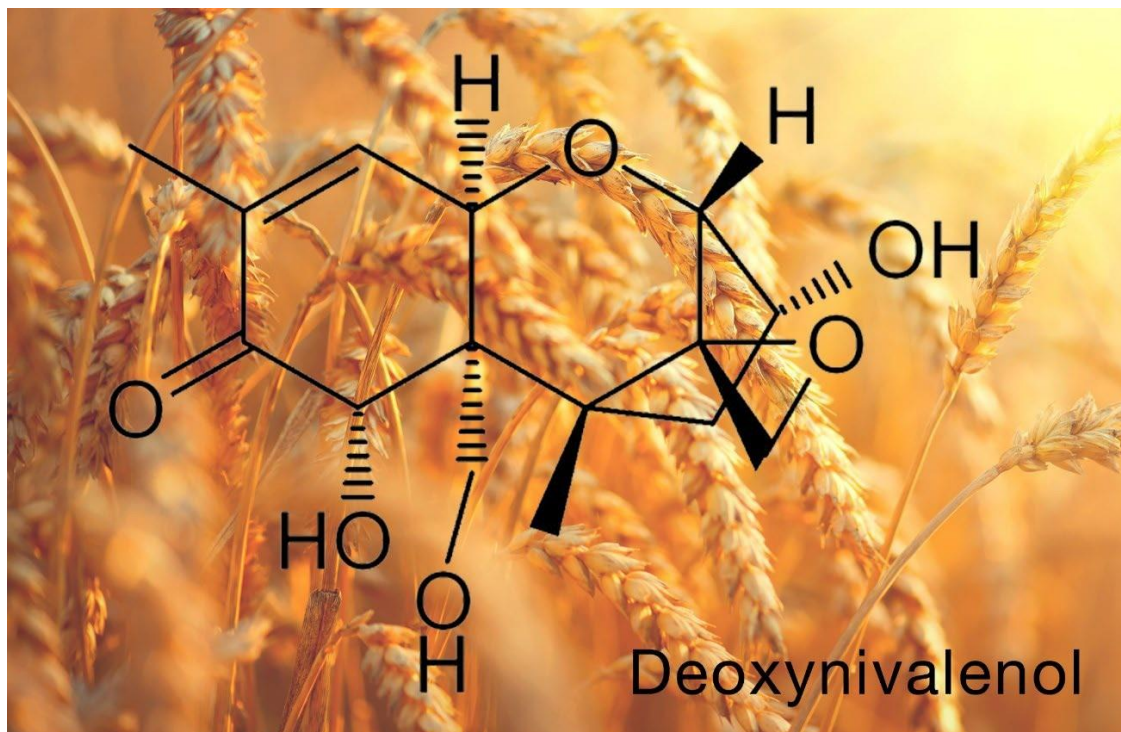


Helica® Deoxynivalenol ELISA

Номер по каталогу – KIT5010 (941DON01M – 96)



Для количественного определения дезоксиниваленола в зерне и продукции из него, включая корма для животных.

Содержание

Введение. Дезоксиниваленол	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	7
Техническая поддержка	8

Ведение. Дезоксиниваленол

Дезоксиниваленол (ДОН) — низкомолекулярный метаболит трихотеценовой группы микотоксинов, продуцируемый грибами рода *Fusarium*, в частности *F. graminearum*. Эти грибы широко распространены и поражают ячмень, пшеницу и кукурузу. Дезоксиниваленол очень токсичен, вызывает широкий спектр иммунологических нарушений и особенно известен тем, что вызывает отказ от корма и рвоту у свиней, отсюда и его альтернативное название — vomitоксин.

Назначение

Наборы Helica® Mucotoxin ELISA от компании Hygiene — 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 Deoxynivalenol ELISA предназначен для обнаружения и количественного определения дезоксиниваленола в зерне и продукции из него, 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 Deoxynivalenol (DON) ELISA включает реагенты для твердофазного иммуноферментного анализа с прямым конкурентным ингибированием. Антитела, специфичные к ДОН, нанесены на внутреннюю поверхность лунок микропланшета. Токсины экстрагируют из измельченного образца водой. Полученный экстракт и конъюгированный с HRP ДОН смешивают и добавляют в покрытую антителами лунку. ДОН, экстрагированный из образца, и конъюгированный с HRP конкурируют за связывание с антителами, нанесенными 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 ДОН в стандарте или образце. Поэтому по мере увеличения концентрации ДОН 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 ДОН. <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 ДОН концентрацией: 0.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 и 200.0 нг/мл в деионизованной воде. <i>Готово к использованию.</i>
Флаконы, 2 шт.	Conjugate (конъюгат)	2×12 мл раствора конъюгата ДОН с пероксидазой хрена (HRP) в буфере со стабилизатором. <i>Готово к использованию.</i>
Флакон, 1 шт.	Substrate (субстрат)	12 мл раствора стабилизированного тетраметилбензидина (TMB). <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
- Дистиллированная или деионизованная вода: 30 мл на образец
- Фильтровальная бумага Whatman #1 или эквивалент
- Воронка для фильтрации
- Стеклопланшеты
- 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 ($7,0 \pm 1,0$). 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.hygienea.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:

Деактивируйте 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

1. Измельчите репрезентативную пробу до состояния мелкой крупы (95% проходит через сито 20 меш).
2. Взвесьте 20 г измельченного образца в подходящую емкость и прибавьте к нему 100 мл дистиллированной или деионизованной воды.
Примечание: разведение образца в воде равно 1:5 (вес/объем).
3. Размешайте путем встряхивания в герметично закрытой емкости не менее 3 мин.
4. Дайте осесть крупным частицам, затем отфильтруйте 5–10 мл экстракта через фильтр Whatman #1 (или эквивалент) и соберите фильтрат в чистую емкость.
5. Аликвоту полученного экстракта разбавьте 1:10 промывочным буфером PBS-T. Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – 1:50.

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% (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 ДОН в стандартах, при этом используйте исходные значения OD или значения OD, выраженные в процентах (%V/V₀) от OD нулевого (0,0 нг/мл) стандарта по отношению к стандартам, содержащим ДОН. Концентрацию ДОН 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 дистиллированной или деионизованной водой в ходе процедуры экстракции, а затем еще 1:10 промывочным буфером, поэтому для получения величины содержания ДОН в образце в мкг/г (ppm), рассчитанное значение должно быть умножено на 50.

Стандарт (нг/мл)	Образец* (ppm) 1:50
0,0	0,0
10,0	0,5
20,0	1,0
50,0	2,5
100,0	5,0
200,0	10,0

*Для таких образцов как пшеница, ячмень, корм для животных и кукуруза.

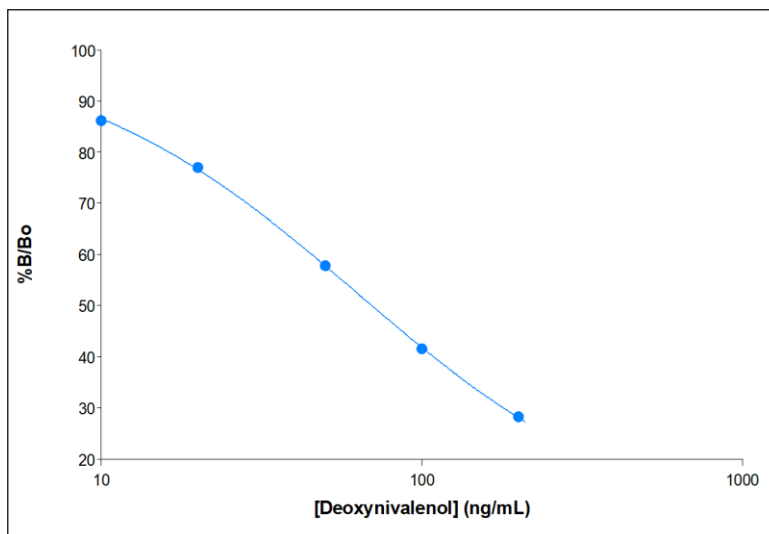
При разведении образца согласно протоколу анализа содержание ДОН должно находиться в пределах от 0,5 до 10 мкг/г (ppm). Если в образце содержится больше ДОН, чем в стандарте самой высокой концентрации, образец следует дополнительно разбавить промывочным буфером (PBS-T) и снова проанализировать его. Дополнительное разведение должно быть учтено при вычислении конечного результата.

Аналитические характеристики

Данные 15 последовательных построений стандартных кривых дали следующие результаты:

Стандарт (нг/мл)	Образец (ppm) 1:50	%V/V ₀	CV (%)
0,0	0,0	100,0	-
10,0	0,5	86,2	5,1
20,0	1,0	77,0	5,0
50,0	2,5	57,8	7,8
100,0	5,0	41,6	11,4
200,0	10,0	28,2	10,9

Вид полученной усредненной стандартной кривой для ДОН следующий:



Извлечение ДОН из сертифицированного эталонного материала (пшеница), содержащего 0,5 ppm, 2,5 ppm и 5,1 ppm, в среднем после трех (3) независимых экспериментов было следующим:

Сертифицированный материал (ppm)	ppm
0,5 ± 0,07	0,40
2,5 ± 0,1	2,14
5,1 ± 0,3	4,63

Извлечение 2,5 ppm ДОН, добавленного в два вида продуктов, оказалось следующим:

Тип образца	ppm	% Извлечения
Корм для животных	1,85	73,9
Кукуруза	2,05	82,1

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>.