

НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СТРЕПТОМІЦИНУ В ПРОДУКТАХ ХАРЧУВАННЯ

5128-8, Streptomycin

Каталог. №: 5128-8

Методика від 01-28-2013

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	1 нг/мл
Відновлення (Насичені зразки)	70-120 %
Загальний час	60 хвилин

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

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Кількісний тест DAI Стрептоміцин заснований на принципі твердофазного імуноферментного аналізу. Антитіла до мишачих імуноглобулінів нанесені на поверхні планшета. Зразки або стандарти, що містять Стрептоміцин, і антитіла до стрептоміцину додають в лунки планшета. Стрептоміцин, що міститься в зразках або стандартах, буде зв'язуватися з антитілами, які взаємодіють з анти-мишачими антитілами, нанесеними на планшет. Після 30 хвилин інкубації при кімнатній температурі кон'югат Стрептоміцин-пероксидаза додають в лунки без попередньої стадії промивки, щоб наситити вільні антитіла. Після ще 15 хвилин інкубації при кімнатній температурі лунки промивають розведеним миючим розчином для видалення незв'язаного матеріалу. Додають розчин субстрату і інкубують протягом 15 хвилин, в результаті відбувається розвиток синього кольору. Розвиток кольору інгібується додаванням стоп-розчину, а колір змінюється на жовтий. Жовтий колір вимірюється фотометрично при 450 нм. Концентрація стрептоміцину 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.).

ІНСТРУКЦІЯ 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-мишачими антитілами.
2. Стандарти Стрептоміцину (0, 2, 5, 20, 50, 200 нг/мл): 6 флаконів 1.0 мл кожен, червоного кольору, готові до використання.
3. Антитіло анти-Стрептоміцин (миша): 6 мл, червоного кольору, готовий до використання.
4. Кон'югат (Стрептоміцин-пероксидаза): 6 мл, червоного кольору, готовий до використання.
5. Розчин субстрату (ТМБ): 15 мл; попередньо пофарбований в червоний, готовий до використання.
6. Стоп розчин (0.5 M H₂SO₄): 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, 500 і 1000 мкл
- ELISA зчитувач (450 нм)
- Ultra-Turrah, змішувач, вортекс
- Центрифуга

Реагенти

- Двічі дистильована вода
- 0.01 M PBS (8.77 г/л NaCl, 0.7 г/л NaH₂PO₄ x 2H₂O, 2.9 г/л Na₂HPO₄ x 2H₂O, pH 7.3)
- Екстракційний буфер (2.0 г солі heptanesulfonic натрієвої кислоти, 1.9 г Na₃PO₄ x 12H₂O + 200 мл двічі дистильованої води, довести pH до 2.0 з о-фосфорною кислотою)
- Метанол (100%)
- Potassium hexacyanoferrate (II)-3-гідрат (150 г/л; Carrez I)
- Zincsulfate-7-водний гідрат (300 г/л; Carrez II)

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Мед (Метод скринінга)

- Розчинити 2 г зразка меду в 10 мл двічі дистильованої води.
- Далі розбавити цей екстракт 1: 4 з розріджувачем зразка.
- Коефіцієнт розбавлення зразка: F = 20

Мед (Чутливий метод; C18 SPE)

- Довести 1 г зразка меду до 10 мл екстракційним буфером. очистити зразок шляхом центрифугування (10 хвилин при 3000 g).
- Промити колонку C18 SPE з 2 мл метанолу (100%), а потім 2 мл двічі дистильованої води.
- Протиснути 5 мл зразка повільно через колонку (са. 1 мл/хв.).
- Колонку промити 3 мл двічі дистильованої води.
- Висушити колонку на протязі 2 хвилини на повітрі або в струмі азоту.
- Нанести 1 мл метанолу (100%) на колонку і елюювати зразок (близько 1 мл/хв.).
- Випарувати Елюат в потоці повітря або азоту при 50-60 °C.
- Залишок розчинити в 2 мл розріджувача зразка і протестувати цей зразок з ELISA.
- Коефіцієнт розбавлення зразка: F = 4

Креветки

- Змішати і гомогенізувати зразок у відповідному пристрої (змішувач, Ultra-Turrah).
- Змішати 1 г зразка з 4 мл 0.01 M PBS і перемішати енергійно протягом 30 хвилин.
- Центрифугувати протягом **10 хвилин** при 3000g.
- Розвести супернатант 1:4 в розчиннику для зразка. Цей розчин тепер може бути безпосередньо переміщений в ELISA.
- Коефіцієнт розбавлення зразка: F = 16

М'ясо

- Змішати і гомогенізувати зразок у відповідному пристрої (змішувач, Ultra-Turrah).
- Змішати 1 г зразка з 4 мл 0.01 M PBS і перемішати енергійно протягом 30 хвилин.
- Центрифугувати протягом **10 хвилин** при 3000g.

- Розвести супернатант 1:6 в розчиннику для зразка. Цей розчин тепер може бути безпосередньо переміщений в ELISA.
- Коефіцієнт розбавлення зразка: F = 24

Печінка

- Змішати і гомогенізувати зразок у відповідному пристрої (змішувач, Ultra-Turrax).
- Змішати 1 г зразка з 4 мл 0.01 М PBS і перемішати енергійно протягом 30 хвилин.
- Центрифугувати протягом **10 хвилин** при 3000g.
- Розвести супернатант 1:8 в розчиннику для зразка. Цей розчин тепер може бути безпосередньо переміщений в ELISA.
- Коефіцієнт розбавлення зразка: F = 32

Молоко

- Охолодити зразок до 2-8 °C і центрифугувати згодом протягом **10 хвилин** при 3000g.
- Відокремити верхній шар жиру і розвести молоко 1:8 в розбавленому Розчиннику зразка. Цей розчин тепер може бути безпосередньо переміщений в ELISA.
- Коефіцієнт розбавлення зразка: F = 32

Яйце (sure)

- Гомогенізувати зразок у відповідному пристрої (змішувач, Ultra-Turrax, вортекс).
- Додати 250 мкл Carrez I до 5 мл яєчного зразка, добре перемішати і додати 250 мкл Carrez II згодом.
- Змішайте зразок і центрифугувати при 3000g протягом 10 хвилин.
- Розвести супернатант 1:15 з розріджувачем зразка і протестувати цей зразок з ELISA.
- Коефіцієнт розбавлення зразка: F = 16.5

ПРОЦЕДУРА

1. Підготувати зразки, як описано вище.
2. Внести 100 мкл стандартів або підготовлених зразків в двох примірниках у відповідні лунки планшета. Відразу додати 50 мкл антигену анти-Стрептоміцину в кожну лунку.
3. Накрити планшет з пластиковою плівкою і інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.
4. Без попереднього промивання додати 50 мкл кон'югату Стрептоміцин-пероксидаза в кожну лунку.
5. Накрити планшет з пластиковою плівкою і інкубувати ще 15 хвилин при кімнатній температурі.
6. Промити пластини три рази таким чином: Піпетувати 300 мкл розведеного миючого розчину в кожну лунку. Видалити вміст лунок, перевернувши планшет і постукаючи ним по паперовому рушнику. Повторіть описану вище процедуру три рази. Процедура промивання є критичною. Недостатня промивка призводить до низької точності і завищеним значенням абсорбції.
7. Внести 100 мкл розчину субстрату в кожну лунку.
8. Залишити в темряві (наприклад, шафа або ящик; хромоген є світлочутливим) протягом 15 хвилин при кімнатній температурі.
9. Зупинити ферментативну реакцію додаванням 100 мкл стоп-розчину (0.5M H₂SO₄) у кожну лунку. Синій колір змінюється на жовтий при додаванні.
10. 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 Стрептоміцину 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**. Коефіцієнти перераховані для кожного зразка матриці у підготовці розділу зразка.

Примітка: У зв'язку з екстракцією етилацетатом негативні зразки можуть показати певне пусте значення. В експериментах перевірки це значення було визначено в розмірі близько 1-2

нг/мл. Це значення повинно розглядатися як межа виявлення методу.

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.

Стрептоміцин (нг/мл)	(% зв'язування 0 нг/мл)
0	100
2	73
5	53
20	33
50	14
200	7

РОБОТА АНАЛІЗУ

Чутливість

Чутливість **DAI Афлатоксин M1 ELISA** складає 1 нг/мл (на основі стандартної кривої).

Відновлення

Мед	100 %
креветки	70 %
М'ясо	90 %
Печінка	95 %
молоко	120 %
Яйце	85 %

Внутрішньосерійна Точність

Внутрішньосерійна Точність складає 6 %.

Перехресна реактивність по відношенню до Стрептоміцину (= 100%)

Dihydrostreptomycin	70%
---------------------	-----



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
www.diameb.com