CH 8.7

Stanovenie deoxynivalenolu v surovinách rastlinného pôvodu metódou ELISA

1. Pôvod metódy

Návod k ELISA kitu, Veratox, Neogen Corporation, distribútor firma Noack

2. Princíp metódy

Veratox pre deoxynivalenol (DON) je priamy kompetitívny ELISA test, ktorý umožňuje získať presné koncentrácie v mg/kg. Voľný DON vo vzorke a kontrolkách je ponechaný v kompetícii s enzýmom značeným deoxyvalenolom (konjugát) na voľných väzobných miestach (protilátka) na mikrotitranej jamke. Po premývacom cykle sa pridáva substrát, ktorý reaguje s naviazaným konjugátom za vzniku modrého sfarbenia. Čím sýtejšia je modrá farba, tým menej toxínu je vo vzorke. Reakcia sa zastaví pridaním zastavovacieho činidla. Optická hustota sa meria pri 650nm Elisa readrom. Obsah DONu vo vzorke sa získa z kalibranej krivky.

3. Použité prístroje

Elisa reader

mixér

trepačka

4. Zoznam chemikálií

Kit Elisa

5. Príprava štandardov a pracovných roztokov

Kit obsahuje pripravené štandardné roztoky o koncentráciách 0; 0,25; 05; l; 2 mg/kg

6. Príprava vzoriek

Zo zhomogenizovanej reprezentetívnej vzorky navážiť l0g a premiešať s l00ml deionizovanej vody. Pretrepať na trepačke 3 minúty. Vzorku nechať postáť 2-3 minúty a obsah banky prefiltrovať. Získaný filtrát použiť na analýzu.

Veratox kit DON je určený pre kvantitatívnu analýzu deoxynivalenolu v obilninách, (jačmeň, kukurica, ovos, múke a výrobkoch z múky).

7. Podmienky stanovenia

Veratox DON sa uskladňuje pri teplote 2-8 ^{o}C a môže sa použiť do dátumu expirácie.

8. Meranie

Pred meraním vytemperovať všetky reagencie na laboratórnu teplotu. Do zmiešavacej jamky (červeno označená) napipetovať l00µl konjugátu a l00µl štandardov a vzoriek. Jamky premiešať trikrát osemkanálovou pipetou. Do jamiek s naviazanou protilátkou (bielo označená) napipetovať l00µl zmesi a inkubovať pri laboratórnej teplote 5 minút. Po ukončení inkubácie obsah jamiek vyliať a 5x premyť deionizovanou vodou. Zvyšok premývacej vody odstrániť vyklepaním platničky na filtračný papier. Do jamiek napipetovať l00µl substrátu, opatrne premiešať a inkubovať 5 minút pri laboratórnej teplote. Po skončení inkubácie napipetovať l00µl zastavovacieho roztoku. Obsah platničky opatrne premiešať. Utrieť spodnú stranu jamiek do sucha a odčítať na ELISA readri pri 650nm do 20 minút od pridania zastavovacieho roztoku.

9. Kalibrácia a vyhodnotenie

Údaje sú analyzované 2-parameter (login–log) metódou, pričom kalibračná krivka udáva zvislosť absorbancie od koncentrácie. Zostrojením kalibračnej krivky môže byť koncentrácia DONu určená odčítaním priamo z kalibračnej krivky alebo pomocou programového softwaru.