



РОССИЙСКИЕ
ИННОВАЦИОННЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ
КОНТРОЛЯ
БЕЗОПАСНОСТИ
ПИЩЕВОЙ
ПРОДУКЦИИ

СВИДЕТЕЛЬСТВО
№ 01.00225/205-43-15
от 06 ноября 2015 г.

www.dtsbiotech.com

Набор для
иммуноферментного
анализа
ТЕСТСИП®

Фумонизин
B1, B2
0,25-5,0 мг/кг

ИНСТРУКЦИЯ
по применению

Совместное производство
ООО «ИЛ Тест-Пушино» и
ООО «ДТС Биотех»



Содержание

1. Введение.....	3
2. Область применения.....	3
3. Принцип работы набора для ИФА.....	4
4. Меры предосторожности	6
5. Материалы, входящие в комплект набора для ИФА.....	7
6. Материалы, не входящие в комплект набора для ИФА.....	8
7. Рабочие протоколы	10
8. Расчет и интерпретация результатов....	17
9. Дополнительная информация	19

1. Введение

Уважаемый пользователь!

Благодарим Вас за выбор Набора для иммуноферментного анализа (ИФА) ТЕСТСИП. Прежде чем приступить к работе, пожалуйста, внимательно изучите это руководство. Помимо рабочих протоколов, здесь перечислены необходимые меры предосторожности и правила техники безопасности, выполнение которых сведет к минимуму риск повреждений оборудования и травм персонала.

2. Область применения

Набор для ИФА ТЕСТСИП предназначен для количественного определения содержания суммы Фумонизинов В1 и В2 в зерновых, кормах для животных, а также готовых пищевых продуктах методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа. Предел обнаружения составляет 0,25 мг/кг. Диапазон количественного анализа составляет от 0,25 до 5,0 мг/кг. Набор прошел метрологическую аттестацию для кукурузы, кукурузной муки, попкорна, риса, пшеницы,

показана высокая сходимость результатов анализа с референсным методом ВЭЖХ.

3. Принцип работы набора для ИФА

Работа набора для ИФА ТЕСТСИП основана на принципе прямого конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA). Фумонизины экстрагируются из размолотого образца 70% метанолом, затем экстракт разводят дистиллированной водой. Производится смешивание разведенного экстракта и конъюгата Фумонизин В1-Пероксидаза хрена; полученную смесь вносят в лунки планшета с иммобилизованными моноклональными антителами. Свободные Фумонизины из образца или стандартов и конъюгированный с ферментной меткой Фумонизин конкурируют за ограниченное количество антител. После промывки, в ходе которой из лунок удаляются не связавшиеся с антителами Фумонизины, в систему добавляют хромогенный субстрат, который позволяет визуализировать

результаты реакции антиген-антитело. Интенсивность цветовой реакции обратно пропорциональна концентрации Фумонизинов образце (или стандарте). Затем добавляется стоп-раствор, останавливающий цветовую реакцию и, одновременно, усиливающий окраску. Далее с помощью планшетного фотометра регистрируется поглощение при 450 нм (при желании можно также использовать дифференциальный фильтр на 630 нм). По результатам для стандартов с известным содержанием Фумонизина В1 строится калибровочная кривая, с помощью которой можно определить содержание суммы Фумонизинов в анализируемых образцах.

4. Меры предосторожности

1. Храните реагенты при температуре 2-8°C. Не используйте набор для ИФА после истечения срока годности.
2. Соблюдайте время инкубации, указанное в протоколе. При несоблюдении этого правила возможно получение недостоверных результатов.
3. Метанол является сильным ядом. Не допускайте контакта с кожей и глазами. Манипуляции с метанолом следует выполнять в перчатках!
4. Метанол огнеопасен! Соблюдайте меры предосторожности при хранении и использовании.
5. Стоп-раствор содержит кислоту! Не допускайте контакта с кожей и глазами. В случае попадания немедленно промойте пораженный участок большим количеством воды!

6. Соблюдайте меры предосторожности при манипуляциях с образцами, экстрактами и стандартами для калибровки!
7. Утилизируйте использованные реагенты в соответствии с законодательством.

5. Материалы, входящие в комплект набора для ИФА

- 96-луночный модульный планшет (12 стрипов по 8 лунок) с иммобилизованными моноклональными антителами (запаян в фольгированный пакет)
- 96-луночный модульный планшет (12 стрипов по 8 лунок) для смешивания (в прозрачном пакете, лунки с синей каемкой).
- 5 флаконов со стандартами Фумонизина В1 диапазон концентраций: 0, 0,25, 1,0, 2,5 и 5,0 мг/кг

- Флакон объемом 25 мл с готовым раствором конъюгата Фумонизин В1-Пероксидаза хрена (Зелёная крышка)
- Флакон объемом 15 мл с хромогенным субстратом (Синяя крышка)
- Флакон объемом 15 мл со стоп-раствором (Красная крышка)

6. Материалы, не входящие в комплект набора для ИФА

Экстракция:

- Мельница для размола образцов, либо другое оборудование для размола.
- Блендер со стеклянным сосудом или лабораторный встряхиватель для колб.
- Весы до 400 г.
- Мерный цилиндр до 100 мл.
- Колбы емкостью не менее 125 мл

- Фильтровальная бумага «Синяя лента» или аналогичная
- Сито с размером ячейки 20 меш.
- Метанол
- Дистиллированная или деионизованная вода
- Воронка с фильтром

Анализ:

- Восьмиканальная пипетка с рабочим объемом 20 – 200 мкл.
- Одноканальная пипетка с рабочим объемом 20 – 200 мкл.
- Одноканальная пипетка с рабочим объемом 200 – 1000 мкл.
- Лабораторный таймер.
- Промыватель планшетов (необязательно) или пластиковая промывалка.
- Планшетный фотометр с фильтром на 450 нм (дополнительно с фильтром на 630 нм).
- 3 Ванночки для восьмиканальной пипетки.

- Наконечники для автоматических пипеток соответствующих объемов.
- Фильтровальная бумага или салфетки.
- Дистиллированная или деионизованная вода.

7. Рабочие протоколы

Экстракция

Протокол 1:

1. Отберите репрезентативный образец и измельчите его с использованием соответствующего оборудования так, чтобы 75 % образца проходило через сито с ячейкой 20 меш. Тщательно гомогенизируйте полученный образец.
2. Отберите 20 грамм размолотого образца в чистый сосуд для блендера.
3. Добавьте 100 мл смеси метанол:вода = 70:30 (Соблюдайте соотношение масса образца:объем экстрагента = 1:5).

4. Перемешивайте на блендере не менее 3 минут с высокой скоростью.
5. Дайте осесть взвеси и профильтруйте экстракт через фильтровальную бумагу «Синяя лента» или аналогичную
6. Разведите экстракт дистиллированной или деионизованной водой в 20 раз. Например: добавьте 50 мкл экстракта к 950 мкл дистиллированной или деионизованной воды. Образец готов для проведения анализа.

Протокол 2:

1. Отберите репрезентативный образец и измельчите его с использованием соответствующего оборудования так, чтобы 75 % образца проходило через сито с ячейкой 20 меш. Тщательно гомогенизируйте полученный образец.
2. Отберите 20 грамм размолотого образца в чистую колбу.

3. Добавьте 100 мл смеси метанол:вода = 70:30 (Соблюдайте соотношение масса образца:объем экстрагента = 1:5).
4. Перемешивайте на встряхивателе не менее 40 минут.
5. Дайте осесть взвеси и профильтруйте экстракт через фильтровальную бумагу «Синяя лента» или аналогичную.
6. Разведите экстракт дистиллированной или деионизованной водой в 20 раз. Например: добавьте 50 мкл экстракта к 950 мкл дистиллированной или деионизованной воды. Образец готов для проведения анализа.

Примечание 1: Экстракт образца должен иметь рН в диапазоне 6-8. При необходимости доведите рН экстракта с помощью соляной кислоты или гидроксида натрия.

Примечание 2: Протокол №1 имеет меньшую точность по сравнению с протоколом №2.

Примечание 3: Вы можете использовать и другие протоколы экстракции, если показано, что они позволяют получить сопоставимые результаты

Анализ

Примечание: Все реагенты и компоненты набора перед проведением исследования должны достичь комнатной температуры (20 - 27°C). Для проведения исследования рекомендуется использовать 8-канальную пипетку. Не следует использовать более 4 стрипов в одном исследовании.

Протокол исследования:

- 1) Запишите схему расположения стандартов и образцов в прилагаемую таблицу.
- 2) Установите необходимое количество стрипов для смешивания (с синей каемкой) в держатель. Для каждого стандарта или образца требуется одна лунка.
- 3) Установите такое же количество стрипов с иммобилизованными антителами в держатель.

Неиспользованные стрипы незамедлительно верните в фольгированный пакет, запаяйте (заклейте липкой лентой) и уберите пакет в холодильник.

- 4) Отмерьте необходимый объем конъюгата (флакон с зеленой крышкой) из расчета 2 мл на стрип и налейте в отдельную ванночку для конъюгата. Восьмиканальной пипеткой внесите по 200 мкл конъюгата в каждую лунку стрипов для смешивания.
- 5) Используя одноканальную пипетку, внесите по 100 мкл стандартов или образцов в соответствующие лунки стрипов для смешивания, в которых уже находится 200 мкл конъюгата. Используйте индивидуальные наконечники для каждого стандарта или образца.
- 6) Используя восьмиканальную пипетку (новые наконечники для каждого стрипа), аккуратно перемешайте содержимое стрипа для

смешивания (пипетируя вверх и вниз три раза) и немедленно перенесите 100 мкл полученной смеси в стрип с иммобилизованными антителами. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 15 минут.

Примечание: Не используйте шейкер, так как встряхивание планшета может привести к перекрестной контаминации

7) По завершении инкубации промойте планшет 5 раз дистиллированной или деионизованной водой с помощью автоматического промывателя или восьмиканальной пипетки или пластиковой промывалки.

8) После промывки переверните планшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге, так чтобы в лунках не осталось жидкости.

Примечание: Следите за тем, чтобы стрипы не выпали из держателя!

- 9) Отмерьте необходимый объем субстрата (флакон с синей крышкой) из расчета 1 мл на стрип и налейте в отдельную ванночку для субстрата. Внесите по 100 мкл субстрата в каждую лунку промытого планшета.
- 10) Инкубируйте при комнатной температуре 5 минут.
- 11) Отмерьте необходимый объем стоп-раствора (флакон с красной крышкой) из расчета 1 мл на стрип и налейте в отдельную ванночку для стоп-раствора. Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку планшета. Цвет должен измениться с синего на желтый. Избегайте образования пузырьков!
- 12) Зарегистрируйте поглощение при 450 нм в спектрофотометре (при желании можно использовать дифференциальный фильтр 630 нм).

8. Расчет и интерпретация результатов

Построение калибровочной кривой и расчет концентраций

Для построения калибровочной кривой и расчета концентраций суммы Фумонизинов в анализируемых образцах можно воспользоваться шаблоном в формате Microsoft Excel, или программным обеспечением сторонних производителей (например, встроенное программное обеспечение спектрофотометра).

Расчет результатов с помощью шаблона

Внесите в соответствующие значения таблицы значения поглощения для стандартов и анализируемых образцов. Программа автоматически построит калибровочную кривую и рассчитает концентрации суммы Фумонизинов в анализируемых образцах.

Интерпретация результатов

Если концентрация суммы Фумонизинов в анализируемом образце превышает верхнюю границу диапазона количественного анализа (5,0 мг/кг), повторите исследование, разведя экстракт этого образца смесью метанол:вода = 70:30, а затем водой 1: 20.

Если по результатам анализа содержание суммы Фумонизинов не превышает 0,25 мг/кг, в протоколе испытаний следует указать «менее предела количественного определения (0,25 мг/кг).

9. Дополнительная информация

Срок годности компонентов набора указан на упаковке. Если вы обнаружили изменение цвета хромогенного субстрата с прозрачного на голубой, не используйте этот реагент и свяжитесь с производителем.

Компоненты набора хранятся при температуре 2-8°C.

Техническая поддержка:

142290, Московская область, г. Пущино,

ул. Грузовая, д.1г, офис 2

Тел. (495) 226 21 33

info@dtsbiotech.com

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ

РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



ВНИИМС

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ

МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ

119361 Москва, Озёрная ул., д. 46

E-mail: analyt-vm@vniims.ru

Тел. (495) 437 9419

Факс: (495) 437 5666

СВИДЕТЕЛЬСТВО № 01.00225/205-43-15

ОБ АТТЕСТАЦИИ МЕТОДИКИ ИЗМЕРЕНИЙ

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВОЙ ДОЛИ

МИКОТОКСИНОВ В ПРОБАХ ЗЕРНА, ПРОДУКТОВ

ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ И КОРМОВ МЕТОДОМ ПРЯМОГО

КОНКУРЕНТНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-НАБОРОВ «ТЕСТСИП»

Методика измерений массовой доли микотоксинов в пробах зерна, продуктов его переработки и кормов методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа с использованием тест-наборов «ТЕСТСИП» (количество страниц – 15, 2015 г.), разработанная Обществом с ограниченной ответственностью «ИЛТест-Пущино» (ООО «ИЛТест-Пущино») (142290, Российская Федерация, Московская обл., г. Пущино, ул. Грузовая, д. 1г), аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563–2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002.

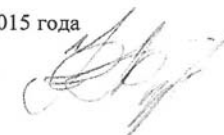
Аттестация осуществлена по результатам теоретических и экспериментальных исследований методики измерений.

В результате аттестации установлено, что методика измерений соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает основными метрологическими характеристиками, приведенными на обороте настоящего свидетельства.

При реализации методики в лаборатории обеспечивают контроль стабильности результатов анализа на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения промежуточной прецизионности и показателя правильности.

Дата выдачи 6 ноября 2015 года

И.о. директора



Ф.В. Булыгин