CH 8.5.b. Stanovenie aflatoxínu M_1 v mlieku a mliečnych výrobkoch metódou ELISA

1. Pôvod metódy

Návod k ELISA súprave , Ridascreen Aflatoxín 30/l5, Aflatoxín M_1, distribútor- firma Jemo Trading spol.s.r.o.

2. Princíp metódy

Základom testu je reakcia antigén a protilátky. Jamky mikrotitračnej platničky sú pokryté so špeciálnymi protilátkami na aflatoxín M_1. Po pridaní štandardu aflatoxínu M_1 alebo roztoku vzorky sa po premytí pridá enzýmový konjugát. Voľný aflatoxín M_1 a aflatoxín M_1 z enzýmového konjugátu súťažia o protilátky viažúce miesta (kompetitívna enzýmová imunoskúška). Neviazaný enzýmový konjugát sa potom odstráni premývaním. Enzýmový substrát (peroxid močoviny) a chromogén (tetrametylbenzidín) sa pridajú do jamiek a inkubujú. Naviazaný enzýmový konjugát zmení bezfarebný chromogén na modrý produkt. Pridanie zastavovacieho roztoku spôsobí zmenu farby z modrej na žltú. Meria sa pri 450nm Absorbancia je nepriamo úmerná koncentrácii aflatoxínu M_1 vo vzorke.

3.Použité prístroje

Elisa reader
mixér
trepačka
centrifúga
vodná lázeň

4.Zoznam chemikálií

kit Elisa
hexán
metanol
n-heptán
dichlórmetán
PBS pufer pH 7,2 (0,55g NaH_2PO_4 xH_2O+2,85g Na_2HPO_4 x2H_2O+9g NaCl a doplniťdo 1000 ml destilovanou vodou).

5. Príprava štandardov a pracovných roztokov

Štandardné roztoky aflatoxínu M_1: 0; 5; 10; 20; 40; 80 ppt aflatoxínu M_1 v mliečnom pufri.

Enzýmový konjugát aflatoxínu M_1:

Dodáva sa ako koncentrát. Keďže zriedený konjugát má limitovanú stabilitu, je nutné pripraviť len potrebné množstvo. Pred pipetovaním enzýmový konjugát jemne premiešať. Pri rekonštitúcii zriediť enzýmový konjugát v pomere 1:11 pufrom 2.

Premývací pufer:

Kit obsahuje balíček s pufrovacou soľou. Jedno vrecko sa rozpustí v jednom litri destilovanej vody. Pripravený pufer expiruje po 4 týždňoch ak je skladovaný pri 2-8°C.

6.Príprava vzoriek

Mlieko

Vzorky mlieka odtučniť odstredením 3500g/ 10 min. pri 10°C. Ak nie je k dispozícii chladená centrifúga, ochladiť vzorku pred centrifugáciou na 10°C. Po odstredení kompletne odstrániť pasterovou pipetou vrchnú tukovú vrstvu. Odstredené mlieko t.j. odtučnený supernatant aplikovať priamo do jamky (100µl).

Sušené mlieko

Navážiť 10g sušeného mlieka do banky a doplniť destilovanou vodou do 100ml (rekonštitúcia mlieka). Rozpustiť miešaním 5 minút. Pokračovať v príprave mlieka podľa postupu na mlieko.

Syr

Reprezentačnú vzorku syra rozmixovať v mixéri bez pridania extrakčného roztoku.(ak ide o plesňový syr, odstrániť povrch, ktorý môže spôsobiť interferencie s testovacím systémom). Do centrifugačnej skúmavky navážiť 2g zomletej vzorky syra. Pridať 40ml dichlórmetánu a extrahovať miešaním / trepaním 15 min. na trepačke. Suspenziu prefiltrovať, odpariť 10ml extraktu pri 60°C pod slabým prúdom dusíka. Olejový zvyšok rozpustiť v 0,5ml metanolu, O,5ml PBS pufru a 1ml heptánu a dobre premiešať. Centrifugovať 15 min. pri 2700ot./min. Dôkladne odstrániť vrchnú heptánovú vrstvu. Pasterovou pipetou opatrne a dôkladne odpipetovať spodnú vrstvu z metanolovo–vodnej fázy.

Odpipetovať 100µl z tohto odpipetovaného množstva (spodná vrstva) a pridať 400µl pufru a na analýzu použiť 100µl.

Pozn.: ak je potrebné ďalšie riedenie, použite pufer 1 / metanol

7.Podmienky stanovenia

Elisa kit musí byť skladovaný pri teplote +4 do +8°C v tmavom prostredí. Dodržiavať dobu expirácie uvedenú v kite. Zloženie kitu podľa priloženého návodu. Pred začatím práce s kitom všetky zložky súpravy mali by dosiahnúť izbovú teplotu.

Reprodukovateľnosť každej Elisa je závislé na dôslednosti, s akou sú jamky premývané. Počas inkubácie nevystavovať platničku priamemu slnku.

8.Meranie

Do jamiek mikrotitračnej platničky napipetovať 100ul štandardov a vzoriek. Jamky jemne premiešať kývaním platničky a v tme pri izbovej teplote inkubovať 3O minút. Vyliať obsah jamiek a platničku premyť 3x premývacím pufrom. Platničku dobre vysušiť vyklepaním na filtračný papier. Pridať 100µl zriedeného enzýmového konjugátu. Ručným kývaním premiešať platničku. Inkubovať v tme l5 minút pri izbovej teplote. Vyliať obsah jamiek a platničku premyť 3x premývacím pufrom. Platničku dobre vysušiť vyklepaním na filtračný papier. Do každej jamky pridať l00µl substrátu (chromogén). Ručným kývaním premiešať platničku. Inkubovať l5 minút v tme pri izbovej teplote. Do každej jamky pridať 100µl zastavovacieho roztoku. Ručným kývaním premiešať platničku. Zmerať absorbanciu pri 450nm v porovnaní s blankom. Odčítať do 1 hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

9.Kalibrácia a vyhodnotenie

Priemerné hodnoty absorbancií štandardov a vzoriek sa vydelia absorbanciou prvého štandardu (nulového štandardu) a vynásobia 100. Nulový štandard predstavuje tak 100% a absorbačné hodnoty sa vyjadria v percentách.

$$\frac{\text{absorbancia štandardu (vzorky) x 100}}{\text{absorbancia nulového štandardu}} = \text{\% absorbancie}$$

Vypočítané hodnoty štandardov sa zaznačia na semilogaritmický papier v závislosti od koncentrácie aflatoxínu M_1 (ng/l). Kalibračná krivka by mala byť lineárna medzi hodnotami 10-40ng/l (ppt). Koncentrácia aflatoxínu M_1 v ng/l korešponduje s absorbanciou vzoriek a môže sa odčítať z kalibračnej krivky. Získané hodnoty koncentrácie aflatoxínu M_1 vo vzorkách v ng/l, musia byť vynásobené príslušným zrieďovacím faktorom. Možno použiť aj softwar s nastavením príslušných hodnôt. (podľa kitu).

Zrieďovacie faktory: mlieko, sušené mlieko.....1

Syr.....10

Citlivosť:

Priemerný spodný detekčný limit je 5 ng/l (ppt).

Podľa výrobcu je detekčný limit pre mlieko a sušené mlieko 5 ng/l (ppt) a pre syr 50 ng/l (ppt).

Špecificita:

Bola stanovená analyzovaním krížovej reaktivity príslušných mykotoxínov.

krížová reaktivita: aflatoxín M_1.....100%

aflatoxín M_2..... 3O %

Neboli zistené žiadne krížové reakcie s aflatoxínami B_1, B_2, G_1, G_2.

Reprodukovateľnosť:

Presnosť série bola určovaná pomocou výsledkov troch nezávislých experimentov. Variačné koeficienty (%cv), ktoré boli získané z absorbčných hodnôt štandardov, sú v závislosti príslušných koncentrácii aflatoxínu M_1.

Variačné koeficienty sú príliš nízke v porovnaní s celým rozsahom, z čoho vyplýva vysoká reprodukovateľnosť výsledkov

.

Výťažnosť:

Výťažnosť spikovaného plnotučného mlieka (10–80ppt) je približne 95% a priemerné variačné koeficienty sú 15%.V prípade syra, je výťažnosť približne 102% a priemerné variačné koeficienty sú približne 11 %.