

**НАБІР ІФА**  
**ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ**  
**ФУМОНІЗИНУ В КУКУРУДЗЯНИХ ТА**  
**ХЛІБОПРОДУКТАХ**

**5123-8, Fumonisin**

Каталог. №: 5123-8

Методика від 10-01-2010

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



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

Чутливість	0.5 нг/мл
Відновлення (Насичені зразки)	80%
Загальний час	80 хвилин

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

#### ПРИНЦИП ТЕСТУ

Кількісний тест DAI Фумонізін заснований на принципі твердофазного імуноферментного аналізу. Мікропланшет покритий антитілами до імуноглобулінів миші. Стандарти та зразки відповідно піпетуються разом з кон'югатом фумонізін-пероксидаза і антитілами мишиного-анти-фумонізу у відповідні лунки. Кон'югат конкурує з Фумонізином зразків/стандартів за обмежену кількість сайтів антитіл. Одночасно антитіла анти-фумонізу зв'язуються з анти-мишачими антитілами, нанесеними на планшет. Після однієї години інкубації при кімнатній температурі лунки промиваються розведеним миючим розчином для видалення незв'язаного матеріалу. 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 Фумонізу 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 запущений, 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).

#### 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 анти-мишачим імуноглобуліном.
2. Стандарти Фумонізу (0, 0.5, 2, 5, 10, 25 нг/мл): 6 флаконів 1.0 мл кожен, червоного кольору, готові до використання.
3. Кон'югат (Фумонізін-пероксидаза): 6 мл, червоного кольору, готовий до використання.
4. Антитіло анти-Фумонізін: 6 мл, синього 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 (PBS): 2x60 мл, червоного кольору, 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, і 1000 мкл
- Планшетний зчитувач (450 нм)
- Дробарка
- Центрифуга

##### Реагенти

- Метанол (80 %)

##### ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

- Подрібнити приблизно 50-100 г кукурудзи або зерна в дрібний порошок.
- Екстрагувати 3 г подрібненого зразка з 9 мл 80% метанолу в дистильованій воді на шейкері протягом 15 хвилин.
- Очистити зразок за допомогою центрифугування (10 хв., 2000g) або фільтрації.
- Розвести очищений зразок 1:15 з розріджувачем зразка (наприклад, 100 мкл очищеного зразка + 1.4 мл розріджувача для зразків).

##### 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 кон'югату Фумонізін-пероксидаза в кожен лунку.
3. Накрити планшет з пластиковою плівкою і інкубувати протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
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. Внести 100 мкл розчину субстрату в кожен лунку.
6. Залишити в темряві (наприклад, шафа або ящик; хромоген є світлочутливим) протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
7. Зупинити ферментативну реакцію додаванням 100 мкл стоп-розчину (0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) у кожен лунку. Синій колір змінюється на жовтий при додаванні.
8. Після ретельного перемішування виміряти поглинання при 450 нм (референтна довжина хвилі 620 нм), використовуючи ІФА-рідер. Забарвлення залишається стабільним протягом 30 хвилин.

##### 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 нг/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 Фумонізу в нг/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 (45 для описаної вище Коефіцієнт залежить від процедури пробо підготовки).

#### ТИПОВІ СТАНДАРТНІ ЗНАЧЕННЯ

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

Фумонізин (нг/мл)	(% зв'язування 0 нг/мл)
0	100
0.5	87
2	62
5	38
10	23
25	11

#### РОБОТА АНАЛІЗУ

##### **Чутливість**

Чутливість **DAI Афлатоксин M1 ELISA** складає 0.5 нг/мл (на основі стандартної кривої).

##### **Відновлення**

Відновлення насичених зразків складає 80 % для кукурудзяних продуктів.

##### **Внутрішньосерійна Точність**

Внутрішньосерійна Точність складає 3%.



#### ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул.Черновола, 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)