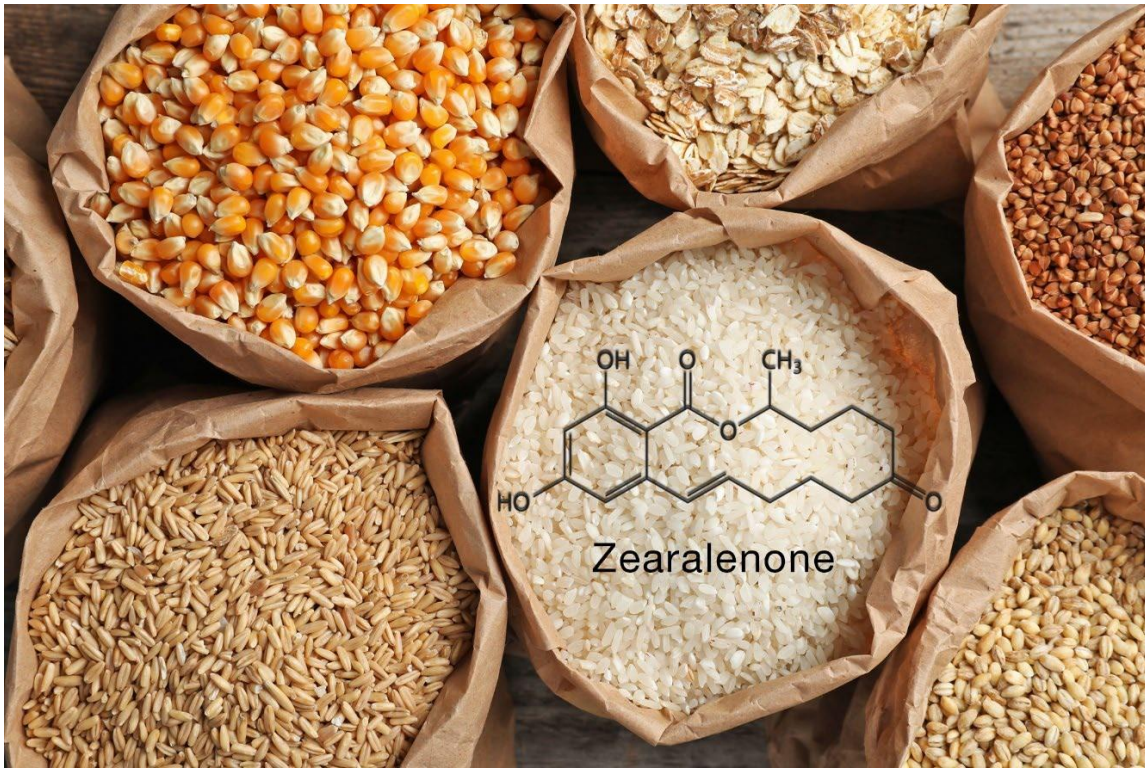




Helica[®] Zearalenone Low Matrix ELISA

Номер по каталогу – KIT5018 (981ZEA01LM-96)





Для количественного определения зеараленона в зерновых культурах, таких как кукуруза, ячмень, овес, пшеница, рис и сорго, а также в кормах для животных.

Содержание

Введение. Зеараленон	3
Назначение.....	3
Принцип метода.....	3
Компоненты набора.....	4
Необходимые инструменты и материалы	4
Условия хранения и срок годности.....	4
Правила применения и утилизации отходов	5
Подготовка образца	6
Процедура анализа	6
Интерпретация результатов	7
Аналитические характеристики	8
Кросс-реактивность.....	9
Техническая поддержка	9



Введение. Зеараленон

Зеараленон (RAL/F-2 микотоксин) это высокотоксичный, нестероидный, эстрогенный метаболит, вырабатываемый несколькими родами грибов, в частности *Gibberella* и *Fusarium*. Известно, что некоторые виды *Fusarium* вырабатывают множество вредных микотоксинов, включая зеараленон, фумонизин и дезоксиниваленон, которые приводят к серьезным последствиям для здоровья домашних животных. Некоторые наиболее известные токсические эффекты включают проблемы с размножением и бесплодие у сельскохозяйственных животных, причем самки свиней наиболее восприимчивы к этим эстрогенным эффектам. Зеараленон часто встречается в зерновых культурах, включая кукурузу, ячмень, овес, пшеницу, рис и сорго. Из-за широкого спектра продуктов, в которых можно обнаружить зеараленон, такой аналитический метод, как ИФА, является необходимым инструментом для быстрого скрининга и выявления образцов, содержащих высокие уровни зеараленона.

Назначение

Наборы Helica® Mycotoxin ELISA компании Hygiene это удобные и экономичные наборы для обнаружения микотоксинов в широком спектре товаров, включая корма для животных, зерно, кукурузу и мочу животных, разработанные для защиты людей и животных от опасных побочных эффектов микотоксинов.

Тест-система Helica Zearalenone Low Matrix ELISA предназначена для количественного определения зеараленона в зерновых культурах, таких как кукуруза, ячмень, овес, пшеница, рис и сорго, а также в кормах для животных методом непрямого иммуноферментного анализа.

Данные, полученные в результате анализа, не должны использоваться для диагностики или лечения заболеваний человека. Тест-системы не валидированы United States Food and Drug Administration или каким-либо другим регулирующим органом США или иного государства для использования в диагностике или лечении человека. Результаты анализа не должны являться единственным основанием для оценки безопасности продуктов перед выпуском потребителям. Полученная информация должна использоваться только в сочетании с обычной программой обеспечения качества пользователя.

Не для клинической диагностики. Пригодно только для исследовательских целей, обеспечения качества и контроля качества при использовании квалифицированным персоналом.

Принцип метода

Набор Helica Zearalenone Low Matrix ELISA включает реагенты для твердофазного иммуноферментного анализа с прямым конкурентным ингибированием. Антитела, специфические к зеараленону, оптимизированные для связывания зеараленона, нанесены на внутреннюю поверхность лунок микропланшета. Токсины извлекают из измельченного образца с помощью 70% метанола и вносят в лунки. Если в экстракте присутствует зеараленон, он связывается с антителом в лунке. После этого жидкость из лунок удаляют, лунки промывают и вносят в них зеараленон, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP), который связывается антителами, свободными от зеараленона образца или стандарта. Затем содержимое лунок снова удаляют, лунки промывают и вносят в них хромогенный субстрат HRP (TMB), который приобретает синий цвет под действием фермента. Интенсивность цвета прямо пропорциональна количеству связанного конъюгата и обратно пропорциональна количеству зеараленона в стандарте или образце. Поэтому по мере увеличения концентрации зеараленона в образце или стандарте интенсивность синего цвета будет уменьшаться. Затем добавляют кислый стоп-раствор, который изменяет цвет хромогена с синего на желтый. С помощью микропланшетного ридера измеряют оптическую плотность раствора в лунке с фильтром поглощения 450 нм (OD450). Оптические плотности образцов и стандартов из набора сравнивают, результат определяют путем интерполяции по стандартной кривой.



Компоненты набора

Упаковка, кол-во	Компонент	Описание
Пакет, 1 шт.	Микропланшет, покрытый антителами	96 лунок (12 стрипов по 8 лунок) в держателе, покрыты моноклональными антителами мыши к зеараленону. <i>Готово к использованию.</i>
Планшет, 1 шт.	Микропланшет для смешивания	96 лунок (12 стрипов по 8 лунок) в держателе. <i>Готово к использованию (для приготовления смеси).</i>
Пробирки, 6 шт.	Standards (стандарты)	6×1.5 мл раствора зеараленона концентрацией: 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 1.2 и 4.0 нг/мл в 70% метаноле, <i>Ready-to-Use.</i>
Флакон, 1 шт.	Conjugate (конъюгат)	2×12 мл раствора конъюгата зеараленона с пероксидазой хрена (HRP) в буфере со стабилизатором. <i>Готово к использованию.</i>
Флаконы, 2 шт.	Assay diluent (разбавитель)	2×12 мл запатентованный разбавитель для образца. <i>Готово к использованию</i>
Флакон, 1 шт.	Substrate (субстрат)	12 мл раствора стабилизированного тетраметилбензидина (ТМВ). <i>Готово к использованию.</i>
Флакон, 1 шт.	Stop solution (стоп-раствор)	12 мл раствора кислоты. <i>Готово к использованию.</i>
Пакет, 1 шт.	PBS-T powder (сухая смесь)	Сухая смесь для промывочного буфера PBS с 0,05% Tween® 20, растворить в дист. воде, довести до 1 л, хранить в холодильнике.

Необходимые инструменты и материалы

- Измельчитель, подходящий для измельчения образца до размера частиц кофейного порошка
- Емкость для сбора образца на 125 мл или более
- Весы для взятия навески 20 г
- Цилиндр мерный, 100 мл
- Метанол, химически чистый: 70 мл на образец
- Дистиллированная или деионизованная вода: 30 мл на образец
- Фильтровальная бумага Whatman #1 или эквивалент
- Воронка для фильтрации
- Центрифуга
- Автоматические пипетки с наконечниками на 100 и 200 мкл
- Пробирки для разбавления
- Таймер
- Промывалка
- Впитывающие бумажные салфетки
- Микропланшетный ридер со светофильтром 450 нм

Условия хранения и срок годности

- Хранить при 2–8 °С. Не замораживать.
- Реагенты следует использовать до истечения срока годности, указанного на этикетках.
- Конъюгат, меченый HRP, и субстрат ТМВ чувствительны к свету и упакованы в непрозрачные флаконы. Хранить в темноте, беречь от действия света в процессе использования.



Правила применения и утилизации отходов

Общие правила применения набора:

- Перед использованием выдержите реагенты при комнатной температуре (19–25°C).
- Не переставляйте компоненты между наборами разных партий (lot number).
- Не пользуйтесь растворами помутневшими или с осадком.
- Не сливайте оставшиеся реагенты назад во флаконы и пробирки. Все требуемые объемы приведены в описании процедуры анализа.
- Строго соблюдайте время, температуру и другие условия анализа, указанные в инструкции.
- В процессе экстракции избегайте риска перекрестной контаминации.
- Инструменты, такие как измельчитель, должны быть вымыты после обработки каждого образца.
- Образцы должны иметь нейтральный pH ($7,0 \pm 1,0$). Сильнощелочная или кислая среда может повлиять на результаты анализа.

Техника безопасности:

Микотоксины (афлатоксины, трихотецены и другие) хорошо известны как канцерогены и считаются высокотоксичными. Поскольку микотоксины могут вызывать заболевания человека, в работе с ними необходимо соблюдать технику безопасности, а все образцы, реагенты, стеклянную посуду, другие принадлежности и оборудование, которое использовали для обработки образцов, следует считать потенциально загрязненным микотоксинами.

- Перед началом работы ознакомьтесь с паспортом безопасности (Safety Data Sheet, SDS), доступным на сайте www.hygiena.com.
- Следуйте правилам безопасности, действующим на вашем предприятии.
- В работе с наборами реагентов и всеми их компонентами настоятельно рекомендуется надевать перчатки, халат и защитные очки. Все материалы, посуду и инструменты, контактировавшие с образцами или стандартами, считайте загрязненными микотоксинами.
- Никогда не набирайте реагенты или образцы в пипетку ртом.
- Стандарты – легковоспламеняемые жидкости. Соблюдайте осторожность при обращении с ними.
- Стоп -раствор содержит серную кислоту – едкое вещество (см. SDS). Не допускайте контакта с кожей и глазами. При попадании на кожу или в глаза немедленно промойте их водой.

Утилизация отходов:

Дезактивируйте материалы и утилизируйте отходы в соответствии с правилами, действующими на вашем предприятии. Не сливайте отходы в канализацию. Микотоксины могут загрязнять окружающую среду.

- Собирайте все материалы, посуду и инструменты после использования в одной емкости. Перед проведением анализа приготовьте контейнер для отходов. Использованные наконечники для пипеток и другие материалы сбрасывайте в этот контейнер.
- После завершения работы контейнер должен быть заполнен достаточным количеством 5–6% гипохлорита натрия (NaOCl), приблизительно это 1/10 объема контейнера. NaOCl разрушает микотоксины и нейтрализует отходы, что делает их безопасным для утилизации. Переверните закрытый контейнер несколько раз, чтобы полностью смочить все отходы.
- В случае случайного разлива токсина обработайте поверхность 5–6% NaOCl в течение как минимум 10 минут, а затем 5% водным раствором ацетона. Наконец насухо протрите поверхность впитывающей бумажной салфеткой.



Подготовка образца

Примечание: отбор образца следует проводить согласно действующим нормативным документам.

Процедура экстракции

Зерно

1. Измельчите репрезентативную пробу до состояния мелкой крупы (95% проходит через сито 20 меш).
2. Приготовьте раствор для экстракции (70% метанол), для этого прибавьте 30 мл дистиллированной или деионизованной воды к 70 мл метанола для каждого образца.
3. Взвесьте 20 г измельченного образца в подходящую емкость и прибавьте в нее 10 мл раствора для экстракции (70% метанол).

Примечание: разведение образца в растворе для экстракции равно 1:5 (вес/объем)

4. Встряхните содержимое и перемешивайте не менее 3 мин в герметично закрытой емкости.
5. Дайте осесть крупным частицам, затем отфильтруйте 5–10 мл экстракта через фильтр Whatman #1 (или эквивалент) и соберите фильтрат.
6. Аликвоту полученного экстракта разбавьте 1:10 70% метанолом.
Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – **1:50**.

Корм для животных

1. Измельчите репрезентативную пробу до состояния мелкой крупы (95% проходит через сито 20 меш).
2. Приготовьте раствор для экстракции (70% метанол), для этого прибавьте 30 мл дистиллированной или деионизованной воды к 70 мл метанола для каждого образца.
3. Взвесьте 20 г измельченного образца в подходящую емкость и прибавьте в нее 10 мл раствора для экстракции (70% метанол).

Примечание: разведение образца в растворе для экстракции равно 1:5 (вес/объем)

4. Встряхните содержимое и перемешивайте не менее 3 мин в герметично закрытой емкости.
5. Дайте осесть крупным частицам, затем отфильтруйте 5–10 мл экстракта через фильтр Whatman #1 (или эквивалент) и соберите фильтрат.
6. Аликвоту полученного экстракта разбавьте 1:50 70% метанолом.
Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – **1:250**.

Процедура анализа

1. Перед использованием доведите все реагенты до комнатной температуры (19–25°C). Приготовьте промывочный буфер, для этого растворите содержимое пакета PBS-T в дистиллированной воде, доведите объем раствора до 1 л. До использования храните в холодильнике
2. Поместите в держатель по одной лунке для смешивания каждого стандарта и каждого образца. В другой держатель поместите такое же количество лунок, покрытых антителами. Все оставшиеся лунки с антителами уберите обратно в пакет с осушителем и закройте его.
3. Перемешайте все реагенты во флаконах и пробирках перед использованием
4. Внесите 200 мкл разбавителя для образцов (Assay diluent) в каждую лунку для смешивания.
5. Каждый раз используя чистый наконечник внесите по 100 мкл стандартов и всех анализируемых образцов в соответствующие лунки для смешивания. Трижды пипетируйте содержимое.
Примечание: расположение стандартов и образцов должно быть зафиксировано оператором.
6. Каждый раз используя чистый наконечник перенесите по 100 мкл содержимого лунок для смешивания в соответствующие лунки с антителами. Инкубируйте 10 мин при комнатной тем-ре.



Примечание: объем смеси в лунках для смешивания достаточен для двукратного повторения анализа (рекомендуется). Если необходимо больше повторений, объемы конъюгата и образца/ стандарта должны быть соответственно масштабированы.

7. Декантируйте содержимое лунок с антителами в емкость для сбора отходов. Промойте лунки промывочным буфером 3 раза, наполняя их и полностью удаляя содержимое.
8. Постучите держателем с лунками (верхом вниз) по впитывающей бумажной салфетке для удаления из них остатков промывочного буфера
9. Прибавьте по 100 мкл конъюгата в каждую лунку с антителами. Инкубируйте 10 мин при комнатной тем-ре. Накройте лунки чем-либо подходящим для защиты от света.
10. Повторите шаги 7 и 8.
11. Отмерьте необходимый объем раствора субстрата (1 мл на стрип или 120 мкл на лунку) в чистую кювету или другую емкость. Внесите по 100 мкл раствора субстрата в каждую лунку. Инкубируйте 10 мин при комнатной тем-ре. Накройте лунки чем-либо подходящим для защиты от света.
12. Отмерьте необходимый объем стоп-раствора (1 мл на стрип или 120 мкл на лунку) в чистую кювету или другую емкость. Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку в том же темпе, в каком был добавлен субстрат.
13. Считайте оптическую плотность (OD) содержимого лунок с помощью ридера для микропланшет со светофильтром 450 нм (эталон – нет или светофильтр 630 нм). Запишите оптическую плотность (OD450) для каждой лунки. Завершите измерения в течение 10 мин после прибавления стоп-раствора.
14. Установите для нулевого стандарта связывание 100% (B0), рассчитайте связывание (%B) для каждого стандарта и образца в процентах от связывания нулевого стандарта (%B/B0).

Интерпретация результатов

Постройте стандартную кривую зависимости OD от концентрации зеараленона в стандартах, при этом используйте исходные значения OD или значения OD, выраженные в процентах (%B/B0) от OD нулевого (0,0 нг/мл) стандарта по отношению к стандартам, содержащим зеараленон. Концентрацию зеараленона в анализируемых образцах вычисляют путем интерполяции по стандартной кривой.

Концентрация, указанная на этикетке пробирки со стандартом, относится только к содержимому этой пробирки. Образец был разбавлен 1:5, а затем 1:10 или 1:50 раствором для экстракции в ходе процедуры экстракции, поэтому для получения величины содержания зеараленона в образце в нг/г (ppb), рассчитанное значение должно быть умножено на 50 или 250, соответственно.

Стандарт (нг/мл)	Образцы зерна, разведенные 1:50 (ppb в образце)	Образцы корма, разведенные 1:250 (ppb в образце)
0,0	0,0	0,0
0,1	5,0	25,0
0,3	15,0	75,0
0,6	30,0	150,0
1,2	60,0	300,0
4,0	200,0	1000,0

Если в образце содержится больше зеараленона, чем в стандарте самой высокой концентрации, образец следует дополнительно разбавить 70% метанолом и снова проанализировать его. Дополнительное разведение должно быть учтено при вычислении конечного результата.

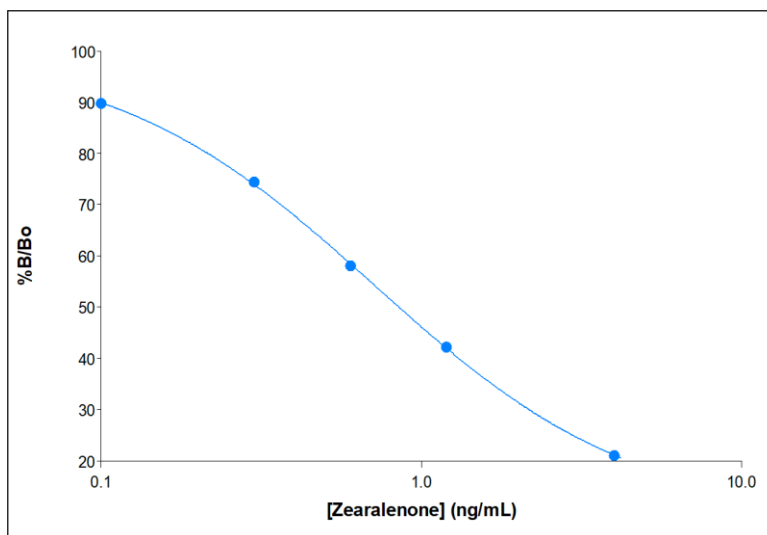


Аналитические характеристики

Данные 12 последовательных построений стандартных кривых дали следующие результаты:

Стандарт (нг/мл)	%B/B ₀	CV (%)
0,0	100,0	-
0,1	89,4	2,4
0,3	74,6	3,8
0,6	57,9	4,5
1,2	42,9	6,3
4,0	29,2	7,7

Вид полученной усредненной стандартной кривой для зеараленона следующий:



Извлечение зеараленона из искусственно загрязненного этим токсином материала в концентрации 500, 150 и 60 ppb в среднем после шести (6) независимых экспериментов было следующим:

Образец, ppb	% Извлечения
500	81,5
150	97,9
60	117,8

Извлечение зеараленона из сертифицированного эталонного материала (кукуруза) в шести (6) независимых экспериментах было следующим:

Кукуруза (эталонный образец), ppb	% Извлечение
273	88,8
121	102,1



Кросс-реактивность

Антитела, используемые в этом анализе, перекрестно реагируют с зеараленоном следующим образом:

Соединение	% Активности
Zearalenone	100
α -Zearalanol	6
α -Zearalenol	7
β -Zearalanol	9
β -Zearalenol	80
Zearalanone	5

Техническая поддержка

Со всеми вопросами и замечаниями обращайтесь к своему региональному представителю или дистрибьютору. Вы можете так же обратиться по email techsupport@hygiena.com, посетить страницу с контактной информацией [Contact Us](#) для получения номера телефона или сделать запрос в службу технической поддержки <https://www.hygiena.com/hygiena/technical-support-request.html>.