

Helica® Aflatoxin B1 Rapid ELISA

Номер по каталогу – KIT5004 (941BAFL01B1 – 96)





Helica® Aflatoxin B1 Rapid ELISA

Для количественного определения афлатоксина В1 в зерне, орехах, семенах хлопчатника, крупах и других продуктах, включая корма для животных.

Содержание

Введение. Афлатоксины	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	6
Интерпретация результатов	7
Аналитические характеристики	7
Техническая поддержка	8



Введение. Афлатоксины

Афлатоксины — это токсичные метаболиты, продуцируемые различными видами плесени, такими как *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Они канцерогенны и могут присутствовать в зерновых культурах, орехах, семенах хлопчатника и другом сырье для производства продуктов питания человека или кормов для животных. Урожай может быть загрязнен одним или несколькими из четырех афлатоксинов: B1, B2, G1 и G2. Афлатоксин B1 является наиболее токсичным и часто встречающимся. Другие афлатоксины представляют серьезную опасность только в высокой концентрации. Афлатоксины опасны для здоровья человека и могут вызывать гепатоцеллюлярную карциному, афлатоксикоз, синдром Рея и хронический гепатит. Животные подвергаются воздействию афлатоксинов при потреблении кормов, загрязненных продуцирующими афлатоксин штаммами грибов во время роста, сбора урожая или хранения. Следствиями развития токсикозов у животных являются различные хронические заболевания, нарушение репродуктивной функции, снижение иммунитета, уменьшение продуктивности (роста, молочности, яйценоскости) и рост падежа. Большинство контролирующих государственных органов по всему миру нормируют допустимое количество афлатоксинов в продуктах питания человека и кормах для животных. Точное и быстрое определение содержания афлатоксина имеет первостепенное значение.

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, кукурузу и мочу животных, разработанные для защиты здоровья человека и животных от действия микотоксинов.

Набор Helica Aflatoxin B1 Rapid ELISA предназначен для обнаружения и количественного определения афлатоксина B1 в зерне, орехах, семенах хлопка, злаках и других товарах, включая корма для животных 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 Aflatoxin B1 Rapid ELISA включает реагенты для твердофазного иммуноферментного анализа с прямым конкурентным ингибированием. Антитела, специфичные к афлатоксину и оптимизированные для связывания с афлатоксином B1, нанесены на внутреннюю поверхность лунок микропланшета. Токсины экстрагируют из измельченного образца 70% метанолом. Полученный экстракт и конъюгированный с HRP афлатоксин B1 смешивают и добавляют в покрытую антителами лунку. Афлатоксин, экстрагированный из образца, и конъюгированный с HRP афлатоксин B1 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. 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 афлатоксину. <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 афлатоксина В1 концентрацией: 0.0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 и 4.0 нг/мл в органическом растворителе. <i>Готово к использованию.</i>
Флаконы, 2 шт.	Conjugate (конъюгат)	2× 12 мл раствора конъюгата афлатоксина В1 с пероксидазой хрена (HRP) в буфере со стабилизатором. <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.

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

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 фильтрования
- Стекланные пробирки
- Центрифуга
- Автоматические пипетки с наконечниками на 100 и 200 мкл
- 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 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 – 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. Наконечник насухо протрите поверхность впитывающей бумажной салфеткой.



Подготовка образца

Примечание: отбор образца следует проводить согласно действующим нормативным документам.

Процедура экстракции

1. Приготовьте раствор для экстракции (70% метанол), прибавив 30 мл дистиллированной или деионизированной воды к 70 мл метанола (химически чистый, reagent grade) для каждого образца.
2. Измельчите репрезентативную пробу до состояния мелкой крупы (95% проходит через сито 20 меш).
3. Взвесьте 20 г измельченного образца в подходящую емкость и прибавьте к нему 100 мл раствора для экстракции (70% метанол).

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

4. Размешайте путем встряхивания в герметично закрытой емкости не менее 2 мин.
5. Дайте осесть крупным частицам, затем отфильтруйте 5–10 мл экстракта через фильтр Whatman #1 (или эквивалент) и соберите фильтрат.
Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – 1:5.

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 (19–25°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 конъюгата 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 15 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 5 раз, 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 5 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% (V_0), рассчитайте связывание (%V) для каждого стандарта и образца в процентах от связывания нулевого стандарта ($\%V/V_0$).

Интерпретация результатов

Постройте стандартную кривую зависимости OD от концентрации афлатоксина в стандартах, при этом используйте исходные значения OD или значения OD, выраженные в процентах ($\%V/V_0$) от OD нулевого (0,0 нг/мл) стандарта по отношению к стандартам, содержащим афлатоксин. Концентрация афлатоксинов в анализируемых образцах вычисляются путем интерполяции по стандартной кривой.

Концентрация, указанная на этикетке пробирки со стандартом, относится только к содержимому этой пробирки. Образец был разбавлен 70% метанолом в соотношении 1:5, поэтому для получения величины содержания афлатоксина в образце в нг/г (ppb), рассчитанное значение должно быть умножено на 5.

Стандарт (нг/мл)	Образец (нг/г или мл)
0,0	0,0
0,2	1,0
0,5	2,5
1,0	5,0
2,0	10,0
4,0	20,0

При разведении образца согласно протоколу анализа содержание афлатоксина должно находиться в пределах от 1 до 20 нг/г (ppb). Если в образце содержится больше афлатоксина, экстракт следует дополнительно разбавить 70% метанолом и снова проанализировать его. Дополнительное разведение должно быть учтено при вычислении конечного результата.

Аналитические характеристики

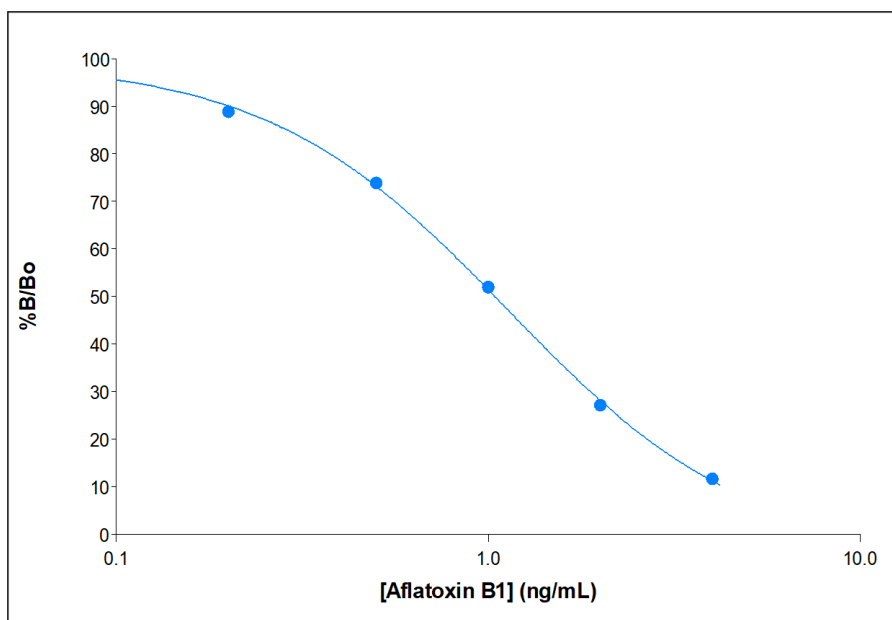
Точность анализа

Данные о сходимости результатов			
Типичный пример анализа с использованием набора Helica Aflatoxin B1, проведенного в дублях, дал следующую стандартную кривую			
Образец (нг/мл)	Среднее OD	$\%V/V_0$	CV (%)
0,0	1,835	100	1,9
1,0	1,626	88,6	1,5
2,5	1,283	69,9	1,0
5,0	0,720	39,2	2,4
10,0	0,338	18,4	1,0
20,0	0,147	8,0	1,0

Данные о достоверности различий результатов		
Различия между данными 6 повторных анализов, выраженные в процентах от V_0 для каждого стандарта		
Образец (нг/мл)	$\%V/V_0$	CV (%)
1,0	88,5	4,2
2,5	75,0	3,3
5,0	53,9	4,8
10,0	28,1	8,7
20,0	12,0	11,9



На приведенном ниже рисунке отображена типичная стандартная кривая для афлатоксина В1, построенная по данным из приведенной выше таблицы (о достоверности различий результатов). На одном графике объединены данные для семи стандартных кривых.



Предел обнаружения (limit of detection, LOD) определяется как среднее значение плюс два стандартных отклонения при повторных определениях готового экстракта, не содержащего афлатоксинов. Поскольку состав образца влияет на фоновое значение измерений, LOD будет отличаться у разных типов образцов. Поэтому он определяется эмпирически для каждого типа образца.

По данным анализа с помощью тест-системы Helica Aflatoxin B1:

LOD для кукурузы <1.0 ppb, n=10

LOD для арахиса <1.0 ppb, n=10

Набор Helica Aflatoxin B1 ELISA протестирован с 1 мг/мл (1 миллион ppb) афлатоксина В1 без видимого подавления связывания (хук-эффект высокой дозы). Следовательно, он может применяться для анализа смывов с поверхностей производственных помещений и оборудования.

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>.