

# Aflatoxin B<sub>1</sub> ELISA

*5121AFB[20]04.20*

Иммуноферментный конкурентный анализ для количественного определения Афлатоксина В<sub>1</sub> в различных матрицах

Тест-система для анализа in-vitro  
Хранить при 2 - 8 °С



Официальный дистрибьютор  
R-Biopharm в Беларуси  
ОДО "КомПродСервис"  
+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50  
[www.komprod.com](http://www.komprod.com), [info@komprod.com](mailto:info@komprod.com)



Официальный дистрибьютор  
R-Biopharm в России  
ООО "Неотест"  
+7 (499) 649-02-01  
[info@neo-test.ru](mailto:info@neo-test.ru), [www.neo-test.ru](http://www.neo-test.ru)

## Краткая информация

Aflatoxin B<sub>1</sub> ELISA представляет собой набор для количественного определения афлатоксина B<sub>1</sub> методом конкурентного иммуноферментного анализа. Набора достаточно для 96 определений (включая стандарты). Набор содержит все реагенты для проведения анализа. Методы быстрого и эффективного извлечения афлатоксина B<sub>1</sub> из разных матриц включены в руководство по использованию набора.

### 1. ВВЕДЕНИЕ

Афлатоксины это канцерогенные, высокотоксичные метаболиты плесневых грибов рода *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Афлатоксины (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) представляют собой группу структурно связанных, чрезвычайно токсичных соединений, продуцируемых плесневыми грибами *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* и *A. nomius*. Афлатоксины вызывают рак, в основном печени, но также кишечника, легких и молочных желез. Плесени в основном встречаются на продуктах питания, кормах и их ингредиентах, происходящих из тропических и субтропических регионов. Наиболее выраженное загрязнение обнаружено в злаках, рисе, кукурузе, сое, древесных орехах и арахисе.

### 2. ПРИНЦИПЫ ИФА Афлатоксин B<sub>1</sub>

В основе теста – реакция антиген-антитело. Лунки стрипов планшета покрыты антителами, специфичными в отношении афлатоксина B<sub>1</sub>. В лунки планшета вносят стандартные или исследуемые растворы, конъюгат афлатоксина B<sub>1</sub> с ферментом (ферментный конъюгат). Свободный афлатоксин и афлатоксин, конъюгированный с ферментом, конкурируют за центры связывания антител (конкурентный иммуноферментный анализ). Не связавшийся ферментный конъюгат затем удаляется в процессе промывки. Далее в лунки планшета добавляется субстрат/хромоген. Связавшийся ферментный конъюгат преобразует бесцветный хромоген в конечный продукт голубого цвета. Добавление стоп-раствора приводит к изменению цвета с голубого на жёлтый. Измерение проводится фотометрически при 450 нм. Оптическая плотность раствора в лунках обратно пропорциональна концентрации афлатоксина B<sub>1</sub> в образце.

### 3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для данного набора используются мышинные антитела, полученные против афлатоксина B<sub>1</sub>, конъюгированного белком.

Перекрестная чувствительность:

Афлатоксин B <sub>1</sub>	100%
Афлатоксин B <sub>2</sub>	20%
Афлатоксин G <sub>1</sub>	17%
Афлатоксин G <sub>2</sub>	4%

Предел обнаружения (LOD) рассчитывается по формуле:  $X_n + 3SD$  ( $n > 20$ ) и определяется при оптимальных условиях.

Матрица	Процедура	LOD, мкг/кг	Диапазон измерений, мкг/кг	Предел определения, мкг/кг
Злаки	8.1	0,5	0,25-8,0	1
Рис	8.1	0,4		-
Яйца	8.1	0,2		-
Орехи	8.1	0,8		1
Мед	8.1	0,2		-
Фруктовое пюре	8.1	0,6		1
Семена	8.3.1	0,5	-	-
Пищевое масло	8.3.2	0,2	0,31-10,0	-
Корма	8.1	1,0	0,25-8,0	-

#### 4. УСЛОВИЯ ОБРАЩЕНИЯ И ХРАНЕНИЕ

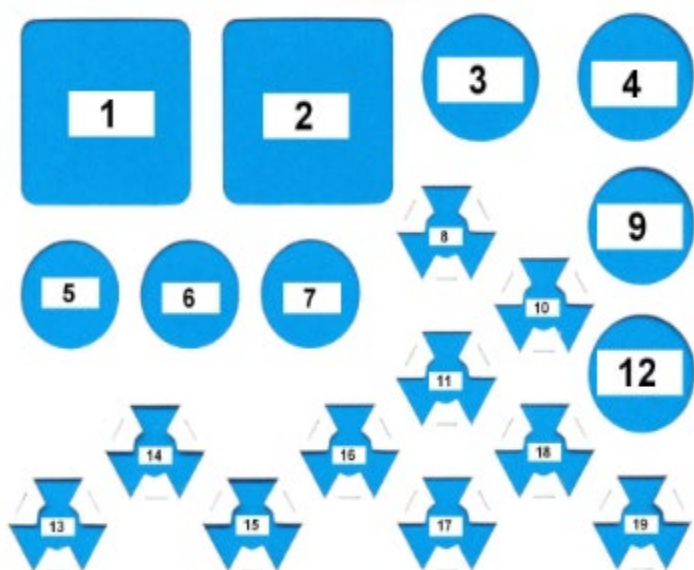
- Компоненты набора до и после использования должны храниться в при температуре от +2°C до +8°C, в темном месте.
  - После истечения срока годности качество работы набора не гарантировано.
  - Избегайте образования конденсата в лунках планшета.
  - Перед проведением анализа все компоненты тест-набора, включая микротитровальный планшет, должны быть доведены до комнатной температуры. Разбавьте компоненты набора непосредственно перед использованием, но после того, как компоненты нагреются до температуры окружающей среды.
  - Необходимо избегать любого прямого воздействия света на раствор хромогена.
- Признаки порчи реагентов:
- Голубая окраска раствора субстрата перед переносом его в лунки.
  - Слабая или отсутствующая цветовая реакция нулевого стандарта ( $V_{max}$ ,  $E_{450nm} < 0,8$ ).

#### 5. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

##### Инструкция

Один запечатанный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок). Планшет готов к использованию.

Позиции реагентов в наборе. Для приготовления реагентов смотрите раздел 9.



1. **Буфер для разведения** (20 мл, концентрированный 4х).
2. **Буфер для промывки планшета** (30 мл, концентрированный 20х).
3. **Раствор субстрата** (12 мл, готов для применения).
4. **Стоп-реагент** (15 мл, готов для применения).
5. **Конъюгат** (лиофилизированный, голубая крышка).
6. **Антитела** (лиофилизированные, желтая крышка).
7. Не используется.
8. Не используется.
9. Не используется.
10. Не используется.
11. Не используется.
12. Не используется.
13. **Нулевой градуировочный раствор** (2 мл, готов для применения).
14. **Градуировочный раствор 1** (1 мл, готов для применения) **0,0157 нг/мл.**
15. **Градуировочный раствор 2** (1 мл, готов для применения) **0,0313 нг/мл.**
16. **Градуировочный раствор 3** (1 мл, готов для применения) **0,0625 нг/мл.**
17. **Градуировочный раствор 4** (1 мл, готов для применения) **0,125 нг/мл.**
18. **Градуировочный раствор 5** (1 мл, готов для применения) **0,25 нг/мл.**
19. **Градуировочный раствор 6** (1 мл, готов для применения) **0,5 нг/мл.**

## 6. ОБОРУДОВАНИЕ И ТРЕБУЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ТЕСТ-НАБОРА

- весы, емкости для взвешивания;
- перчатки;
- вытяжной шкаф;
- гомогенизатор (миксер);
- центрифуга (2000\*g);
- вортекс;

- автоматическое устройство для промывки планшетов либо многоканальный пипет-дозатор 100-300 мкл;
- магнитная мешалка;
- шейкер для микротитровальных планшетов;
- микропланшетный фотометр с фильтром 450 нм;
- пробирки стеклянные (10-15 мл);
- пипет-дозаторы 100-1000 мкл;
- пипет-дозатор 2,5 мл;
- бумажный фильтр;
- метанол;
- н-гексан;
- дихлорметан.

## **7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

- Афлатоксины являются токсичными и канцерогенными соединениями. Следует избегать контакта афлатоксинов с кожей и слизистыми.
- Любой материал, загрязненный афлатоксинами, должен быть уничтожен или дезактивирован добавлением раствора гипохлорита натрия (10% по объему).
- Стоп-реагент содержит серную кислоту концентрации 0,5 М. Не допускать контакта реагента с кожей.
- Избегать контакта проб с кожей и слизистыми.
- Не пипетировать ртом.
- Не допускается есть, пить, курить, хранить или готовить пищу или применять косметику в пределах обозначенной рабочей области.
- Тетраметилбензидин (ТМБ) является токсичным при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании. Поэтому будьте внимательны при работе с субстратом.
- Не используйте компоненты тест-набора после истечения их срока годности и не перемешивайте компоненты из разных партий.
- Каждая лунка используется как оптическая кювета. Поэтому не прикасайтесь к поверхности лунок, не допускайте их повреждения и загрязнения.
- Все компоненты должны быть полностью растворены перед применением. Обращайте особое внимание на субстрат, который имеет тенденцию к кристаллизации при температуре +4 °С.
- Оптимальные результаты могут быть получены при строгом соблюдении протокола анализа. Точность и воспроизводимость результатов анализа зависит от аккуратности пипетирования и равномерного промывания лунок.

## **8. ПОДГОТОВКА ПРОБ**

Реагентов, включенных в набор, достаточно для проведения не менее 96 анализов (включая анализ стандартов). Каждый стандарт и образец анализируются в двух экземплярах.

### **8.1 Пищевые продукты и корма**

- Примерно 50-100 грамм образца измельчают до мелкодисперсного гомогенного состояния.
- К 3 г измельченной пробы добавляют 9 мл 80% метанола.
- Тщательно взбалтывают в течение 10 минут при 20 - 25 ° С.

- Центрифугируйте образец, 10 минут при 2000 x g или отфильтруйте (рекомендуется для больших объемов образца).
- Аликвоту 50 мкл супернатанта, полученного после центрифугирования или фильтрации, разбавляют 150 мкл буфера для разведения, чтобы получить раствор, содержащий 20% метанола.
- Внесите 50 мкл разведенного супернатанта в соответствующие лунки планшета для ELISA.

## 8.2 Альтернативный метод для пищевых продуктов и кормов

- Примерно 50-100 грамм образца измельчают до мелкодисперсного гомогенного соединения.
- Добавьте 10 мл дистиллированной воды к 1 грамму гомогенизированной измельченной пробы и перемешайте на вортексе.
- Добавьте к смеси 10 мл дихлорметана (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).
- Тщательно встряхните переворачиванием, 5-10 минут.
- Центрифугируйте образец 10 минут при 2000 x g, 20–25 ° C.
- Отфильтруйте нижний слой через сложенный фильтр (например, Schleicher & Schuell, № 10 311 642).
- Выпарите 1 мл фильтрата в слабом токе азота при 50 ° C.
- Растворите остаток в 1 мл \* буфера для разведения образца (глава 9).
- Добавьте 1 мл н-гексана.
- Встряхивайте на вортексе в течение 1 минуты.
- Центрифугируйте 10 минут, 2000 x g, 20 - 25 ° C.
- Удалите верхний слой (н-гексан).
- Внесите пипеткой 50 мкл нижележащего слоя в соответствующие лунки планшета для ELISA.

Некоторые матрицы нуждаются в повторной процедуре обезжиривания. Если жидкость кажется мутной после первого раза, то процедуру обезжиривания необходимо повторить. Повторяйте обезжиривание, пока жидкость не станет прозрачной. Используйте 50 мкл нижележащего слоя в анализе.

### 8.3.1 Процедура экстракции афлатоксина из жирных проб, таких как семена, масло и т.д.

- Взвесьте в стеклянной пробирке 2 г мелко нарезанного, а затем гомогенизированного масла.
- Добавьте 8 мл дихлорметана.
- Перемешивайте 30 минут переворачиванием.
- Отфильтруйте экстракт через фильтр (например, Schleicher & Schuell, № 10311642).
- 4 мл фильтрата и упарить досуха при 50°C под слабой струей азота.
- Растворите остаток в 1 мл \* буфера для разведения образца (см. Главу 9).
- Добавьте 1 мл н-гексана (для обезжиривания) и встряхните.
- Центрифугируйте 5 минут, 2000 x g, 20 - 25 ° C.
- Перенесите пипеткой нижний слой в чистую стеклянную пробирку.
- Добавьте 1 мл н-гексана и встряхните.
- Центрифугируйте 5 минут, 2000 x g, 20 - 25 ° C.
- Удалите верхний слой (н-гексан).

- Внесите пипеткой 50 мкл нижележащего слоя в соответствующие лунки планшета для ELISA.

### 8.3.2 Альтернативный метод: пищевые масла

- Добавьте к 1 мл (или 1 г) масла, 3 мл 80% метанола и 2 мл н-гексана.
- Перемешайте переворачиванием в течение 10 минут.
- Центрифугируйте 5 минут, 2000 x g.
- Снимите верхний слой (н-гексан).
- Разведите 100 мкл экстракта 400 мкл \*буфера для разведения образца (см. Главу 9), перемешайте на вортексе.
- Внесите пипеткой 50 мкл полученного раствора в соответствующие лунки планшета для ELISA.

## **9. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**

Перед началом испытаний реагенты должны быть доведены до температуры окружающей среды. Реагенты необходимо готовить непосредственно перед использованием. Любые неиспользованные реагенты должны быть немедленно возвращены на хранение при 2 - 8°C.

### Микротитровальный планшет

Верните неиспользованные лунки в закрывающийся пакет с осушителем и храните при температуре 2 - 8°C до использования в последующих анализах. Сохраните также держатель стрипов.

### Промывочный буфер

Промывочный буфер поставляется в виде 20-кратного концентрата. Приготовьте рабочий раствор буфера перед использованием. Для каждого стрипа необходимо 40 мл разбавленного промывочного буфера (2 мл концентрированного промывочного буфера + 38 мл дистиллированной воды).

### Раствор субстрат/хромогена

Довести температуру раствора до комнатной, перед пипетированием перемешать содержимое (возможно образование осадка при 4°C).

### Буфер для разведения (4-й концентрат)

Этот буфер предназначен для растворения конъюгата, антител и для приготовления \*буфера для разведения образца. Перед разбавлением (20 мл буфера + 60 мл дистиллированной воды) концентрированный буфер необходимо довести до комнатной температуры (20 - 25 ° C) и тщательно перемешать. Концентрированный буфер может содержать осадок. Разбавленный в 4 раза буфер можно хранить в холодильнике (2-8 ° C) до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.

### \* Буфер для разведения образца

Подготовьте буфер для разведения образца, добавив 2 мл 100% метанола к 8 мл буфера для разведения. Буфер готовится непосредственно перед использованием.

### Раствор конъюгата

Восстановите лиофилизированный конъюгат (афлатоксин-HRP) в 4 мл буфера для разведения, тщательно перемешайте и храните в темноте до использования.

### Раствор антител

Восстановите лиофилизированные антитела в 4 мл буфера для разведения, тщательно перемешайте и храните в темноте до использования.

## **10. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

### Протокол промывки

В ходе выполнения ИФА между этапами инкубации необходимо удалять несвязанные компоненты. Это достигается посредством соответствующей процедуры промывки. Очевидно, что каждая процедура промывки должна проводиться с большой тщательностью, что бы гарантировать повторяемость и воспроизводимость результатов.

Промывка вручную или с помощью автоматического вошера может осуществляться следующим образом:

#### Промывка вручную

1. Жидкость из лунок вылить путем резкого переворачивания планшета, удалить остатки жидкости путем энергичного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги
2. Все лунки заполнить буфером для промывки до края лунки (300 мкл)
3. Процесс промывки (этапы 1 и 2) повторять трижды
4. Жидкость из лунок выливать путем резкого переворачивания планшета
5. После последнего промывания планшет перевернуть и удалить остатки жидкости путем энергичного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги
6. Не допускать высыхания лунок перед внесением следующего реагента.

#### Промывка с помощью автоматического вошера

При использовании автоматического вошера проверьте, чтобы из всех лунок жидкость удалялась полностью, чтобы раствор для промывания тщательно распределялся, заполняя до края каждую лунку во время каждого цикла промывания. Вошер должен быть запрограммирован на выполнение трех циклов промывки.

### Протокол анализа

1. подготовить образцы в соответствии с главой 8 (подготовка образцов) и подготовить реагенты в соответствии с главой 9 (приготовление реагентов).  
Примечание: стандарты могут загустевать при хранении, перед анализом доведите стандарты до комнатной температуры и тщательно перемешайте до гомогенного состояния.
2. внесите 100 мкл нулевого стандарта в дубле (лунки H1, H2, бланк).  
внесите 50 мкл нулевого стандарта в дубле (лунки A1, A2, максимальный сигнал).  
внесите 50 мкл каждого из стандартных растворов Aflatoxin B1 в дубле (лунки от B1, 2 до I 1,2 , то есть 0,0157, 0,0313, 0,0625, 0,125, 0,25 и 0,5 нг/мл).
3. Внесите по 50 мкл каждого раствора образца в дублях в оставшиеся лунки микротитровального планшета (40 образцов; 80 лунок).
4. Внесите по 25 мкл конъюгата (афлатоксин B1-HRP) во все лунки, кроме лунок H1 и H2.
5. Внесите по 25 мкл антител во все лунки, кроме лунок H1 и H2.
6. Запечатлейте планшет и несколько секунд встряхивайте планшет на шейкере для микропланшетов.
7. Инкубируйте в течение 1 часа в темноте при температуре 37 °С.
8. Удалите раствор из планшета и промойте 3 раза промывочным буфером.
9. Внесите по 100 мкл раствора субстрата в каждую лунку.
10. Инкубируйте 30 минут при 20-25 °С.
11. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
12. Измерьте значения оптической плотности проб при 450 нм.



## 11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

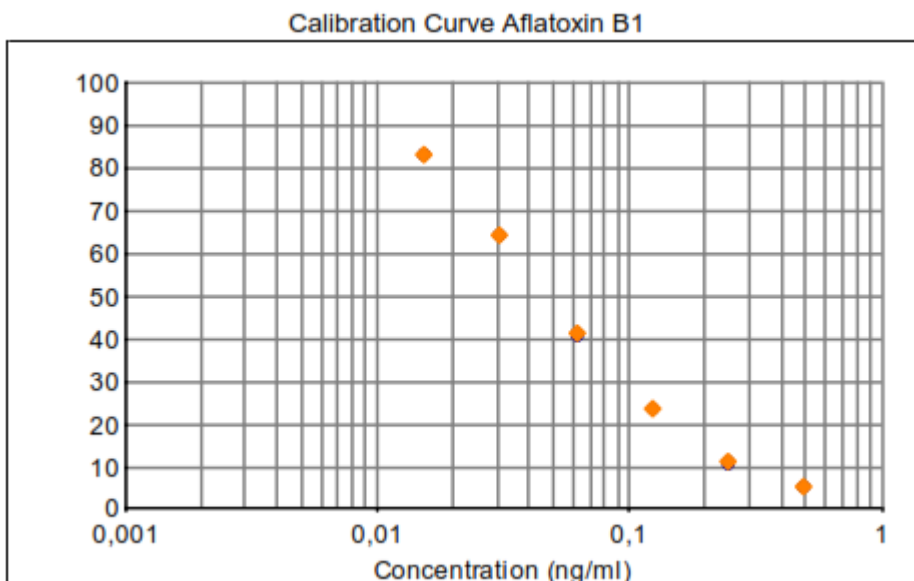
Вычистить среднее значение оптической плотности (ОП) лунок Н1 и Н2 (бланк) из отдельных значений ОП для лунок, содержащих стандартные растворы и пробы.

Значения ОП для шести стандартных растворов и проб (среднее значение двух повторностей) делят на среднее значение ОП нулевого градуировочного раствора (лунки А1 и А2) и умножают на 100. Таким образом, нулевой градуировочный раствор принимается за 100% (максимальная оптическая плотность) и другие значения ОП приводятся в процентах от максимальной оптической плотности.

$$\frac{\text{ОП стандарта (или образца)}}{\text{ОП нулевого стандарта}} \times 100 = \% \text{ от максимальной оптической плотности}$$

### Калибровочная кривая:

Значения (% от максимальной оптической плотности), вычисленные для стандартных растворов, наносятся на график (по оси Y) и соответствуют концентрации афлатоксина (нг/мл) нанесенные на логарифмическую ось X.



Количество афлатоксина В1 в образцах выражают в эквивалентах афлатоксина В1. Эквиваленты афлатоксина В1 в образцах (нг/мл), соответствующие % от максимальной оптической плотности каждого образца, можно определить по калибровочной кривой.

### 8.1 Пищевые продукты и корма

Эквиваленты афлатоксина В1, считываемые по стандартной кривой, необходимо умножить на коэффициент 16, чтобы получить содержание афлатоксина В1 в образцах пищевых продуктов и кормов.

### 8.2 Альтернативный метод для пищевых продуктов и кормов

Эквиваленты афлатоксина В1, считываемые по стандартной кривой, необходимо умножить на коэффициент 10, чтобы получить содержание афлатоксина В1 в образцах пищевых продуктов и кормов.

### 8.3.1 Процедура экстракции афлатоксина из жирных проб, таких как семена, масло и т.д.

Концентрацию афлатоксина В1 можно непосредственно определить по калибровочной кривой.

### 8.3.2 Альтернативный метод: пищевые масла

Эквиваленты афлатоксина В1, считываемые по стандартной кривой, необходимо умножить на коэффициент 20, чтобы получить содержание афлатоксина В1 в пищевых маслах.

## **13. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА**

Для заказа Aflatoxin В1 ELISA используйте код набора 5121 AFB.



Техническая поддержка и прием заявок:

+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50, +7 (499) 649-02-01

[info@komprod.com](mailto:info@komprod.com), [support@komprod.com](mailto:support@komprod.com), [info@neo-test.ru](mailto:info@neo-test.ru)