

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АФЛАТОКСИНУ М1 (В МОЛОЦІ І МОЛОЧНИХ ПРОДУКТАХ)

5121-8, Aflatoxin M1 (In Milk and Milk Products)

Каталог. №: 5121-8

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 співпадати.

Чутливість	< 10 пг/мл
Відновлення (Молоко)	102 %
Відновлення (Сири)	60 %
Загальний час	140 хвилин

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

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Кількісний тест DAI Aflatoxin M1 заснований на принципі твердофазного імуоферментного аналізу. Кон'югат Афлатоксину нанесений на поверхню мікротитраційного планшета. Зразки або стандарти, що містять Афлатоксин М1, і антитіла до Афлатоксину М1 додаються в лунки планшета для мікротитрування. Імобілізований і вільний Афлатоксин М1 конкурують за місця зв'язування. Після однієї години інкубації при кімнатній температурі лунки промиваються розведеним миючим розчином для видалення незв'язаного матеріалу. Додається кон'югат пероксидази до антитіла, 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 М1 обернено пропорційна інтенсивності кольору зразка.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

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

1. Перед початком процедури аналізу доведіть все реакенти до кімнатної температури (20-25 °С).
2. Всі реакенти 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 реакенти 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 реакенти 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 реакенти для 96 визначень. Вони повинні зберігатись при температурі 2-8 °С. 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 М1 (0, 100, 500, 1000, 5000, 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 М1 (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 H₂SO₄): 15 мл; готовий до використання.
7. Розчин для розведення зразків/стандартів (PBS): 60 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 °С 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)
- Мірна колба
- Міксер
- Горизонтальний Шейкер або магнітна мішалка
- Центрифуга

Реагенти

- Метанол
- Гексан
- Двічі дистильована вода

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Молоко

- 5 мл зразка свіжого молока (незбиране молоко або знежирене молоко) піпетувати у пробірку і інкубувати протягом 30 хвилин при 4 °С.
- Після цього центрифугувати при 3000g протягом 10 хвилин. 450 мкл прозорої молочної сироватки нижче жирового шару зняти і змішати з 50 мкл метанолу.
- Цей розчин може тепер бути безпосередньо переміщений в ELISA.

Сухе молоко

- 9.1 г сухого знежиреного молока або 12.5 г порошку незбираного молока відповідно відновлюють з двічі дистильованою водою, щоб загальний обсяг доходив до 100 мл, далі нагрівають до приблизно 50 °С і гомогенізують за допомогою магнітної мішалки і, нарешті, обробляють у відповідності з процедурою підготовки зразка для молока.

Сири

- Зразок сиру подрібнюють в змішувачі без додавання рідини.
- Від цього зразка 2 г сиру поєднують з 10 мл суміші гексану, метанолу і двічі дистильованої води (50:30:20) і екстрагують протягом 30 хвилин на горизонтальному шейкері при 125/хвилину.
- Рідину зціджують і центрифугують протягом 5 хвилин при 3000g.
- Нижню водяну фазу метанолу видаляють за допомогою піпетки Пастера, розводять 1:10 буфером для розведення проб, а потім безпосередньо поміщають в ELISA.

Як альтернатива також можуть використовуватись імуоафінні колонки для екстракції. При використанні таких колонок повинні бути прийняті 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 10х, 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 М1 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 кожен 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 кожен 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 H₂SO₄) у кожен лунку. Синій колір змінюється на жовтий при додаванні.
11. 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 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 М1 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 розбавлення для молока (порошок) дорівнює 1, а для сиру 25 згідно з процедурою приготування зразка, як описано вище.

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 М1 (пг/мл)	(% зв'язування 0 нг/мл)
0	100
10	90
50	84
100	78
500	47
1000	34

РОБОТА АНАЛІЗУ

Чутливість

Чутливість DA1 Афлатоксин М1 ELISA складає < 10 пг/мл (на основі стандартної кривої).

Відновлення

Відновлення насичених зразків складає 102 % для молока і 60 % для сиру.

Внутрішньосерійна Точність

Внутрішньосерійна Точність складає 3%.

Перехресна реактивність по відношенню до Афлатоксину М1 (= 100%)

Aflatoxin B ₁	10%
Aflatoxin G ₁	5%
Aflatoxin B ₂	3.5%
Aflatoxin G ₂	2.1%
Sterigmatocystin	0.3%



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