# Helica® Fumonisin Hydro ELISA

**Номер по каталогу – KIT5014 (201FUM01AQ–96)**

***Для количественного определения фумонизина в ячменной муке, кукурузе, кукурузной глютеновой муке, кукурузной крупе, сухой послеспиртовой кормовой барде (DDGS), кукурузных хлопьях и соевых бобах.***

## Содержание

Введение. Фумонизин ..... 3
Назначение ..... 3
Принцип метода ..... 3
Компоненты набора ..... 4
Необходимые инструменты и материалы ..... 4
Условия хранения и срок годности ..... 5
Правила применения и утилизации отходов ..... 5
Подготовка образца ..... 6
Процедура анализа ..... 8
Интерпретация результатов ..... 8
Аналитические характеристики ..... 9
Кросс-реактивность ..... 9
Извлечение ..... 10
Техническая поддержка ..... 10

## Введение. Фумонизин

Фумонизины (B1, B2 и B3) представляют собой группу микотоксинов, продуцируемых *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*), *F. proliferatum* и другими видами *Fusarium*, которые контаминируют сельскохозяйственную продукцию на всех этапах производства и хранения. В первую очередь фумонизины были обнаружены во всем мире как загрязнитель кукурузы и, как было показано, вызывают рак печени у подопытных крыс, отек легких у свиней и лейкоэнцефаломаляцию у лошадей (при отравлении заплесневелой кукурузой). Высокое содержание фумонизинов в кукурузе местного выращивания были обнаружены в регионах мира, где высоко распространен рак пищевода, например, в Южной Африке и Китае. Поэтому выявить и оценить загрязнение пищи и кормов фумонизином очень важно для предотвращения его опасного влияния на здоровье человека и животных.

Разработано несколько методов количественного определения фумонизина, включая газовую хроматографию, жидкостную хроматографию высокого давления (ВЭЖХ), жидкостную хроматографию с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) и (ЖХ-МС/МС. Однако все эти методы имеют явные недостатки и ограничения. Например, ВЭЖХ требует много времени, дополнительного этапа очистки, является дорогостоящим и требует участия квалифицированного персонала.

## Назначение

Наборы Helica® Mycotoxin ELISA от компании Hygiena — это удобные и экономичные комплекты реагентов для обнаружения микотоксинов в широком спектре продуктов, включая корма для животных, зерно и кукурузу, разработанные для защиты здоровья человека и животных от действия микотоксинов.

Набор Helica Fumonisin Hydro ELISA предназначен для количественного определения фумонизина в ячменной муке, кукурузе, кукурузной глютеновой муке, кукурузной крупе, сухой послеспиртовой кормовой барде (DDGS), кукурузных хлопьях и соевых бобах методом конкурентного 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 Fumonisin Hydro ELISA включает реагенты для твердофазного иммуноферментного анализа с прямым конкурентным ингибированием. Антитела, специфичные к фумонизину и оптимизированные для связывания трех подтипов фумонизина, нанесены на внутреннюю поверхность лунок микропланшета. Токсины экстрагируют из измельченного образца водой. Полученный экстракт и конъюгированный с HRP фумонизин смешивают и добавляют в покрытую антителами лунку. Фумонизин, экстрагированный из образца, и конъюгированный с HRP конкурируют за связывание с антителом, нанесенным на микролунку. После инкубации содержимое лунок декантируют, промывают и добавляют субстрат HRP (TMB), который приобретает синий цвет под действием фермента. Интенсивность цвета прямо пропорциональна количеству связанного конъюгата и обратно пропорциональна количеству фумонизина в стандарте или образце. Поэтому по мере увеличения концентрации фумонизина 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 фумонизину. *Готово к использованию.* |
| Планшет, 1 шт. | Микропланшет для смешивания | 96 лунок (12 стрипов по 8 лунок) в держателе. *Готово к использованию* (для приготовления смеси). |
| Пробирки, 6 шт. | Standards (стандарты) | 6×1,0 мл раствора фумонизина концентрацией: 0.0, 2.5, 7.5, 20.0, 50.0 и 150.0 нг/мл в деионизованной воде. *Готово к использованию*. |
| Флаконы, 2 шт. | Conjugate (конъюгат) | 2×12 мл раствора конъюгата фумонизина с пероксидазой хрена (HRP) в буфере со стабилизатором. *Готово к использованию.* |
| Флакон, 1 шт. | Substrate (субстрат) | 12 мл раствора стабилизированного тетраметилбензидина (TMB). *Готово к использованию.* |
| Флакон, 1 шт. | Stop solution (стоп-раствор) | 12 мл раствора кислоты. *Готово к использованию.* |
| 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. |

** Дополнительный реагент, капсулы Hydro buffer (номер по каталогу 928XB001/ASY5068), при необходимости приобретается отдельно.*

*** TWEEN® 20 – зарегистрированная торговая марка компании CRODA International Plc.*

## Необходимые инструменты и материалы

- Измельчитель, подходящий для измельчения образца до размера частиц кофейного порошка
- Автоматические одно- и многоканальные пипетки с наконечниками на 20, 100, 300 и 1000 мкл
- Микропробирки
- Таймер
- Промывалка
- Емкость для экстракции
- Впитывающие бумажные салфетки
- Фильтровальная бумага Whatman #1 или эквивалент
- Центрифуга
- Микроцентрифуга
- Вортекс
- Блендер
- Дистиллированная или деионизованная вода
- Цилиндр мерный, 100 мл
- Метанол, химически чистый (reagent grade)
- Микропланшетный ридер со светофильтром 450 нм
- Hydro buffer (номер по каталогу ASY5068, 90 капсул)

## Условия хранения и срок годности

- Хранить при 2–8 °C. Не замораживать.
- Реагенты следует использовать до истечения срока годности, указанного на этикетках.
- Конъюгат, меченый HRP, и субстрат TMB 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± 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 – легковоспламенимые 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*.

**Ячменная мука**

1. Взвесьте 20 г муки, перенесите в подходящую емкость с крышкой и прибавьте к ней 200 мл дистиллированной или деионизованной воды.
   ***Примечание**: разведение образца в воде равно 1:10 (вес/объем).*
2. Перемешивайте в закрытой емкости в течение 5 мин.
3. Дайте осесть крупным частицам в течение 5 мин, затем отфильтруйте 5 мл верхнего слоя экстракта через фильтр Whatman #1 (или эквивалент) и соберите фильтрат в чистую емкость.
4. Разведите полученный экстракт 1:4 дистиллированной водой (например, 0,1 мл + 0,3 мл). Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – **1:40**.

**Кукуруза**

1. Взвесьте 20 г измельченного образца, перенесите в подходящую емкость с крышкой и прибавьте к ней 100 мл дистиллированной или деионизованной воды.
   ***Примечание**: разведение образца в воде равно 1:5 (вес/объем).*
2. Перемешивайте в закрытой емкости в течение 3 мин.
3. Дайте осесть крупным частицам в течение 5 мин, затем отберите 5 мл верхнего слоя экстракта, центрифугируйте 5 мин при 3500 об./мин и перенесите супернатант в чистую микропробирку.
4. Разведите полученный экстракт 1:8 дистиллированной водой (например, 0,1 мл + 0,7 мл). Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – **1:40**.

**Кукурузная глютеновая мука**

1. Взвесьте 10 г муки, перенесите в подходящую емкость с крышкой, прибавьте к ней примерно 8 капсул Hydro Buffer и затем 50 мл дистиллированной или деионизованной воды.
   ***Примечание**: разведение образца в воде равно 1:5 (вес/объем).*
2. Перемешивайте в закрытой емкости в течение 5 мин.
3. Дайте осесть крупным частицам в течение 5 мин, затем отберите 1 мл верхнего слоя экстракта, центрифугируйте 1 мин для отделите от осадка и перенесите супернатант в чистую микропробирку.
4. Разведите полученный экстракт 1:8 дистиллированной водой (например, 0,1 мл + 0,7 мл). Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – **1:40**.

**Сухая кормовая послеспиртовая барда (DDGS). Экстракция 70% метанолом**

1. Приготовьте 70% раствор метанола, прибавив 30 мл дистиллированной или деионизованной воды к 70 мл метанола (химически чистый, reagent grade) для каждого образца.
2. Взвесьте 20 г измельченного образца, перенесите в подходящую емкость с крышкой, прибавьте к нему 80 мл 70% метанола.
   ***Примечание**: разведение образца в 70% метаноле равно 1:4 (вес/объем).*
3. Перемешивайте в закрытой емкости в течение 3 мин.
4. Дайте осесть крупным частицам в течение 5 мин, затем отфильтруйте 5 мл верхнего слоя экстракта через фильтр Whatman #1 (или эквивалент) и соберите фильтрат в чистую емкость.
5. Разведите полученный экстракт 1:10 дистиллированной водой (например, 0,1 мл + 0,9 мл). Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – **1:40.**

**Сухая кормовая послеспиртовая барда (DDGS). Водная экстракция**

1. Взвесьте 10 г муки, перенесите в подходящую емкость с крышкой, прибавьте к ней 4 капсулы Hydro Buffer и затем 40 мл дистиллированной или деионизованной воды.
   ***Примечание**: разведение образца в воде равно 1:4 (вес/объем).*
2. Перемешивайте в закрытой емкости в течение 2 мин.
3. Дайте осесть крупным частицам в течение 2 мин, затем отберите 1 мл верхнего слоя экстракта и с помощью микроцентрифуги отделите от осадка, перенесите супернатант в чистую микропробирку.
4. Разведите полученный экстракт 1:10 дистиллированной водой (например, 0,1 мл + 0,9 мл). Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – **1:40.**

**Кукурузные хлопья**

1. Измельчите репрезентативную пробу до состояния мелкой крупы (95% проходит через сито 20 меш).
2. Взвесьте 20 г измельченного образца, перенесите в подходящую емкость с крышкойи прибавьте к нему 80 мл дистиллированной или деионизованной воды.
   ***Примечание**: разведение образца в воде равно 1:4 (вес/объем).*
3. Перемешивайте в закрытой емкости в течение 3 мин.
4. Дайте осесть крупным частицам в течение 2 мин, затем отберите 1 мл верхнего слоя экстракта и с помощью микроцентрифуги отделите от осадка, перенесите супернатант в чистую микропробирку.
5. Разведите полученный экстракт 1:10 дистиллированной водой (например, 0,1 мл + 0,9 мл). Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – **1:40**.

**Соя**

1. Измельчите репрезентативную пробу до состояния мелкой крупы (95% проходит через сито 20 меш).
2. Взвесьте 20 г измельченного образца, перенесите в подходящую емкость с крышкой и прибавьте к нему 200 мл дистиллированной или деионизованной воды.
   ***Примечание**: разведение образца в воде равно 1:10 (вес/объем).*
3. Перемешивайте в закрытой емкости в течение 3 мин.
4. Дайте осесть крупным частицам в течение 5 мин, затем отберите 5 мл верхнего слоя экстракта, центрифугируйте 10 мин при 3500 об./мин и перенесите супернатант в чистую микропробирку.
5. Разведите полученный экстракт 1:4 дистиллированной водой (например, 0,1 мл + 0,3 мл). Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – **1:40**.

**Кукурузная крупа (White Hominy Corn)**

1. Измельчите репрезентативную пробу до состояния мелкой крупы (95% проходит через сито 20 меш). Взвесьте 20 г измельченного образца, перенесите в подходящую емкость с крышкой и прибавьте к нему 200 мл дистиллированной или деионизованной воды.
   ***Примечание**: разведение образца в воде равно 1:10 (вес/объем).*
2. Перемешивайте в закрытой емкости в течение 5 мин.
3. Дайте осесть крупным частицам в течение 5 мин, затем отфильтруйте 5-10 мл верхнего слоя экстракта через фильтр Whatman #1 (или эквивалент) и соберите фильтрат в чистую емкость.
4. Разведите полученный экстракт 1:4 дистиллированной водой (например, 0,1 мл + 0,3 мл). Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – **1:40**.

## Процедура анализа

***Примечание**: рекомендуется использовать многоканальный дозатор. При его отсутствии можно пользоваться одноканальным, но в этом случае не желательно анализировать одновременно более 16 образцов и стандартов (2 целых стрипа).*

1. Перед использованием доведите все реагенты до комнатной температуры (19–25ºC). 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 220 мкл конъюгата в каждую лунку для смешивания.
5. Каждый раз используя чистый наконечник внесите по 20 мкл стандартов и всех анализируемых образцов в соответствующие лунки для смешивания. Пипетируйте содержимое 20 раз. ***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. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Установите для нулевого стандарта связывание 100% ($B_0$), рассчитайте связывание (%B) для каждого стандарта и образца в процентах от связывания нулевого стандарта (%B/$B_0$)

## Интерпретация результатов

Постройте стандартную кривую зависимости OD от концентрации фумонизина 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 фумонизин. Концентрацию фумонизина в анализируемых образцах вычисляют путем интерполяции по стандартной кривой.

Концентрация, указанная на этикетке пробирки со стандартом, относится только к содержимому этой пробирки. Образец в ходе процедуры экстракции был разбавлен раствором для экстракции и дистиллированной водой в 40 раз, поэтому для получения величины содержания фумонизина в образце в мкг/г (ppm), рассчитанное значение должно быть умножено на 40.

| Стандарт (нг/мл) | Образец (ppm) 1:40 |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 2,5 | 0,1 |
| 7,5 | 0,3 |
| 20 | 0,8 |
| 50 | 2 |
| 150 | 6 |

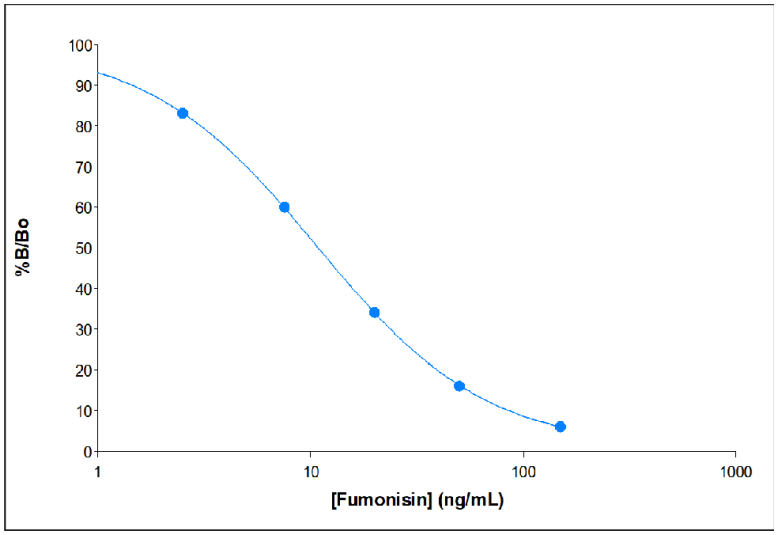
При разведении образца согласно протоколу анализа содержание фумонизина должно находиться в пределах от 0,0 до 6,0 мкг/г (ppm). Если в образце содержится больше фумонизина, чем в стандарте самой высокой концентрации, образец следует дополнительно разбавить дистиллированной водой и снова проанализировать его. Дополнительное разведение должно быть учтено при вычислении конечного результата.

## Аналитические характеристики

Данные 16 последовательных построений стандартных кривых дали следующие усредненные результаты:

| Стандарт (нг/мл) | Образец (ppm) 1:40 | %B/B$_0$ | CV (%) |
|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 100 | - |
| 2,5 | 0,1 | 83 | 2,6 |
| 7,5 | 0,3 | 60 | 3,2 |
| 20 | 0,8 | 34 | 2,7 |
| 50 | 2 | 16 | 2,7 |
| 150 | 6 | 6 | 3,3 |

Вид полученной усредненной стандартной кривой для фумонизина следующий:




## Кросс-реактивность

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

- B1: 100%
- B2: 60%
- B3: 74%

## Извлечение

Средние показатели извлечения вместе с %CV приведены в таблице ниже. Анализ образцов производили с использованием набора Fumonisin Hydro ELISA из трех независимо полученных повторных экстрактов (n). Извлечение фумонизина из проанализированных образцов после трех независимых процедур экстракции (n) было следующим:

| Тип образца | Содержание фумонизина (ppm) | % Извлечения | CV (%) | n | Раствор для экстракции |
|---|---|---|---|---|---|
| Ячмень | 0,8 | 116 | 5,7 | 3 | Дистиллированная вода |
| | 2,5 | 98 | 6,4 | | |
| | 5,0 | 94 | 2,9 | | |
| Кукуруза | 0,27 | 82 | 4,2 | 3 | Дистиллированная вода |
| | 2,63 | 105 | 5,2 | | |
| Кукурузная глютеновая мука | 0,8 | 105 | 12,2 | 3 | Hydro buffer |
| | 2,5 | 105 | 7,2 | | |
| | 5,0 | 121 | 0,6 | | |
| DDGS | 0,8 | 101 | 10,4 | 3 | 70% метанол |
| | 2,5 | 108 | 8,3 | | |
| | 5,0 | 98 | 4,7 | | |
| DDGS | 0,8 | 119 | 8,7 | 3 | Hydro buffer |
| | 2,5 | 106 | 2,6 | | |
| | 5,0 | 95 | 3,5 | | |
| Кукурузные хлопья | 0,8 | 116 | 5,1 | 3 | Дистиллированная вода |
| | 2,5 | 107 | 2,9 | | |
| | 5,0 | 89 | 2,3 | | |
| Соя | 0,8 | 116 | 4,3 | 3 | Дистиллированная вода |
| | 2,5 | 111 | 3,7 | | |
| | 5,0 | 98 | 2,9 | | |
| White hominy corn | 1,0 | 109 | 3,1 | 3 | Дистиллированная вода |
| | 2,5 | 106 | 4,3 | | |
| | 5,0 | 86 | 1,5 | | |

## 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.