

Меламин ИФА (Микропланшет для титрования)



Abraxis

Иммуноферментный анализ для определения
меламина в загрязненных образцах

Артикул 50005В

1. Общее описание

Набор для определения меламина представляет собой иммуноферментный тест для количественного и качественного определения меламина. Этот набор подходит для скрининга меламина в различных матрицах (процедуры экстракции/разбавления см. в соответствующих технических документах). При необходимости, результаты, могут быть подтверждены с помощью ВЭЖХ, ГХ/МС или других традиционных методов.

2. Меры безопасности

Стандартные растворы набора содержат небольшое количество меламина. Раствор субстрата содержит тетраметилбензидин, а стоп-раствор – разбавленную соляную кислоту. Избегайте попадания стоп-раствора на кожу и слизистые оболочки. Если реагенты попали на кожу, смойте их водой.

3. Хранение и стабильность

Набор следует хранить в холодильнике (4–8 °С). Перед использованием необходимо дать растворам достичь комнатной температуры (20–25 °С). Реагенты можно использовать до истечения срока годности, указанного на упаковке.

4. Принцип работы теста

Тест основан на распознавании меламина антителами. Калибраторы, экстракты образцов и конъюгат меламина с пероксидазой хрена пипетируют в лунки микропланшета, покрытые антителами к меламину. В течение 30-минутной инкубации меламин из образца и конъюгат конкурируют за связывание с антителами. После инкубации содержимое лунок удаляют, лунки промывают. Далее в лунки добавляют субстрат. Ферментный конъюгат взаимодействует с субстратом, в результате чего раствор окрашивается в синий цвет. Реакцию останавливают внесением стоп-реагента, цвет раствора меняется на желтый. Интенсивность окрашивания раствора измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Оптическая плотность раствора обратно пропорциональна концентрации меламина в пробе.

5. Ограничения определения меламина, возможные помехи при тестировании

В образцах могут встречаться различные органические соединения. Лаборатория Eurofins провела исследование их влияния на результат анализа данного теста и выяснила, что наличие каких-либо органических соединений не влияет на результаты. Однако из-за высокой изменчивости этих соединений нельзя полностью исключить помехи при анализе, вызванные эффектами матрицы. Некоторые матрицы (напр. жирная пища) требуют дополнительного разбавления образца перед анализом, чтобы исключить помехи (пожалуйста, свяжитесь с Eurofins Abraxis для получения соответствующих инструкций по процедурам экстракции/разбавления).

Возможными источниками ошибок при проведении теста могут быть: неадекватные условия хранения набора, неправильная последовательность дозирования или неточные объемы реагентов, слишком долгое или слишком короткое время инкубации во время проведения теста, экстремальные внешние температуры при проведении теста.

Набор Eurofins Abraxis Melamine ELISA предоставляет результаты скрининга. Как и в случае любого другого аналитического метода (ГХ, ВЭЖХ и т. д.), образцы, требующие действия регулирующих органов, должны быть подтверждены альтернативными методами.

A. Поставляемые реагенты и материалы

1. Планшет для микротитрования (12 x 8 стрипов), покрытый поликлональными антимеламиновыми антителами, в алюминиевом пакете
2. Стандарты (6): 0, 10, 50, 100, 200, 500 нг/мл (ppb), по 2 мл каждый
3. Конъюгат меламина-HRP, 6 мл
4. Концентрат промывочного буфера (5X), 100 мл, необходимо развести перед использованием, см. раздел «Подготовка к тесту» (раздел C)
5. Раствор субстрата (цветной) (TMB), 12 мл
6. Стоп-раствор, 12 мл (обращаться осторожно)

B. Дополнительные материалы (не поставляются с тест-набором)

1. Микропипетки с одноразовыми пластиковыми наконечниками (50-200 мкл)
2. Многоканальная пипетка (50–250 мкл), степперная пипетка (50–250 мкл) или электронная пипетка с одноразовыми пластиковыми наконечниками.
3. Оборудование для промывки микротитровальных планшетов (опционально)
4. Ридер для микротитровальных планшетов (длина волны 450 нм)
5. Шейкер для титрационных микропланшетов (опционально)
6. Деионизированная или дистиллированная вода
7. Контейнер емкостью 500 мл (информацию о разбавленном промывочном буфере 1X см. в разделе «Подготовка к тесту», раздел C).
8. Бумажные полотенца или аналогичный абсорбирующий материал.
9. Таймер

C. Подготовка к тесту

Используйте оборудование для микропипетирования и наконечники для дозирования стандартов и образцов. Мы рекомендуем использовать многоканальную пипетку, ступенчатую пипетку или электронную пипетку для добавления конъюгата фермента, раствора субстрата и стоп-раствора, чтобы избежать сдвига времени по планшету стандартных растворов и образцов на всем микротитровальном планшете. Пожалуйста, используйте реагенты и стандарты только из одной партии упаковки в одном тесте, так как они были скорректированы в комбинации.

1. Перед использованием доведите температуру титрационного микропланшета и реагентов до комнатной.
2. Достаньте из алюминиевого пакета необходимое количество стрипов для микропланшетов. Остальные стрипы хранятся в алюминиевом пакете и застегиваются на молнию. Храните набор в холодильнике (2-8°C).
3. Стандарты, ферментный конъюгат, субстрат и стоп-раствор готовы к использованию и не требуют дополнительного разбавления.
4. Разбавьте концентрат промывочного буфера (5X) в соотношении 1:5. Если вы используете всю бутылку (100 мл), добавьте к 400 мл деионизированной или дистиллированной воды.
5. Со стоп-раствором следует обращаться осторожно, так как он содержит разбавленную H_2SO_4 .

D. Схема работы

Планшет для микротитрования состоит из 12 стрипов по 8 лунок, которые можно использовать индивидуально для теста. Стандарты должны выполняться с каждым тестом. Не используйте значения стандартов, которые были определены ранее.

Стд. 0 – стд. 5: стандарты
(0; 10; 50; 100; 200; 500 ppb)

Обр.1, обр. 2 и т.д.: Образцы

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Стд. 0	Стд. 4	И т.д.									
B	Стд. 0	Стд. 4	И т.д.									
C	Стд. 1	Стд. 5										
D	Стд. 1	Стд. 5										
E	Стд. 2	Обр. 1										
F	Стд. 2	Обр. 1										
G	Стд. 3	Обр. 2										
H	Стд. 3	Обр. 2										

Е. Процедура анализа

1. Внесите в лунки по 100 мкл стандартов или экстрактов образцов в соответствии с приведенной схемой работы. Рекомендуется проводить анализ в двух или трех параллелях.
2. Добавьте по 50 мкл раствора ферментного конъюгата в отдельные лунки, используя многоканальную, ступенчатую или электронную пипетку. Накройте лунки парафильмом или лентой и перемешайте содержимое, перемещая планшет по поверхности стола круговыми движениями в течение примерно 30 секунд (будьте осторожны, чтобы не пролить содержимое).
3. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут при комнатной температуре.
4. Промойте полоски 4 раза разбавленным промывочным буфером. Используйте не менее 250 мкл промывочного буфера 1X на лунку на каждом этапе промывки. Оставшийся в лунках буфер следует удалить, промокнув перевернутый планшет насухо стопкой бумажных полотенец.
5. Добавьте по 100 мкл раствора субстрата (цветного) в лунки, используя многоканальную, ступенчатую или электронную пипетку. Накройте лунки парафильмом или лентой и перемешайте содержимое, перемещая планшет по поверхности стола круговыми движениями в течение примерно 30 секунд (будьте осторожны, чтобы не пролить содержимое). Инкубируйте стрипы в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте.
6. Добавьте в лунки по 100 мкл стоп-раствора в той же последовательности, что и раствор субстрата, используя многоканальную, ступенчатую или электронную пипетку.
7. Измерьте оптическую плотность при 450 нм с помощью фотометра для микропланшетов в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

Ф. Измерения

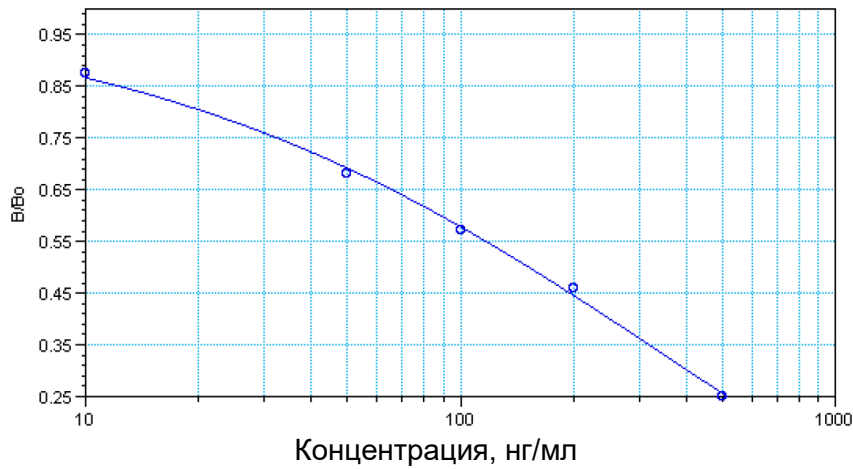
Оценка результатов ИФА может быть выполнена с использованием коммерческих программ оценки ИФА, таких как Logit/Log или 4-Parameter (предпочтительно). Для ручной оценки рассчитайте среднее значение абсорбции для каждого из стандартов. Рассчитайте %B/B₀ для каждого стандарта, разделив среднее значение поглощения для каждого стандарта на среднее значение поглощения нулевого стандарта (стандарт 0). Постройте стандартную кривую, отложив %B/B₀ на вертикальной линейной оси (y) в зависимости от соответствующей концентрации меламина на горизонтальной логарифмической оси (x) на миллиметровой бумаге. Затем путем интерполяции с использованием стандартной кривой значений %B/B₀ для образцов, рассчитайте уровни меламина в ppb. Результаты также можно получить с помощью макроса электронной таблицы, который можно получить по запросу от Eurofins Abraxis.

Концентрации образцов определяют, используя стандартную кривую для каждого теста. Образцы, показывающие более низкую концентрацию меламина по сравнению со стандартом 1 (10 мкг/л или ppb), должны указываться как содержащие < 10 ppb меламина. Образцы, показывающие более высокую концентрацию, чем стандарт 5 (500 мкг/л), необходимо дополнительно разбавлять и анализировать повторно для получения точных результатов.

Полуколичественные результаты можно получить путем простого сравнения оптической плотности образца с оптической плотностью стандартов. Образец, содержащий меньше цвета, чем стандарт, будет иметь концентрацию меламина выше, чем концентрация

стандарта. Образцы, содержащие больше цвета, чем стандарт, будут иметь концентрацию меньше, чем концентрация стандарта.

Г. Стандартная кривая (Для демонстрационных целей, не для использования в интерпретации проб)



Технические характеристики

Чувствительность: Предел обнаружения меламина составляет 10 мкг/л (среднее значение 6 холостых определений минус 3 стандартных отклонения). Середина теста (50% V/Bo) составляет примерно 150 мкг/л. Наиболее точные результаты дают определения ближе к середине калибровочной кривой.

Воспроизводимость: Коэффициенты вариации (CV) для стандартов: <10%; CV для образцов: <15%.

Специфичность: Перекрестная реактивность набора Eurofins Abraxis Melamine Kit для различных продуктов Traizine может быть выражена как наименьшая определяемая доза (LDD), которая оценивается как 90% V/Bo, или как доза, необходимая для ингибирования поглощения на 50% (50% V/Bo).

Соединение	LDD (ppb)	50% V/Bo	X-реактивность (%)
Меламин	10	150	100
Аммелин	7	140	93
Аммелида	400	7,000	2.1
Циануровая кислота	400	> 10,000	< 1
Атразин	> 10,000	> 10,000	< 1
Диамино Атразин	0.1	2	> 500

Приложение. Подготовка проб цельного молока (жидкого) для определения меламина набором Abraxis Melamine ELISA

А. Процедура 1 (для обезжиренного молока)

1. Область использования набора

Для обнаружения меламина в пастеризованном цельном молоке (жидком).

2. Диапазон обнаружения

200-5000 нг/мл (ppb). Образцы с более высокими концентрациями необходимо дополнительно разбавить и повторно проанализировать.

3. Необходимые материалы (не предоставляются)

- Пипетки на 100 и 900 мкл.

- Стеклянные флаконы с крышками с тефлоновым покрытием.

- 10% MeOH/20 mM PBS (фосфатно-солевой буфер), pH 7,2-7,4.

4. Примечания и меры предосторожности

Чтобы исключить влияние матрицы цельного молока, которое нужно проверить на присутствие меламина, образцы необходимо разбавить в 10% MeOH/20 mM PBS.

5. Порядок действий

Образцы молока следует разбавить 1:10 смесью 10% MeOH/20 mM PBS. Например, добавить 100 мкл молока к 900 мкл раствора 10% MeOH / 20 mM PBS.

Теперь образец готов к анализу в соответствии с процедурой, описанной в инструкции к набору Abraxis Melamine Kit.

6. Оценка результатов

Результаты, полученные для образцов цельного молока, приготовленных, как описано выше, необходимо умножить на коэффициент 10, чтобы учесть разбавление образца.

Используйте результаты только в пределах аналитического диапазона теста (20-500 ppb).

Результаты ниже самого низкого стандарта (20 ppb) не следует умножать на коэффициент разбавления и не следует сообщать как отрицательные, а следует указывать как <200 ppb обнаруженного меламина. Результаты выше наивысшего стандарта необходимо разбавить и повторно проанализировать.

7. Данные о производительности

Процедура подготовки образца, описанная выше, была использована для цельного молока с добавлением различных количеств меламина. Извлечение меламина составило от 70 до 92%.

В. Процедура 2 (для обезжиренного молока)

1. Диапазон обнаружения

60-1500 нг/мл (ppb). Образцы с более высокими концентрациями необходимо дополнительно разбавить и повторно проанализировать.

2. Необходимые материалы (не предоставляются)

- Микроцентрифуга на 10,000-13,000 x g.
- Пробирки для микроцентрифуги.
- Пипетки на 100 и 900 мкл.
- Стеклянные флаконы с тефлоновой крышкой.
- 10% MeOH/20 mM PBS, pH 7,2-7,4.

3. Примечания и меры предосторожности

Чтобы исключить влияние матрицы цельного молока, которое нужно проверить на присутствие меламина, образцы необходимо разбавить в 10% MeOH/20 mM PBS.

4. Порядок действий

-Добавьте примерно 1 мл пробы молока в микроцентрифужную пробирку.
-Центрифугируйте при 10000-13000 g в течение 5 минут. Образец должен разделиться на 3 слоя.

-Тщательно отберите часть среднего слоя.

- Разбавьте и аликвотируйте средний слой 1:3 в 10% MeOH/20 mM PBS. Например, добавьте 250 мкл экстрагированного молока к 500 мкл 10% MeOH/20 mM PBS.

Теперь образец готов к анализу в соответствии с процедурой, описанной в инструкции к набору Abaxis Melamine Kit.

5. Оценка результатов

Результаты, полученные для образцов цельного молока, приготовленных, как описано выше, необходимо умножить на коэффициент 3, чтобы учесть разбавление образца. Используйте результаты только в пределах аналитического диапазона анализа (20-500 ppb). Результаты ниже самого низкого стандарта (20 ppb) не следует умножать на коэффициент разбавления и не следует сообщать как отрицательные, а следует указывать как <60 частей на миллиард обнаруженного меламина. Результаты выше наивысшего стандарта необходимо разбавить и повторно проанализировать.

6. Данные о производительности

Процедура подготовки образца, описанная выше, была использована для цельного молока с добавлением различных количеств меламина, извлечение составило 96–120%.

Техническая поддержка

Поставщик в России:

ООО «Неотест»

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 649 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

www.shop-neotest.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 704 05 50



Поставщик в Беларуси:

ОДО «КомПродСервис»

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

sales@komprod.com

www.komprod.com

Техническая поддержка

support@komprod.com

+375 17 336 50 54

