

# **РАКТОПАМИН ИФА**

*5061РАСТ [13]02.24*

Конкурентный иммуноферментный метод для скрининга и количественного определения рактопамина в различных матрицах

Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

**Официальный дистрибьютор  
в России:**

**ООО "НеоТест"**

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 911 02 01

info@neo-test.ru

[www.neo-test.ru](http://www.neo-test.ru)

***Техническая поддержка***

support@neo-test.ru

+7 499 444 05 50



**Официальный дистрибьютор  
в Беларуси:**

**ОДО "КомПродСервис"**

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

[www.komprod.com](http://www.komprod.com)

***Техническая поддержка***

support@komprod.com

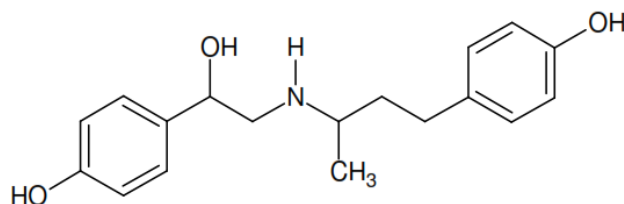
+375 17 336 50 54



## КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ

Рактопамин ИФА представляет собой набор для скрининга рактопамина в различных матрицах методом конкурентного иммуноферментного анализа. Тест основан на антителах специфичных к рактопамину. Набор содержит 96 луночный микротитровальный планшет, а также все основные реагенты, включая готовые стандарты, необходимые для проведения анализа.

## 1. ВВЕДЕНИЕ



Химическая формула рактопамина

Рактопамин является  $\beta$ -адренергическим агонистом, который действует как агент, вызывающий перераспределение питательных веществ в организме домашних животных между жировой тканью и мышцами. Таким образом, рактопамин является стимулятором роста, его применение запрещено в странах ЕС. Однако в США рактопамин используется в качестве кормовой добавки для свиней. В результате все мясо, экспортируемое в ЕС, должно пройти первичный скрининг быстрым методом, таким как иммуноанализ. Для этих целей EuroProxima B.V. разработан иммуноферментный набор для скрининга биологических образцов на наличие рактопамина.

## 2. ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

Набор для проведения ИФА включает 12 сенсibiliзированных стрипов по 8 лунок. Рактопамин, меченный пероксидазой хрена (ферментный конъюгат), стандартные растворы либо растворы проб вносятся в лунки планшета. Свободный рактопамин, присутствующий в пробе либо в стандарте, и рактопамин, маркированный пероксидазой конкурируют за центры связывания антител (конкурентный ИФА). После инкубации в течение 30 мин несвязанные реагенты удаляются на стадии промывки. Количество связанного рактопамина, маркированного ферментом, визуализируется внесением раствора хромогена ( $H_2O_2$ /ТМБ). Связанный конъюгат превращает бесцветный хромоген в окрашенный продукт. Реакция окрашивания останавливается внесением серной кислоты. Интенсивность окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм, она обратно пропорциональна концентрации рактопамина в пробе.

## 3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для данного набора используются кроличьи антитела, полученные против рактопамина, конъюгированного с белком.

Перекрестная чувствительность:

Рактопамин	100%	Сальбутамол	<0,1%
Кленбутерол	<0,1%	Сальметерол	<0,1%
Фенотерол	<0,1%	Изоксуприн	<0,1%
Ритодрин	<0,1%		

Предел обнаружения (LOD) определяли при оптимальных условиях и вычисляли как  $X_n + 3SD$ . LOD в ppb приведен в таблице.

Матрикс	Процедура	LOD нг/мл (ppb)
Молоко	8.1	0.04
Ткани	8.2	0.1
Печень	8.2	0.4
Корма	8.3	2.0
Сыворотка крови	8.4	0.4
Моча	8.5	1.0

#### 4. УСЛОВИЯ ОБРАЩЕНИЯ И ХРАНЕНИЕ

- Набор реагентов должен храниться при температуре от +2 °С до +8 °С в темном месте. Не замораживать.

- После истечения срока годности невозможно гарантировать приемлемое качество.

- Перед проведением анализа все компоненты тест-набора, включая микротитровальный планшет, должны быть доведены до комнатной температуры.

- Следует избегать появления конденсата в лунках планшета. Планшет должен быть согрет до температуры окружающей среды перед вскрытием упаковки.

- Необходимо избегать любого прямого воздействия света на раствор хромогена.

Следующие показатели могут являться признаком порчи реагентов:

- Голубая окраска раствора хромогена перед внесением в лунки

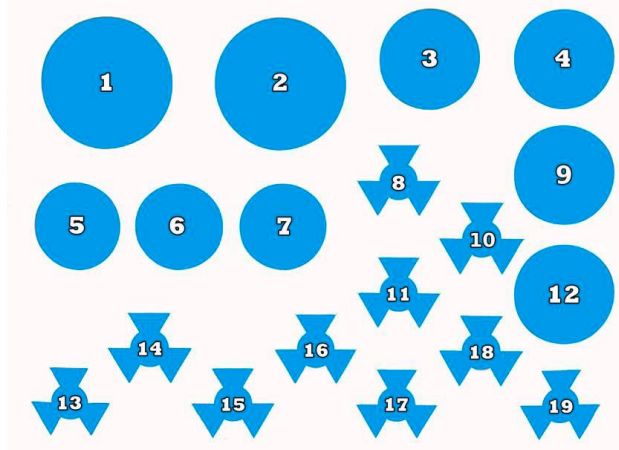
- Слабая либо отсутствующая реакция окрашивания нулевого градуировочного раствора ( $E_{450\text{нм}} < 0,8$ )

#### 5. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Инструкция

Один запечатанный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок), сенсibilизированный антителами. 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 (лиофилизат, голубая крышка)
6. Конъюгат (лиофилизат, голубая крышка)
7. не используется
8. Градуировочный раствор (1 мл, готов для применения), 100 нг/мл
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) 0,063 нг/мл
15. Градуировочный раствор 2 (1 мл, готов для применения) 0,125 нг/мл
16. Градуировочный раствор 3 (1 мл, готов для применения) 0,25 нг/мл
17. Градуировочный раствор 4 (1 мл, готов для применения) 0,5 нг/мл
18. Градуировочный раствор 5 (1 мл, готов для применения) 1 нг/мл
19. Градуировочный раствор 6 (1 мл, готов для применения) 2 нг/мл

## 6. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- перчатки;
- вытяжной шкаф;
- испаритель;
- гомогенизатор (вортекс, миксер);
- автоматическое устройство для промывки планшетов либо 8-канальная микропипетка 100-300 мкл;
- шейкер для микропланшетов;
- микропланшетный фотометр с фильтром 450 нм;
- пипет-дозаторы 10-100 мкл;
- пипет-дозаторы 100-1000 мкл;
- пипет-дозатор 2,5 мл;
- ацетонитрил.

## 7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Рактопамин является токсичным компонентом. Следует избегать контакта с кожей и ротовой полостью. Не вдыхать.
- Стоп-реагент содержит серную кислоту в концентрации 0,5 М. Не допускать контакта реагента с кожей.
- Избегать контакта биологических проб с кожей и слизистыми.
- Не пипетировать ртом.
- Не допускается есть, пить, курить, хранить или готовить пищу, 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 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

### 8.1 Молоко

- отберите 2 мл молока в чистую пробирку;
- добавьте 8 мл ацетонитрила и энергично перемешайте на вортексе;
- перемешивайте, переворачивая пробирку в течение 10 минут;
- центрифугируйте в течение 10 минут при 2000g и 20-25 °С или позвольте сформироваться супернатанту пассивно;
- оберите 2 мл супернатанта в стеклянную пробирку;
- выпарите образец под слабым потоком азота или сжатого воздуха при 50 °С;
- растворите осадок в 250 мкл буфера для разведения, энергично встряхните;
- используйте 25 мкл полученного раствора в ИФА.

### 8.2. Ткань и печень

- удалите жир и тщательно измельчите образец миксером до однородной массы;
- перенесите 1 г гомогенизированного образца в пробирку для центрифугирования с завинчивающейся крышкой, добавьте 4 мл ацетонитрила и хорошо перемешайте на вортексе;
- встряхивайте, переворачивая пробирку в течение 30 минут;
- центрифугируйте в течение 10 минут при 2000g и 20-25 °С;
- перенесите 1 мл супернатанта в новую пробирку для центрифугирования и выпарите образец досуха под слабым потоком азота или сжатого воздуха при 50°С;

- осадок растворите в 500 мкл буфера для разведения, тщательно встряхните;
- аликвоту 50 мкл разбавьте 50 мкл буфера для разведения, перемешайте на вортексе;
- используйте 25 мкл полученного раствора в ИФА.

### 8.3 Корма

- измельчите репрезентативное количество образца;
- смешайте 2 г образца с 8 мл ацетонитрила;
- перемешайте на вортексе в течение 1 минут;
- встряхивайте, в течение 10 минут переворачивая пробирку при 20-25 °С;
- центрифугируйте в течение 10 минут при 2000g и 20-25 °С;
- перенесите 0,5 мл супернатанта в стеклянную пробирку;
- выпарите образец досуха под слабым потоком азота или сжатого воздуха при 50°С;
- осадок растворите в 500 мкл буфера для разведения, тщательно встряхните;
- смешайте 100 мкл раствора с 400 мкл буфера для разведения кормов и мочи;
- используйте 25 мкл раствора в ИФА.

### 8.4 Сыворотка

- отберите 1 мл сыворотки в чистую пробирку;
- добавьте 4 мл ацетонитрила и перемешайте, переворачивая пробирку в течение 10 минут;
- центрифугируйте в течение 10 минут при 2000g и 20-25 °С;
- перенесите 1 мл прозрачного верхнего слоя в стеклянную пробирку;
- выпарите образец под слабым потоком азота или сжатого воздуха при 50 °С;
- растворите осадок в 400 мкл буфера для разведения, энергично встряхните;
- используйте 25 мкл полученного раствора в ИФА.

### 8.5 Моча

- мутную мочу центрифугируйте в течение 5 минут при 2000g и 20-25 °С;
- смешайте 100 мкл мочи с 400 мкл с буфером для разведения кормов и мочи;
- используйте 25 мкл полученного раствора в ИФА.

## **9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ**

Перед началом испытаний реагенты должны быть доведены до температуры окружающей среды. Любые неиспользованные реагенты должны быть немедленно возвращены на хранение в температуру 2–8°С. Реагенты необходимо готовить непосредственно перед использованием.

### Микротитровальный планшет

Верните неиспользованные лунки в закрывающийся пакет с осушителем и храните при температуре 2–8°С до использования в последующих анализах. Сохраните также рамку для лунок.

### Буфер для разведения (концентрированный 4 х)

Буфер для разведения поставляется в концентрации 20х. Перед приготовлением (20 мл буфера + 60 мл дистиллированной воды) необходимо довести температуру концентрата до 20–25°С и тщательно его перемешать (возможно образование осадка). Разведенный буфер необходимо хранить при температуре 2–8°С.

### \*Буфер для разведения образцов мочи и кормов

Добавьте 1 г обезжиренного сухого молока в 8 мл буфера для разведения (глава 5, п. 1).

### Раствор конъюгата

Восстановить лиофилизированный конъюгат (рактопамин-пероксидаза) в 5 мл буфера для разведения, тщательно перемешать и хранить в темноте до использования. Сразу после использования поместить флакон в темноту, хранить при температуре от + 2°С до + 8°С. Для длительного хранения готовят аликвоты и хранят их при -20 °С до истечения срока годности.

### Буфер для промывки (концентрированный 20 х)

Буфер для промывки поставляется в концентрации 20х. Буфер необходимо приготовить непосредственно перед использованием. На один стрип необходимо 40 мл разведенного раствора (2 мл концентрата буфера + 38 мл дистиллированной воды).

### Градуировочный раствор рактопамина (100 нг/мл)

Чтобы подготовить стандарты в соответствующей матрице или подготовить спайки, используйте градуировочный раствор, содержащий 100 нг/мл рактопамина. Разведите

градуировочный раствор в подходящей матрице в соответствующей степени для получения следующих концентраций: 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,063 нг/мл. Также должна быть матрица, не содержащая рактопамин (нулевой градуировочный раствор, 0 нг/мл).

#### Раствор субстрата/хромогена

Раствор субстрата/хромогена (готовый к применению). Довести температуру раствора до комнатной (в темноте), перед пипетированием перемешать содержимое (возможно образование осадка при 4°C).

## **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) повторить три раза.

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.

### Промывание 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);

2. внести 100 мкл нулевого стандарта в двух повторностях (лунки H1, H2, холостая проба);

внести 25 мкл нулевого стандарта (макс. опт. плотность, Bmax) в двух повторностях (нулевой стандарт, лунки A1, A2);

внести 25 мкл каждого градуировочного раствора в двух повторностях (лунки от B1, B2 до G1, G2, например 0,063, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 нг/мл);

3. внести по 25 мкл раствора каждого образца в двух повторностях в оставшиеся лунки планшета;

4. внести по 75 мкл конъюгата во все лунки за исключением H1 и H2;

5. планшет запечатать и перемешать в течение нескольких секунд его содержимое (на шейкере для микротитровальных планшетов либо аккуратными круговыми движениями);

6. планшет инкубировать в течение 30 мин в темноте при температуре 20-25°C;

7. удалить раствор из микротитровального планшета и промыть 3 раза буфером для промывки;

8. внести по 100 мкл раствора субстрата во все лунки;

9. инкубировать планшет в темноте в течение 30 минут при температуре 20°C - 25°C;

10. внести по 100 мкл стоп-реагента во все лунки;

11. сразу же измерить оптическую плотность при 450 нм.

## 11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значения ОП образцов, измеренные в этом анализ, преобразуются в соответствующие концентрации следующим образом:

Среднее значение оптической плотности (ОП) холостых лунок вычитается из индивидуальной ОП. лунок, содержащих стандарты и образцы. Тогда эти значения ОП стандартов и образцов (средние значения дубликатов) делятся на среднее значение ОП нулевого стандарта и умножается на 100. Таким образом, нулевой стандарт становится равным 100% (максимальное поглощение), а остальная ОП. значения указаны в процентах от максимального поглощения.

Значения, рассчитанные для стандартов, вводятся в полулогарифмический график зависимости концентрации аналита.

Альтернатива калибровочной кривой:

Значения абсорбции (logit) расчета стандартов отложены на оси Y в зависимости от эквивалентной концентрации аналита на логарифмической оси X.

Для удобства клиентов R-Biopharm предлагает 2 программы, которые можно использовать для интерпретации результатов ИФА:

- RIDASOFT®Win.NET Food & Feed (артикул Z9996FF). В этой программе все тесты R-Biopharm ELISA (включая EuroProxima) предварительно запрограммированы в базе данных. Список совместимых ридеров предоставляется по запросу.

- Simplefit. Эта программа на базе Excel разработана для расчета результатов всех тестов EuroProxima.

### 8.1 Молоко

Значения эквивалентов лактопамина, считанные с калибровочной кривой, необходимо умножить на 0,625.

### 8.2 Образцы печени и тканей

Значения эквивалентов лактопамина, считанные с калибровочной кривой, необходимо умножить на 5.

### 8.3 Образцы кормов

Значения эквивалентов лактопамина, считанные с калибровочной кривой, необходимо умножить на 25.

### 8.4 Образцы сыворотки

Значения эквивалентов лактопамина, считанные с калибровочной кривой, необходимо умножить на 2.

### 8.5 Моча

Значения эквивалентов лактопамина, считанные с калибровочной кривой, необходимо умножить на 5.

## 12. ЛИТЕРАТУРА

Нет данных.

## 13. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Для заказа теста Лактопамин ИФА используйте каталожный код 5061РАСТ.

## 14. ИСТОРИЯ ИЗМЕНЕНИЙ

Обновлен п. 11.