхний слой н-гексана.

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

Примечание: фактор разведения образца - 4.

8.2. Подготовка молока (метод 1).

8.2.1. Взять 0,6 мл молока и поместить его в центрифужную пробирку.

8.2.2. Добавить в пробирку 1 мл ацетонитрила и тщательно перемешать.

8.2.3. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре.

8.2.4. Отобрать 0,1 мл надосадочной жидкости в другую пробирку.

8.2.5. Добавить 0,9 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.) и тщательно перемешать.

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

Примечание: фактор разведения образца - 27.

8.3. Подготовка сухого молока (метод 1).

8.3.1. Взвесить $2 \pm 0,05$ г сухого молока и поместить его в центрифужную пробирку.

8.3.2. Добавить в пробирку 4 мл метанола и тщательно перемешать на вортексе.

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

8.3.4. Отобрать 0,1 мл надосадочной жидкости в другую пробирку.

8.3.5. Добавить 0,9 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.) и тщательно перемешать.

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

Примечание: фактор разведения образца - 20.

8.4. Подготовка молока и сухого молока (метод 2).

8.4.1. Взять 2 мл молока (или 2 г сухого молока) и поместить его в центрифужную пробирку.

8.4.2. Добавить в пробирку 8 мл смеси ацетонитрила с 0,1 М раствором гидроксида натрия (п. 7.2.).

8.4.3. Перемешать на вортексе в течение 2 минут.

8.4.4. Отобрать 4 мл надосадочной жидкости в другую пробирку и высушить при температуре 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

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

8.4.6. Добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).

8.4.7. Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.

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

8.4.9. Удалить верхний слой Н-гексана.

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

Примечание: фактор разведения образца - без разведения.

8.5. Подготовка тканей (включая печень, рыбу, креветки, утку, свинину, курицу).

8.5.1. Измельчить анализируемый образец до однородной массы (гомогената).

8.5.2. Взвесить $2 \pm 0,05$ г гомогената и поместить его в центрифужную пробирку.

8.5.3. Добавить в пробирку 8 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия (п. 7.3.).

8.5.4. Перемешать на вортексе в течение 2 минут.

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

8.5.6. Отобрать 2 мл надосадочной жидкости в другую пробирку и высушить при температуре 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

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

8.5.8. Добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).

8.5.9. Перемешать на вортексе 30 секунд.

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

8.5.11. Удалить верхний слой Н-гексана.

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

Примечание: фактор разведения образца - 2.

8.6. Подготовка корма.

8.6.1. Измельчить анализируемый образец до однородной массы (гомогената).

8.6.2. Взвесить $2 \pm 0,05$ г гомогената и поместить его в центрифужную пробирку.

8.6.3. Добавить в пробирку 2 мл 1 М раствора соляной кислоты (п. 7.1.) и 16 мл деионизированной или дистиллированной воды. Тщательно перемешать.

8.6.4. Перемешать на вортексе 1 минуту.

8.6.5. Перемешать на шейкере 2 минуты.

8.6.6. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 15 минут при комнатной температуре.

8.6.7. Отобрать 10 мл надосадочной жидкости в другую пробирку и, с помощью 1 М раствора гидроксида натрия (п. 7.4.), довести значение pH до 6-8.



- количество 1 М раствора гидроксида натрия, требующееся для доведения рН до указанных значений, может быть разным, но обычно оно составляет 0,5-1 мл.

8.6.8. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 15 минут при комнатной температуре.

8.6.9. Отобрать всю надосадочную жидкость.



- если надосадочная жидкость осталась мутной, следует центрифугировать ее снова, увеличив скорость, либо профильтровать с помощью фильтровальной бумаги.

8.6.10. Развести надосадочную жидкость рабочим раствором восстанавливающего буфера (п. 7.5.) в 10 раз.

8.6.11. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образца - 100.

8.7. Подготовка яиц.

8.7.1. С помощью гомогенизатора **медленно** перемешать образец (яичный белок, яичный желток или цельное яйцо) до получения однородной массы (гомогената).

8.7.2. Взять $2 \pm 0,05$ г гомогената и поместить его в центрифужную пробирку.

8.7.3. Добавить в пробирку 8 мл смеси ацетонитрила с 0,1 М раствором гидроксида натрия (п. 7.2.).

8.7.4. Перемешать на вортексе в течение 2 минут.

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

8.7.6. Отобрать 1 мл надосадочной жидкости в другую пробирку и высушить при температуре 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

8.7.7. Растворить сухой остаток в 1 мл н-гексана.

8.7.8. Добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).

8.7.9. Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.

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

8.7.11. Удалить верхний слой н-гексана.

8.7.12. Жидкость из нижнего слоя развести рабочим раствором восстанавливающего буфера (п. 7.5.) в 4 раза.

8.7.13. Тщательно перемешать в течение 30 секунд.

8.7.14. 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 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 30 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 350 мкл рабочего раствора промывающего буфера (п. 7.6.) 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. 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:

$$A = V_i / V_0 * 100, \text{ где}$$

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

V_i - среднее значение оптической плотности каждого из стандартных растворов меламина или исследуемого образ-

ца;

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 меламина в мкг/кг (0; 2; 6; 18; 54; 162) построить калибровочную кривую в полулогарифмической системе координат (например, рис. 1).

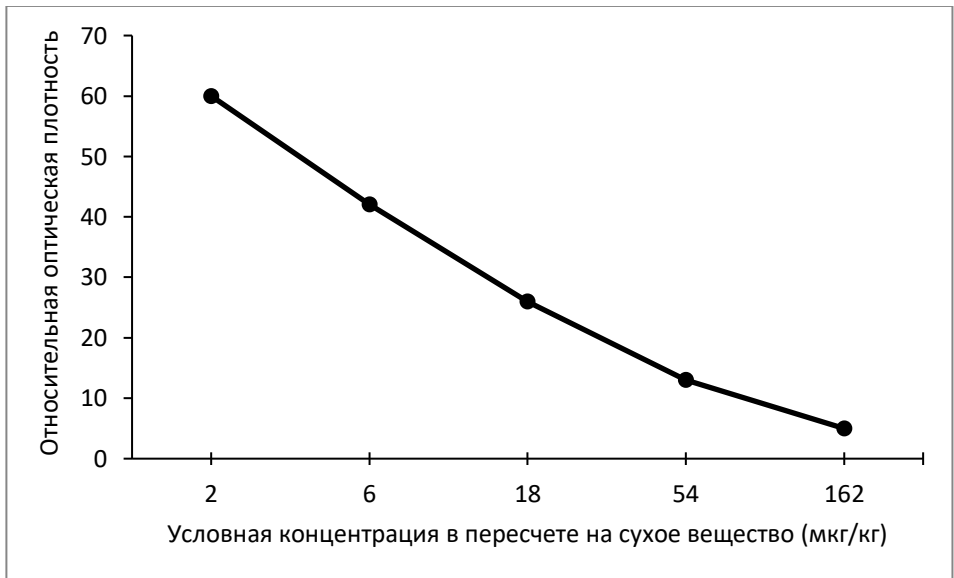


Рис. 1. Пример калибровочной кривой.

10.4. Нахождение концентрации меламина в анализируемых образцах.

Концентрацию меламина (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. 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



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 меламина 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 меламина 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.