CH 8.8

Stanovenie zearalenonu v surovinách rastlinného pôvodu metódou ELISA

1. Pôvod metódy

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

2. Princíp metódy

Veratox pre zearalenon je priamy kompetitívny Elisa test, ktorý umožňuje získať presné koncentrácie v µg/kg. Voľný zearalenon vo vzorkách a kontrolkách je ponechaný v kompetícii s enzýmom značeným zearalenolom (konjugát) na voľných miestach (protilátka) na mikrotitračnej jamke. Po premývacom cykle sa pridáva substrát, ktorý reaguje s naviazaným konjugátom a reakciu farbí na modro. Sýtejšia modrá farba znamená menej zearalenolu. Optická hustota sa odčíta na ELISA readri pri 650nm. Veratox zearalenon kit je určený pre kvantitatívnu analýzu zearalenonu v kukurici, pšenici, jačmeni

3. Použité prístroje

Elisa reader

mixér

trepačka

4. Zoznam chemikálií

metanol g.g

kit Elisa

5. Príprava štandardov a pracovných roztokov

Kit obsahuje štandardné roztoky o koncentráciách 0; 25; 75; l50; 500 µg/kg.

6. Príprava vzoriek

Z reprezentetívnej zhomogenizovanej vzorky odvážiť 5g vzorky a premiešať trepaním na trepačke s 25ml 70% metanolom 3 minúty. Prefiltrovať. Vzorkový extrakt zriediť l:4. Takto je vzorka pripravená na meranie.

7. Podmienky stanovenia

Kit sa uskladňuje v chladničke pri teplote 2–8°C a môže sa používať do dátumu expirácie.

8. Meranie

Pred použitím vytemperovať všetky reagencie na laboratórnu. 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) prepipetovať l00µl zmesi. Premiešať obsah a inkubovať 5 minút pri laboratórnej teplote. Po ukončení inkubácie vyprázdniť jamky vyliatím a premyť 5x deionizovanou vodou. Nakoniec odstrániť zvyšky vody poklepaním platničky na filtračný papier. Do jamiek napipetovať l00µl substrátu a obsah jamiek premiešať. Inkubovať 5 minút pri laboratórnej teplote. Po ukončení inkubácie napipetovať l00µl zastavovacieho roztoku. Obsah jamiek opatrne premiešať pretrepaním. Utrieť spodnú stranu jamiek do sucha a odčítať na ELISA readri optickú hustotu 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 závislosť absorbancie od koncentrácie. Zostrojením kalibračnej krivky môže byť koncentrácia zearalenonu určená odčítaním priamo z kalibračnej krivky alebo pomocou programového softwaru.