CH 6.7. Stanovenie chloramfenikolu metódou ELISA v surovinách rastlinného a živočíšneho pôvodu

1. Pôvod metódy

Návod k kitu Elisa, EURO- PROXIMA, The Netherlands, dodávateľ firma Noack-Slovakia, spol. s.r.o

2. Princíp metódy

Chloramfenikol CAP EIA je kompetitívna enzýmová imunoanalýza. Každá jamka je potiahnutá ovčou protilátkou pre králičiu IgG. Špecifická protilátka (rabbit anti-CAP),enzýmovo značený CAP (konjugát) a CAP štandard alebo vzorky sa pridávajú do jamiek a následne inkubujú. Špecifické protilátky sa naväzujú pomocou imobilizovaných protilátok a v rovnakom čase voľný CAP (prítomný v štandardoch alebo vo vzorkách) a enzýmovo konjugovaný CAP súperia o CAP väzbové miesto protilátky (kompetitívna enzýmová inunoanalýza). Po hodinovej inkubácii nenaviazané (enzýmovo značené) reagenty sa odstránia premytím. Množstvo CAP enzýmového konjugátu sa zvýrazní pridaním chromogénového substrátu (tetramethylbenzidine, TMB). Naviazaný konjugát zmení farbu z bezfarebného na farebný produkt. Reakcia so substrátom je ukončená pridaním stop roztoku (kyselina sírová). Intenzita sfarbenia sa meria fotometricky pri 450nm. Optická hustota je nepriamo úmerná CAP koncentrácii vo vzorke.

3. Použité prístroje

Elisa reader
centrifúga
trepačka
mixér

4. Zoznam chemikálií

octan etylnatý
izooktán
chloroform
roztoky z kitu

5. Príprava štandardov a pracovných roztokov

Pracovné roztoky pripraviť podľa návodu v kite.

Štandardné roztoky 2.0; 0.5; 0.2; 0.1; 0.05; 0.025 ng / ml. sú pripravené v riediacom pufre, v kite pripravené na priame použitie.

Ak sa používajú altrnatívne matrice vzoriek, štandardy alebo spiky, musia sa pripraviť do matrice vzorky pomocou 100ng/ml roztoku štandardu v kite.

Skladovať v tme pri +2-8°C.

Štandard 100ng/ml: na prípravu štandardov alebo spikov použiť roztok štandardu 100 ng CAP na ml. Riediť štandard v príslušnej matrici, tak, aby sa dosiahol rozsah 2; 0.5; 0.2; 0.1; 0.05; 0.025 ng/ml (voliteľne:0.0125ng/ml). Taktiež nulový štandard môže byť rovnaká matrica.

premývací pufer (risning buffer): 20 x koncentrovaný

Pripraviť pred analýzou.

Na jeden strip je potrebných asi 40ml nariedeného pufru.

(2ml koncentrátu+38ml dest.vody)

riediaci pufer (dilution puffer): 4 x koncentrovaný

Pred nariedením nechať vytemperovať na izbovú teplotu a dôkladne premiešať (20ml koncentrovaného pufru+60ml dest. vody). Nariedený pufer možno skladovať v chladničke pri 2°C–8°C, kým neuplynie doba expirácie uvedená na obale.

Konjugát

Rekonštituovať vialku s lyofilizovanou protilátkou (CAP-HRPO) so 4ml rekonštitučného / nulového pufru, premiešať a uchovávať v tme.

Protilátka (antibody solution)

Rekonštituovať vialku s lyofilizovanou protilátkou so 4ml rekonštitučného / nulového pufru, premiešať a uchovávať v tme.

Substrát

V kite je pripravený na priame použitie. Zráža sa pri 4°C. Pozor na to, aby táto fľaštička bola pri izbovej teplote držaná v tme, pred pipetovaním premiešať.

Rekonštitučný / nulový štandardný pufer: na priame použitie.

Používa sa na prípravu z lyofilizovaného konjugátu a protilátky ako aj nulový štandard.

6. Príprava vzorky

Mlieko:

Vzorky mlieka je možné analyzovať priamo. **Odtučnené sušené mlieko** pripraviť pridaním vody (napr. 10g sušeného mlieka+60ml dest. voda).

10x nižší detekčný limit sa dosiahne extrakčnou metódou.

Sušené mlieko: 10g sušeného mlieka+60ml dest.vody a použitie extrakčnej metódy: CAP ekvivalent odčítať z kalibračnej krivky a musí sa vynásobiť faktorom 0,7 na získanie výsledku v ng CAP/g sušeného mlieka. (faktor 0,7).

použitie priamej metódy: CAP ekvivalent odčítaný z kalibračnej krivky sa musí **vynásobiť 7** (napr. 10g sušeného mlieka+60ml dest.vody) **(faktor7).**

Priama metóda

Pre neriedené odtučnené vzorky mlieka je efekt matrice kritický faktor. Postup musí byť striktne dodržaný, aby sa zabránilo vplyvu tukových častíc. pH vzorky je druhý kritický faktor. Kyslé mlieko ruší EAI test, preto je neutralizácia nevyhnutná.

Centrifugovať studené mlieko 15 minút pri 2000ot./ min. pri teplote 0–4°C. Odstrániť vrchnú tukovú časť pomocou špachtličky. Na analýzu použiť 50µl **(faktor 1)**

CAP ekvivalent v mlieku (ng/ml) sa odčíta priamo z kalibračnej krivky CAP ekvivalent v mlieku (ng/ml) sa odčíta priamo z kalibračnej krivky **(faktor 1)**

Extrakčná metóda

Odtučniť 5ml mlieka ako je to uvedené pri priamej metóde.

Odpipetovať 2,5ml dekantovaného(odtučneného) mlieka do skúmavky, pridať 5ml octanu etylnatého, a pretrepať 1 minútu. Nechať postáť 5-10 minút aby sa fázy oddelili , odpipetovať 4ml (horná vrstva -etylacetátovej) a odpariť pri 50°C pod miernym prúdom dusíka.

Odparok rozpustiť **v 200ul vzorkového zrieďovacieho pufru** (2ml mlieka / 2OOµl pufru) . Na Elisa stanovenie pipetovať **50**µl **. (faktor 0,1)**

Vzorka mlieka je 10 x koncentrovaná a koncentrácia odčítaná z kalibračnej krivky sa musí deliť 10. **(faktor 0,1)**

Moč

Vzorky moču sa analyzujú po 5-násobnom zriedení v pufri. Nižší detekčný limit je možné dosiahnúť extrakčnou metódou. Špeciálne pre „tmavý/špinavý″ moč je táto metóda doporučená. Pri použití priamej metódy skontrolovať pH po nariedení pufrom (pH 7+/-).

Priama metóda

Pridať 800µl pufru k 200µl moču a premiešať. Zmes centrifugovať 10 min. pri 2000 ot./min. Na analýzu zobrať 50µl supernatantu.

Množstvo CAP v moči je vyjadrené ako CAP ekvivalent (ng/ml). CAP ekvivalent v moči (ng/ml) korešponduje s % maximálnej absorbancie pre každú vzorku odčítanú z kalibračnej krivky. Takto vypočítaný CAP ekvivalent vynásobiť 5 na získanie CAP ekvivalentu v moči.
(faktor 5)

Extrakčná metóda

K 1ml moču pridať pár kvapiek 1M kyseliny octovej na úpravu pH na 4,8. Premiešať a pridať 25µl extraktu a inkubovať cez noc pri 37°C alebo 2hodiny pri 55°C. Ochladiť na izbovú teplotu a upraviť pH na 7+/-0,5. Pridať 2ml octanu etylnatého, premiešať 1 minútu. Počkať 5-10 min. na tvorbu separácie a odpariť 1ml vrchnej vrstvy (etyl acetátovej) pri 50°C pod prúdom dusíka. Odparok rozpustiť v 200µl vzorkového riediaceho pufru(0,5ml moču/200µl pufru). Na analýzu použiť 50µl

Vzorky moču ošetrené glukuronidázou a extrahované (0,5ml moču/200µl pufru) sú 2,5-krát koncentrované a koncentrácia odčítaná z kalibračnej krivky musí byť delená 2,5
(faktor 0,4)

Med

Navážiť 3g medu do skúmavky, pridať 3ml dest. vody, premiešať. Pridať 6ml octanu etylnatého, premiešať a 10 minút centrifugovať pri 2000 / min.

Odpipetovať 4ml octanoetylnatej fázy do skúmavky. Odpariť pri 50°C pri miernom prúde dusíka. Zvyšok rozpustiť v 1ml vzorkového zrieďovacieho pufru. Na Elisa stanovenie pipetovať 50µl

Pre výpočet CAP koncentrácie vo vzorke sa musí CAP ekvivalent odčítaný z kalibračnej krivky vydeliť faktorom 2. **(faktor 0,5)**

Poznámka:

Nepurifikovaný med má tendenciu byť „tučný″. Ak sa po odparení vytvoria tukové rezíduá, rozpustiť ich v 1ml zmesi isooktán–trichlormetán v objemovom pomere (2:3). (Miesto zmesi isooktán–trichlormetán možno použiť n hexán. Ak sa použije isooktán-trichlormetán, odpipetuje sa 50µl vrchnej vrstvy, keď n-hexán, odoberie sa 50µl spodnej vrstvy.

Tkanivo (mäso,pečeň, ryby, krevety)

Vzorku zhomogenizovať a navážiť 3g zhomogenizovanej vzorky do skúmavky. Pridať 6ml octanu etylnatého a miešať 10minút. Centrifugovať 10minút pri 2000 otáčok / min. Odpipetovať 4ml octanovoetylnatej fázy do skúmavky a pri 50°C octan odpariť pod miernym

prúdom dusíka. Mastný zvyšok (tukové reziduá) rozpustiť v 1ml zmesi izooktan / trichlormetán v objemovom pomere 2:3 a pridať 1ml vzorkového zrieďovacieho pufru. Premiešať 1 minútu a centrifugovať 10 minút pri 2000 otáčok / minútu. Na Elisa stanovenie pipetovať **50**µl **hornej vrstvy** (2g tkaniva / ml).

Poznámka: V prípade tvorby emulzie vo vrchnej vrstve, skúmavku vložiť do vodného kúpeľa (asi 5 min. pri 80°C) a znova centrifugovať.

Na Elisa stanovenie pipetovať **50**µl **hornej vrstvy(**2g tkaniva / ml).

CAP evivalent vypočítaný z kalibračnej krivky sa musí vydeliť 2 na vyjadrenie koncentrácie (ng/g) v tkanive. **(faktor 0,5)**

(Miesto zmesi isooktán-trichlormetán možno použiť n–hexán. Ak sa použije isooktán–trichlormetán, odpipetuje sa **50**µl vrchnej vrstvy, keď n-hexán, odoberia sa **50**µl spodnej vrstvy.

Lepšia výťažnosť sa dosiahne pri použití zmesi izooktan / trichlormetán.

Alternatívna metóda pre kraby, ryby

Zhomogenizovať asi 50g vzorky. Navážiť 10g zhomogenizovanej vzorky do skúmavky. Pridať 20ml octanu etylnatého, premiešať 10 min. a centrifugovať 10 min. pri 2000 ot./ min. alebo prefiltrovať. Odobrať 10ml etylacetátovej vrstvy do skúmavky a odpariť do sucha pod miernym prúdom dusíka. Mastný zvyšok (tukové reziduá) rozpustiť v 2ml zmesi izooktan/trichlormetán v objemovom pomere 2:3 a pridať 1ml vzorkového zrieďovacieho pufru alebo v 2ml n-hexánu a pridať 1ml vzorkového zrieďovacieho pufru. Premiešať minútu a centrifugovať 10 minút pri 2000 otáčok / minútu.

Poznámka: V prípade tvorby emulzie vo vrchnej vrstve, skúmavku vložiť do vodného kúpeľa (asi 5 min. pri 80°C) a znova centrifugovať 10 minút pri 2000 otáčok / minútu.

Použitím Pasteurovej pipety odobrať číru vrchnú vrstvu (v prípade n-hexánu spodnú vrstvu) do skúmavky. Pridať ďalší 1ml zmesi izooktan/trichlormetán v objemovom pomere 2:3 (alebo 1ml n-hexánu). Dôkladne premiešať a centrifugovať ako je popísané vyššie.

Na Elisa stanovenie pipetovať **50µl hornej vrstvy (**2g tkaniva/ml), v prípade n-hexánu **50**µl **spodnej vrstvy**.

CAP ekvivalent odčítaný z kalibračnej krivky sa musí vydeliť faktorom 5 na získanie ng/g kraba, ryby. **(faktor 0,2)**

Vajcia

Zhomogenizovať celé vajce, navážiť 1g do skúmavky, pridať 6ml octanu etylnatého a miešať 1 minútu. Pri príliš opatrnom miešaní extrakt zgélovatie. Centrifugovať 10 minút pri 2000

otáčok/ minútu, odpipetovať 3ml etylacetátovej vrstvy do skúmavky a odpariť pri 50°C pod prúdom dusíka.

Mastný zvyšok rozpustiť v 1ml zmesi izooktan/trichlormetán v objemovom pomere 2:3 a pridať 0,5ml vzorkového riediaceho pufru. Premiešať 1 minútu a centrifugovať 10 minút pri 2000 otáčkach / minútu.

Pozn.: V prípade emulzie vo vrchnej vrstve ponoriť skúmavku na krátku dobu (približne 5 min) do vodného kúpeľa 80°C a opäť scentrifugovať. Na Elisa stanovenie pipetovať **50**µl **hornej vrstvy** (1g celých vajec, žĺtka alebo bielka / ml vzorkového riediaceho pufru).

CAP ekvivalent v celom vajci, žĺtku alebo bielku (ng/ml) sa odčíta priamo z kalibračnej krivky. **(faktor 1)**

Sérum / plazma

K 1ml séra / plazmy pridať 2ml octenu etylnatého,1 minútu premiešať, nechať postáť 5–10 minút na oddelenie fáz, alebo centrifugovať 10 min. pri 2000 otáčok/min. . Odpipetovať 1ml (horná vrstva etylacetátová) a odpariť pri 50°C pod miernym prúdom dusíka. Zvyšok rozpustiť v 500µl vzorkového riediaceho roztoku (0,5ml séra / plazma / 500µl pufru). Na Elisa stanovenie pipetovať **50**µl **.**

CAP ekvivalent je možné odčítať priamo z kalibračnej krivky. **(faktor 1)**

Krmivo

Väčšie množstvo krmiva zhomogenizovať, navážiť 5g zhomogenizovaného krmiva, pridať 20ml destilovanej vody. Zo zmesi odpipetovať 5ml do skúmavky, pridať 10ml octanu etylnatého a pretrepať 3Ominút. Centrifugovať 10minút pri 2000 otáčkach/minútu. Odpipetovať 5ml hornej vrstvy (etylacetátovej) do skúmavky a odpariť pri 50°C pod miernym prúdom dusíka. Tukové rezíduá rozpustiť v 0,5ml zmesi izooktan/trichlormetán v objemovom pomere 2:3 a pridať 0,5ml vzorkového riediaceho pufru. Premiešať 1 minútu a centrifugovať 10 minút pri 2000 otáčkach/minútu.

Na Elisa stanovenie použiť **50**µl **(horná vrstva).**

Pozn.: V prípade emulzie vo vrchnej vrstve ponoriť skúmavku na krátku dobu (približne 5 min.) do vodného kúpeľa 80°C a opäť scentrifugovať.

Na Elisa stanovenie pipetovať **50**µl **hornej vrstvy.**

CAP ekvivalent sa odčíta priamo z kalibračnej krivky. **(faktor 1)**

7. Podmienky stanovenia

Kit skladovať pri 2-8°C na tmavom mieste. Po uplynutí doby expirácie uvedenej na obale nie je výrobcom zaručená kvalita reagentov. Po vybratí platničky z obalu je potrebné zabrániť tvorbe kondenzácie. Pred otvorením nechať vytemperovať na izbovú teplotu. Rekonštituovať a riediť roztoky pred použitím po vytemperovaní na izbovú teplotu.
Po rekonštutúcii lyofilizovanej protilátky–roztok je stabilný 6 mesiacov pri skladovaní 2-8°C.
Po rekonštutúcii konjugátu - roztok je stabilný 2 mesiace pri skladovaní 2^{-}8°C.

Alternatívne, po rekonštitúcii protilátky a konjugátu, rozdeliť ich na alikvotné podiely a skladovať v mrazničke pri –20°C po dobu jedného roka.
Substrát a štandardy skladovať v chlade pri 2-8°C do doby expirácie uvedenej na obale. Je nutné zabrániť styku chromogénového substrátu so svetlom. Substrát kryštalizuje pri 4°C.
Ak sa spozoruje jedno z vyššie uvedeného, môže to indikovať degradáciu reagentov:- modré sfarbenie substrátu pred pridaním do jamky- slabá alebo žiadna farebná reakcia nulového štandardu E450nm <0,8.
Stop roztok obsahuje 0,5M kyselinu sírovú. TMB substrát je toxický pri vdýchnutí. Každá jamka slúži ako malá optická kyvetka, preto nie je vhodné sa dotýkať jej dna ani z vonkajšej ani z vnútornej strany.

$$\frac{\text{O.D. štandard (alebo vzorka)}}{\text{O. D. nulový štandard}} \times 100 = \%\ \text{maximálnej absorbancie}$$

Kalibračná krivka:
Hodnoty (% z maximálnej absorbancie) vypočítané pre štandardy sú vynesené do grafu (Y os) verzus CAP koncentráciám (mg/ml) na logaritmickej X-osi. Kalibračná krivka je lineárna v rozsahu 0,025-2ng/ml.
Alternatíva kalibračnej krivky:
Hodnoty absorbancie štandardov (logit) sa vynesú na Y-ovú os a CAP ekvivalenty koncentrácií na logaritmickú X-ovú os, alebo použiť programový softwer.

8. Meranie

Pridať l00µl rekonštrukčného/nulového štandardného pufru do jamky A1. Pridať 50µl rekonštrukčného/nulového štandardného pufru do jamky B1. Pridať 50µl štandardov do jamiek a 50µl vzoriek do ďaších jamiek., 25µl konjugátu (CAP–HRPO) do všetkých jamiek, okrem A1.a 25µl antibody roztoku do každej jamky, okrem A1. Prikryť platničku fóliou a

premiešať na trepačke 1 minútu. Inkubovať hodinu v tme pri 4°C (v chladničke). Po inkubácii vyliať roztoky z platničky a mikrotitračnú platničku premyť 3x s premývacím roztokom. Pridať 100µl substrátu do každej jamky a inkubovať 30 minút pri laboratórnej teplote. Pridať 100µl zastavovacieho roztoku do každej jamky. Odčítať hodnotu absorbancie pri 450nm.
Poznámka: v prípade alternatívnych matríc: ak sa používajú alternatívne matrice vzoriek, štandardy alebo spiky sa musia pripraviť do matrice pomocou 100mg/ml roztoku štandardu v kite.

9. Kalibrácia a vyhodnotenie

Údaje sú vyhodnotené 2–parameter/login–log/ metódou, pričom kalibračná krivka udáva závislosť absorbancie od koncentrácie. Zostrojením kalibraćnej krivky (závislosť absorbancie od koncentrácie ng / ml) 6 štandardov môže byť koncentrácia chloramfenikolu určená priamo z kalibračnej krivky alebo pomocou programového sofrwaru.
Odčítať priemernú optickú hustotu (O.D.) blanku-jamka A1 od jednotlivých OD jamiek obsahujúcich štandardy a vzorky. O.D. hodnoty štandardov a vzoriek sú delené priemernou hodnotou O.D. nulového štandardu (jamka B1) a násobené 100.
Nulový štandard je rovný 100% (maximálna absorbancia) a ostatné O.D. hodnoty sú stanovené percentami z maximálnej absorbancie.

CAP–kit využíva špecifickú králičiu protilátku. Reaktivita protilátky:

krížová reaktivita:	chloramfenikol:	100 %
	chloramfenikol-glucuronide:	65 %
	chloramfenikol-base:	‹ 1 %
	Thiamfenikol:	1 %
	Florfenikol: :	‹ 1 %

Kalibračná krivka je prakticky lineárna v rozsahu 0,025–25ng/ml. Kvôli krížovej reaktivite CAP s CAP glukuronidom nie je nutná hydrolýza vzorky pre priame stanovenie.