

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АФЛАТОКСИНУ В1 У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

### 5120-8, Aflatoxin B1 (In Food)

Каталог. №: 5120-8

Методика від 09-24-2010

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадатти.

Чутливість	5 пг/мл
Відновлення (насичені зразки)	> 80 %
Загальний час	140 хвилин

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

#### ПРИНЦИП ТЕСТУ

Кількісний тест DAI Aflatoxin B1 заснований на принципі твердофазного імуоферментного аналізу. Кон'югат Афлатоксину нанесений на поверхню мікротитраційного планшета. Зразки або стандарти, що містять Афлатоксин В1, і антитіла до Афлатоксину В1 додаються в лунки планшета для мікротитрування. Імобілізований і вільний Афлатоксин В1 конкурують за місця зв'язування. Після однієї години інкубації при кімнатній температурі лунки промиваються розведеним миючим розчином для видалення нез'язаного матеріалу. Додається кон'югат пероксидази до антитіл, і після ще однієї години інкубації, планшет промивається знову. Додають розчин субстрату і інкубують протягом 20 хвилин, в результаті чого відбувається розвиток синього забарвлення. Розвиток кольору інгібується додаванням стоп-розчину і колір змінюється на жовтий. Жовтий колір вимірюється фотометрично при 450 нм. Концентрація Афлатоксину В1 обернено пропорційна інтенсивності кольору зразка.

#### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Повна відповідність наступним принципам належної лабораторної практики (GLP) визначатиме достовірність результатів:

1. Перед початком процедури аналізу доведіть все реагенти до кімнатної температури (20-25 °C).
2. Всі реагенти повинні бути змішані шляхом обережного перевертання або прокручування перед використанням. Не приводити до утворення піни.
3. Після того, як аналіз був заупущений, всі наступні кроки мають бути завершені без перерви і в межах рекомендованих термінів.
4. Закрити кришками всі реагенти відразу ж після використання. Не міняйте пробки на флаконах.
5. Використовуйте окремий одноразовий наконечник для кожного зразка, щоб запобігти перехресного забруднення.
6. Всі зразки і стандарти мають бути запущені одночасно, так, щоб всі умови випробувань були однаковими.
7. Не змішуйте компоненти з різних партій.
8. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
9. Перевірте як точність, так і достовірність лабораторного обладнання, що використовується під час процедури (мікропіпетки, ІФА читач і т.д.).

#### ІНСТРУКЦІЇ З ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ

1. Не паліть, не їжте, не пийте і не піпетуйте ротом в лабораторії.
2. Використовуйте одноразові рукавички при роботі із зразками пацієнтів.
3. Уникайте контакту субстрату і стоп-розчину зі шкірою і слизовою оболонкою (можливе подразнення, опіки або токсична небезпека). У разі контакту, промийте уражену зону з великою кількістю води.
4. Робота та утилізація хімічних продуктів має проводитись відповідно до принципів роботи належної лабораторної практики (GLP).
5. Афлатоксини є дуже токсичними речовинами. Вони можуть викликати рак або незворотні пошкодження генетичних субстанцій. Афлатоксини є токсичними після інгаляції, ковтання

або при контакті зі шкірою. Відповідний захисний одяг слід вдягати.

#### РЕАГЕНТИ

Набір містить реагенти для 96 визначень. Вони повинні зберігатися при температурі 2-8 °C. Дані експірації знаходяться на етикетках пляшок і зовнішній упаковці.

1. Мікропланшет, що складається з 12 смужок по 8 лунок кожна, покритих кон'югатом Афлатоксину.
2. Стандарти Афлатоксину В1 (0, 100, 400, 1000, 4000, 10000 пг/мл): 6 флаконів 0.5 мл кожен в метанолі в якості консерванту. Розвести 1+9 з Розчинником зразка/стандарту. **Примітка: Вищевказані концентрації відносяться до концентрованих стандартів 10x.**
3. Антитіло анти-Афлатоксину В1 (кролик): 6 мл, червоного кольору, готовий до використання.
4. Кон'югат (анти-кролячі-IgG-HRP): 15 мл, червоного кольору, готовий до використання.
5. Розчин субстрату (ТМБ): 15 мл; готовий до використання.
6. Стоп розчин (0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): 15 мл; готовий до використання.
7. Розчин для розведення зразків/стандартів (PBS): 60 мл, готовий до використання.
8. Промивний Розчин (PBS + Твін 20): 60 мл, як 10x концентрату, синього кольору. Розвести 1+9 дистильованою водою. Якщо протягом зберігання в холоді утворилися кристали, концентрат необхідно нагріти до 37 °C протягом 15 хвилин.
9. Дві пластикові плівки для покриття смужок під час інкубації.
10. Пластиковий пакет для зберігання невикористаних смужок.
11. Керівництво по експлуатації.

#### ДОДАТКОВІ ІНСТРУМЕНТИ І РЕАКТИВИ (НЕ ВХОДЯТЬ ДО НАБОРУ)

##### Вимірювальні прилади

- Мікропіпетки на 50, 100, 500 і 1000 мкл
- Мікропланшетний Шейкер
- Планшетний зчитувач (450 нм)
- Ступка, міксер
- Горизонтальний Шейкер або магнітна мішалка
- Центрифуга

##### Реагенти

- Метанол
- Двічі дистильована вода

#### ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

- Відповідну кількість зерна або горіхів подрібнити в ступці або міксері для отримання дрібнодисперсного до середньо-дрібного порошку. Якщо використовується борошно, перший крок може бути пропущений.
- 2 г цього порошку екстрагувати з 10 мл метанолу/двічі дистильованою водою (70/30 v/v). Цю суміш перемішати протягом 30 хвилин на горизонтальному шейкері (120/хв.). Як альтернатива також магнітна мішалка може бути використана.
- Центрифугувати згодом протягом 5 хвилин при 3000g.
- Водну фазу розбавити 1:10 з Розчинником для стандарту/зразка перед аналізом з даним набором.

Як альтернатива також можуть використовуватись імуоафінні колонки для екстракції. При використанні таких колонок повинні бути прийнятні застережливі заходи, щоб Елюат, який додається в набір, не містив більше 5% органічного розчинника (метанол, ацетон). У такому випадку Елюат повинен бути додатково розбавлений розчинником зразка.

#### ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Оскільки стандарти є концентратами 10x, вони повинні бути розведені з Розчинником стандарту/ зразка 1:10 (наприклад, 50 мкл стандарту + 450 мкл розчинника), перш ніж використовувати їх в процедурі аналізу.

#### ПРОЦЕДУРА

1. Підготувати зразки, як описано вище.
2. Внести 100 мкл розведених (1:10) стандартів або підготовлених зразків в двох примірниках у відповідні лунки планшета. Відразу додати 50 мкл антитіл Афлатоксину В1 в кожен лунку.
3. Накрити планшет з пластиковою плівкою і інкубувати протягом 60 хвилин при кімнатній температурі на шейкері (або 90 хвилин без шейкера).
4. Промити пластини три рази таким чином: Піпетувати 300 мкл розведеного миючого розчину в кожен лунку. Видалити вміст лунок, перевернувши планшет і постукати ним по паперовому рушнику. Повторіть описану вище процедуру три рази. Процедура промивання є критичною. Недостатня промивка

- призводить до низької точності і завищеним значенням абсорбції.
5. Піпетувати 100 мкл кон'югату (анти-кролячий-IgG-HRP) у кожную лунку.
  6. Накрити планшет пластиковою плівкою і інкубували протягом 60 хвилин при кімнатній температурі на шейкері (або 90 хвилин без шейкера).
  7. Промити пластини, як зазначено в пункті 4.
  8. Внести 100 мкл розчину субстрату в кожную лунку.
  9. Залишити в темряві (наприклад, шафа або ящик; хромоген є світлочутливим) протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
  10. Зупинити ферментативну реакцію додаванням 100 мкл стоп-розчину (0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) у кожную лунку. Синій колір змінюється на жовтий при додаванні.
  11. Після ретельного перемішування виміряти поглинання при 450 нм (референтна довжина хвилі 620 нм), використовуючи ІФАРідер. Забарвлення залишається стабільним протягом 30 хвилин.



#### ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

#### ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Розрахувати середнє значення оптичної щільності (OD 450 нм) для кожного набору стандартів або зразків.
2. Побудувати стандартну криву, відкладаючи середню оптичну щільність, отриману для кожного стандарту, проти його концентрації в пг/мл на напівлогарифмічному міліметровому папері з оптичною щільністю на вертикальній (Y) вісі і концентрацією на горизонтальній (X) вісі.
3. Використовуючи середнє значення оптичної щільності для кожного зразка, визначити відповідну концентрацію Афлатоксину В1 в пг/мл за стандартною кривою. Залежно від досвіду і/або можливостей комп'ютера, можуть бути використані інші методи обробки даних.
4. Розведені зразки повинні бути надалі перетворені з використанням відповідного коефіцієнта розведення. Коефіцієнт залежить від процедури підготовки зразків, яка використовується.

#### ТИПОВІ СТАНДАРТНІ ЗНАЧЕННЯ

У наступній таблиці наведено приклад для типової калібрувальної кривої. Зв'язування розраховують як відсоток поглинання стандарту 0 пг/мл. Ці значення є лише прикладом і не повинні використовуватись замість стандартної кривої, яка повинна бути виміряна в кожному новому випробуванні.

Афлатоксин В1 (пг/мл)	(% зв'язування 0 нг/мл)
0	100
10	90
40	85
100	70
400	40
1000	25

#### РОБОТА АНАЛІЗУ

##### Чутливість

Чутливість DAI Афлатоксин В1 ELISA складає 5 пг/мл (на основі стандартної кривої).

##### Відновлення

Відновлення насичених зразків складає > 80 %.

##### Внутрішньосерійна Точність

Внутрішньосерійна Точність складає 3%.

##### Перехресна реактивність по відношенню до Афлатоксину В1 (= 100%)

Aflatoxin G <sub>1</sub>	26%
Aflatoxin B <sub>2</sub>	6%
Aflatoxin G <sub>2</sub>	3%
Aflatoxin M <sub>1</sub>	2%
Sterigmatocystin	0.02%