

ТЕТРАЦИКЛИН ИФА

5091ТС [2]06.21

Конкурентный иммуноферментный анализ для
скрининга и количественного анализа тетрациклина 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

+7 499 649 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 704 05 50



**Официальный дистрибьютор
в Беларуси:**

ОДО "КомПродСервис"

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

www.komprod.com

Техническая поддержка

support@komprod.com

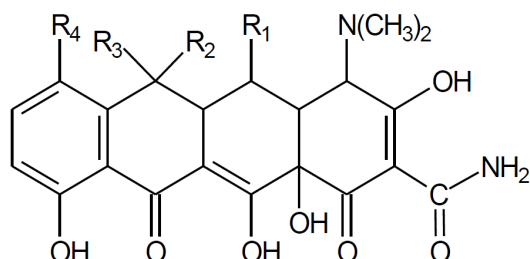
+375 17 336 50 54



Краткая информация

ТЕТРАЦИКЛИН ИФА представляет собой конкурентный иммуноферментный анализ для измерения концентрации группы тетрациклиновых антибиотиков в различных матрицах. Этот набор для ИФА рассчитан на 96 анализов. Образцы и стандарты измеряются в двух параллелях, то есть всего можно проанализировать 40 образцов. Набор ИФА содержит все реагенты, включая стандарты, необходимые для проведения теста. Реагенты для пробоподготовки не включены.

1. ВВЕДЕНИЕ



	R1	R2	R3	R4
Тетрациклин	H	OH	CH ₃	H
Окситетрациклин	OH	OH	CH ₃	H
Хлортетрациклин	H	OH	CH ₃	Cl
Доксициклин	OH	H	CH ₃	H

Тетрациклины представляют собой группу антибиотиков, полученных из *Streptomyces spp.* с широким спектром активности в отношении грамотрицательных и грамположительных аэробных и анаэробных бактерий. Из-за их широкого спектра действия, низкой токсичности и низкой стоимости тетрациклины часто используются в качестве кормовых добавок для сельскохозяйственных животных (включая медоносных пчел) и в аквакультуре. Наиболее часто используемые тетрациклины в ветеринарии – это тетрациклин (ТС), окситетрациклин (ОТС), хлортетрациклин (СТС) и доксициклин (DC).

Тетрациклины связываются с 30S-субъединицей микробных рибосом. Они ингибируют синтез белка, блокируя присоединение аминоацил-тРНК к А-сайту рибосомы. Таким образом предотвращается введение новых аминокислот в зарождающуюся пептидную цепь. Ингибируя синтез белка, ТК вызывают клеточную гибель бактериальной клетки. Действие тетрациклинов обратимо при отмене препарата.

Остатки антибиотика в пищевых продуктах животного происхождения могут быть из-за неправильного соблюдения времени вывода. В ЕС установлены максимально допустимые уровни остатков (MRL) для ТС, ОТС, СТС и DC: 100 мкг/кг в мышцах и молоке, 200 мкг/кг в яйцах, 300 мкг/кг в печени и 600 мкг/кг в почках. Для ТС, ОТС и СТС эти MRL выражены как сумма исходного препарата и его 4-эпимера, тогда как для DC в MRL включено только исходное соединение.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ

Микропланшет для титрования состоит из 12 стрипов по 8 лунок в каждом, предварительно покрытых специфическими антителами к тетрациклину. В лунки добавляют меченый пероксидазой хрена тетрациклин (конъюгат тетрациклин-HRP), тетрациклин (стандартный раствор или образец). Тетрациклин и конъюгат тетрациклин-HRP конкурируют за сайты связывания специфических антител (конкурентный иммуноферментный анализ).

После этапа инкубации (1 час) несвязанные реагенты удаляют промывкой планшета. Добавляют раствор субстрат/хромогена (тетраметилбензидин, ТМБ). Связанный конъюгат тетрациклин-HRP окрашивает бесцветный субстрат.

Реакцию субстрата останавливают добавлением серной кислоты. Интенсивность окраски измеряют фотометрическим методом при 450 нм. Оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации тетрациклина в образце.

3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Тетрациклин ELISA использует антитела, выработанные у мышей, против тетрациклина, конъюгированного с белком. Характер реактивности антитела:

Перекрестная реактивность:	Тетрациклин	100%
	4-эпитетрациклин	87%
	Ролитетрациклин	67%
	4-эпиокситетрациклин	52%
	Окситетрациклин	52%
	Хлортетрациклин	51%
	Демеклоциклин	41%
	Доксициклин	23%
	4-эпихлортетрациклин	20%
	Метациклин	11%

Перекрестную реактивность определяют в буферной системе. Указанные значения могут отличаться в образцах из-за матричных эффектов. Тест не может различать аналиты и перекрестно-реактивные вещества.

Предел обнаружения (LOD) определяется в оптимальных условиях. Критерии отсечки требуют критического рассмотрения.

Матрица	Процедура	LOD (ppb)
Молоко	8.1	0,4
Мед	8.2	1,7
Ткани/печень	8.3	2,9
Креветки	8.4	1,3
Яйцо	8.4	4,0
Масло сливочное	8.5	2,1

4. УСЛОВИЯ ОБРАЩЕНИЯ И ХРАНЕНИЕ

- Набор реагентов и его компоненты должны храниться в холодильнике при температуре от +2°C до +8°C, в темном месте, до и после использования.
- После истечения срока годности качество работы набора не гарантировано.
- Перед проведением анализа все компоненты тест-набора, включая микротитровальный планшет, должны быть доведены до комнатной температуры. Избегайте конденсации влаги в лунках планшета, не извлекайте планшет из упаковки до того, как планшет нагреется до комнатной температуры.
- Разбавляйте компоненты набора непосредственно перед использованием, но после того, как компоненты будут доведены до комнатной температуры.
- Избегайте образования конденсата в лунках планшета. Доведите запечатанный планшет до температуры окружающей среды, прежде чем открывать упаковку.
- Необходимо избегать любого прямого воздействия света на раствор хромогена.
- Хромогенный раствор субстрата можно хранить в холодильнике (от 2°C до 8°C) до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Следует избегать воздействия света на раствор хромогена.

Признаки порчи реагентов:

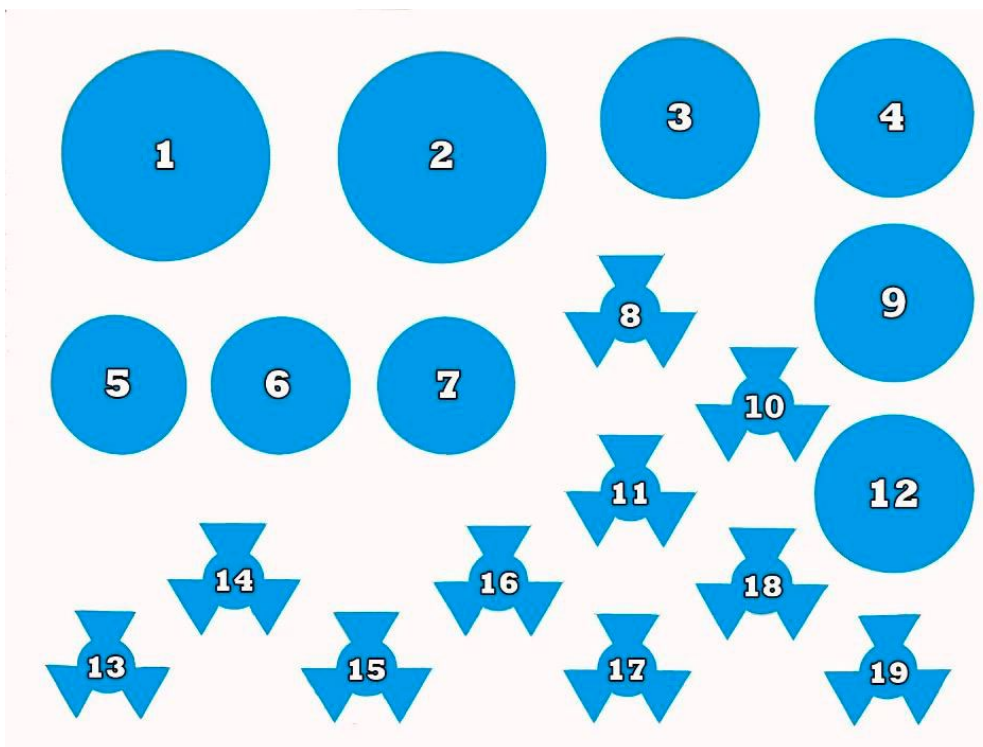
- Синяя окраска раствора субстрата перед переносом его в лунки.
- Слабая или отсутствующая цветовая реакция нулевого стандарта (E450nm <0,8).

5. СОСТАВ НАБОРА

Инструкция

Один запечатанный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к мышинным IgG). Планшет готов к использованию.

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



1. Буфер для разведения (20 мл, концентрат x4)
2. Буфер для промывки планшета (30 мл, концентрат x20)
3. Раствор субстрата (12 мл, готов для применения)
4. Стоп-реагент (15 мл, готов для применения)
5. Конъюгат (лиофилизированный, синяя крышка)
6. Стандарт тетрацилина (лиофилизированный 2 нг/мл, черная крышка)
7. Стандарт тетрацилина (лиофилизированный 1000 нг/мл, черная крышка)
8. не используется
9. Буфер МТС (14 мл, готов к использованию)
10. не используется
11. не используется
12. не используется
13. не используется
14. не используется
15. не используется
16. не используется
17. не используется
18. не используется
19. не используется

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- стеклянные пробирки по 4 мл
- Пробирки на 15 мл с завинчивающейся крышкой (полипропилен)
- Весы и сосуды для взвешивания
- Перчатки
- Вытяжной шкаф
- Гомогенизатор (вортекс, миксер)

- Центрифуга (2000 x g)
- Автоматический промыватель микротитрационных планшетов или 8-канальная микропипетка 100 – 300 мкл
- Шейкер для микротитровальных планшетов
- Ридер для микротитровальных планшетов с фильтром 450 нм
- Микропипетки, 100 – 1000 мкл
- Мультипипетка с наконечниками combitips 2,5 мл
- Пипетка Пастера
- Метанол 100%
- Двухосновный натрий (Na_2HPO_4)
- Дигидрат цитрата натрия ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Дистиллированная вода
- Н-гексан

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Этот набор может содержать опасные вещества. Примечания о них см. в соответствующих паспортах безопасности (SDS).
- Избегайте контакта всех реагентов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите, не храните, не готовьте продукты, не наносите косметику в пределах отведенной рабочей зоны.
- Не используйте компоненты с истекшим сроком годности и не используйте компоненты из разных партий в одном анализе.
- Каждая лунка используется как оптическая кювета при измерениях. Поэтому не прикасайтесь к нижней поверхности лунок, чтобы не допустить повреждения и загрязнения.
- Перед использованием все компоненты должны быть полностью растворены. Обратите особое внимание на субстрат и промывочный буфер, которые кристаллизуются при $+4^\circ\text{C}$.
- Оптимальные результаты будут получены при строгом соблюдении данного протокола. Тщательное пипетирование и промывание на протяжении всей процедуры необходимы для поддержания хорошей точности и аккуратности анализа.

8. ПРОБОПОДГОТОВКА

8.1. Молоко

Для образцов неразбавленного обезжиренного молока эффект матрицы является критическим фактором. Чтобы избежать остатков жира в образце, строго следуйте инструкции. pH образца — еще одна потенциальная ловушка. Кислое молоко мешает ИФА, необходима нейтрализация pH.

Сухое молоко

Добавьте воду к сухому молоку, чтобы получить «молоко». Например, к 1 г сухого молока добавляется 9 мл дистиллированной воды

Процедура:

- Центрифугируйте образцы холодного молока при 2000 g в течение 15 минут при 4°C .
- Удалите верхний жировой слой с помощью шпателя

- Пипеткой переместите 0,75 мл обезжиренного молока в чистую пробирку, добавьте 0,25 мл буфера МТС (глава 5, № 9), тщательно встряхните.
- Внесите пипеткой 100 мкл разбавленного молока в 200 мкл буфера для разбавления образца (см. главу 9), перемешайте на вортексе.
- Используйте 50 мкл этого раствора в ИФА.

8.2. Мёд

- Взвесьте 1 г образца, добавьте 1,5 мл 80% метанола (раствор метанола в воде (80:20)).
- При необходимости подогрейте мед 15 минут, 50°C, встряхните, перемешивайте в течение 15 минут.
- Центрифугируйте при 2000 г в течение 5 минут (20°C - 25°C)
- Разбавьте 50 мкл этого раствора 350 мкл буфера для разбавления образца (см. главу 9), перемешайте на вортексе.
- Используйте 50 мкл этого раствора в ИФА.

8.3 Ткани/печень

- Тонко нарежьте и гомогенизируйте образец ткани, взвесьте 1 г этого образца в чистой пробирке.
- Добавьте 0,5 мл дистиллированной воды, 1,5 мл 100 % метанола, перемешайте на вортексе в течение 15 минут.
- Центрифугируйте при 2000 г в течение 5 минут (20°C - 25°C)
- Возьмите 50 мкл этого раствора и добавьте 350 мкл буфера для разбавления, чтобы разбавить образец (см. главу 9), перемешайте на вортексе.
- Используйте 50 мкл этого раствора в ИФА.

8.4 Креветки/яйцо

- Взвесьте 1 г гомогенизированных креветок или яиц в пластиковую пробирку объемом 15 мл.
- Добавьте 3 мл буфера McIlvain pH 7
- Тщательно встряхните и перемешайте образцы в течение 10 минут.
- Центрифугируйте образцы при 2000 x g в течение 10 минут.
- Перенесите 50 мкл супернатанта в новую пробирку и добавьте 200 мкл буфера для разбавления.
- Используйте 50 мкл этого раствора в ИФА.

8.5 Масло сливочное

- Взвесьте 1 г сливочного масла в центрифужной пробирке на 10 мл.
- Растопите сливочное масло на водяной бане при температуре около 40°C.
- Добавьте 1 мл н-гексана и энергично перемешайте на вортексе в течение 1 минуты.
- Добавьте 1 мл 20% метанола (об./об.; метанол/вода)
- Энергично перемешайте на вортексе в течение 10 секунд и перемешайте образцы, переворачивая пробирку вверх дном, в течение 10 минут.
- Центрифугируйте образцы при 2000 г в течение 10 минут при 4°C.
- Осторожно удалите верхний слой гексана пипеткой Пастера.

- Добавьте 1 мл н-гексана и энергично перемешайте на вортексе в течение 1 минуты.
- Центрифугируйте образцы при 2000 g в течение 10 минут при 4°C.
- Перенесите 1 мл нижнего слоя (водного) во флакон объемом 1,5 мл и поместите флакон в морозильную камеру на 5 минут при -20°C.
- Центрифугируйте образцы при 2000 x g в течение 5 минут (20°C - 25°C).
- Разбавьте 50 мкл водной фазы, добавив 800 мкл буфера для разбавления образца (см. главу 9).
- Используйте 50 мкл этого раствора в ИФА.

9. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед началом теста реагенты должны быть доведены до комнатной температуры. Неиспользованные реагенты следует немедленно вернуть на хранение при температуре от +2°C до +8°C.

Приготовьте свежие реагенты перед использованием.

Микротитровальный планшет

Верните неиспользованные стрипы в герметичный пакет с влагопоглотителем и храните при температуре от +2°C до +8°C для использования в последующих анализах. Сохраните также каркас для стрипов.

Буфер для разбавления

Буфер для разбавления – 4-кратный концентрат. Разбавьте буфер 1:4 (1 мл буфера + 3 мл дистиллированной воды) перед использованием.

Буфер для разбавления образца

Буфер для разбавления образца не входит в набор. Чтобы приготовить этот буфер, возьмите 18 мл буфера для разбавления, добавьте 2 мл 100% метанола, перемешайте и храните этот буфер при 4°C до использования.

Стандарт 2 нг/мл

Подготовьте диапазон разведения стандартов тетрациклина. Добавьте 2 мл буфера для разведения образца к стандарту и перемешайте. Этот раствор содержит 2 нг тетрациклина на мл. Пипеткой внесите 0,25 мл этого раствора в чистую пробирку и добавьте 0,25 мл буфера для разбавления образца. Продолжайте делать разведение в диапазоне 1,0, 0,5, 0,25, 0,125 и 0,0625 нг/мл.

Стандарт 1000 нг/мл

Этот стандарт – спайк раствор.

Добавьте 1 мл буфера для разведения образца к стандарту и перемешайте. Этот раствор содержит 1000 нг тетрациклина на мл.

Конъюгат

Добавьте в флакон с лиофилизированным конъюгатом (тетрациклин-HRP) 6 мл буфера для разведения, тщательно перемешайте и храните в темноте до использования.

Промывочный буфер

Промывочный буфер – 20-кратный концентрат. Приготовьте свежие растворы перед использованием. Для каждого стрипа необходимо 20 мл разбавленного промывочного буфера (1 мл концентрированного промывочного буфера + 19 мл дистиллированной воды).

Раствор субстрата/хромогена

В растворе субстрата/хромогена (готов к использованию) может образовываться осадок при +4°C. Доведите этот реагент до комнатной температуры перед использованием (хранить в темноте) и перемешайте его перед пипетированием.

Буфер McIlvain

Приготовьте 0,2 М раствор двухосновного натрия:

Na_2HPO_4 28,4 г + дистиллированная вода до 1 литра

Приготовьте 0,1 М раствор тринатрийцитрата дигидрата:

$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 29,4 г + дистиллированная вода до 1 литра

Смешайте вышеуказанные растворы 1 : 1, проверьте pH; отрегулируйте pH до 7,0 с помощью HCl

Перед использованием разбавьте 1 : 1 метанолом.

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, чтобы 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. 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 (пробоподготовка) и подготовить реагенты в соответствии с главой 9 (приготовление реагентов);

2. Внесите пипеткой 100 мкл буфера для разбавления образца в двух параллелях (лунки H1, H2, холостые).

Внесите пипеткой 50 мкл буфера для разбавления образца (нулевой стандарт, Bmax) в двух параллелях (лунки A1, A2).

Внесите пипеткой по 50 мкл каждого стандартного раствора в двух параллелях (лунки В1,2–G1,2, т.е. 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 и 2,0 нг/мл).

3. Пипеткой внесите по 50 мкл каждого раствора образца в двух экземплярах в оставшиеся лунки микропланшета.

4. Внесите по 50 мкл раствора конъюгата (тетрациклин-HRP) во все лунки, за исключением H1 и H2;

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

6. Инкубируйте планшет в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре (20-25°C);

7. Удалите раствор из планшета и промойте 3 раза буфером для промывки;

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

9. Инкубируйте планшет в темноте в течение 30 минут при комнатной температуре (20 – 25°C);

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

11. Сразу же измерьте оптическую плотность при 450 нм.

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычтите среднее значение оптической плотности (ОП) лунок H1 и H2 (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 стандартного раствора (лунки A1 и A2) 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.

$$\frac{\text{ОП стандарта (или образца)}}{\text{ОП нулевого стандарта}/B_{max}} \times 100 = \% \text{ макс. абсорбции}$$

Калибровочная кривая:

Значения (процент максимальной абсорбции), рассчитанные для стандартов, нанесены (на оси Y) в зависимости от эквивалентной концентрации аналита (нг/мл) на логарифмической оси X.

Альтернатива калибровочной кривой:

Расчетное значение поглощения (logit) стандартов отложено по оси Y в зависимости от эквивалентной концентрации аналита по логарифмической оси X.

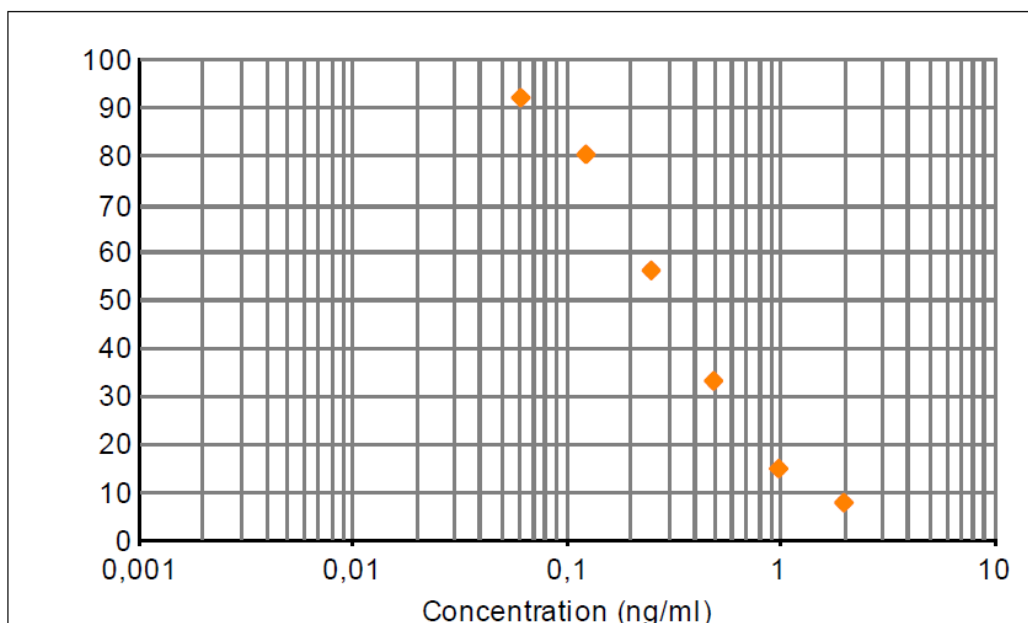


Рисунок 1: Пример калибровочной кривой

Количество тетрациклинов в образцах выражено в эквивалентах тетрациклина. Эквиваленты тетрациклина в образцах (нг/мл), соответствующие максимальному поглощению каждого экстракта в процентах, можно определить по калибровочной кривой.

8.1 Молоко и сухое молоко

Чтобы получить содержание тетрациклина в образцах молока или сухого молока, полученную концентрацию тетрациклина необходимо умножить на коэффициент 4.

8.2 Мед

Чтобы получить содержание тетрациклина в образцах меда, полученную концентрацию тетрациклина необходимо умножить на коэффициент 20.

8.3 Ткани/печень

Чтобы получить содержание тетрациклина в образцах ткани или печени, полученную концентрацию тетрациклина необходимо умножить на коэффициент 24.

8.4 Креветки/яйцо

Чтобы получить содержание тетрациклина в образцах креветок или яиц, полученную концентрацию тетрациклина необходимо умножить на коэффициент 20.

8.5 Масло сливочное

Чтобы получить содержание тетрациклина в образцах сливочного масла, полученную концентрацию тетрациклина необходимо умножить на коэффициент 34.

12. ЛИТЕРАТУРА

Mechanism of Action of Tetracyclines.

<http://pharmaxchange.info/press/2011/05/mechanism-of-action-of-tetracyclines/>

Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990. Off. J. Eur. Commun. 1990, L224,

1-8.

Commission Regulation (EC) No 508/1999 of 4 March 1999. Off. J. Eur. Commun. 1999, L60, 16-52.

13. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Для заказа набора tetracycline ELISA используйте артикул 5091TC.