CH 8.12. Kvantitatívne stanovenie T-2/HT-2 toxínov v surovinách rastlinného pôvodu metódou ELISA

1. Pôvod metódy

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

2. Princíp metódy

Veratox T-2/HT-2 toxín je priamy kompetitívny ELISA test prebiehajúci v mikrotitračných jamkách, ktorý umožňuje získať presné koncentrácie v µg/kg. Voľný T-2 toxín alebo HT-2 toxín vo vzorkách a kontrolkách súťaží s enzymaticky značeným HT-2 toxínom (konjugát) o väzbové miesta na protilátke v mikrotitračnej jamke. Po premývacom cykle sa pridáva substrát, ktorý reaguje s naviazaným konjugátom za vzniku modrého sfarbenia. Čím sýtejšia je modrá farba, tým je menej toxínu vo vzorke. Reakcia sa zastaví pridaním zastavovacieho činidla. Optická hustota sa meria pri 650nm na Elisa readri. Obsah T-2/HT-2 toxínu vo vzorke sa získa z kalibračnej krivky alebo použitím programového softweru.

3. Použité prístroje

Elisa reader

mixér

trepačka

4. Zoznam chemikálií

Kit Elisa

metanol g.g.

5. Príprava štandardov a pracovných roztokov

Kit obsahuje štandardné roztoky o koncentráciách 0; 25; 50; l00; 250µg/kg

6. Príprava vzoriek

Zo zhomogenizovanej reprezentetívnej vzorky navážiť 1diel vzorky a 5dielov 70% metanolu (25g vzorky a pridať 125ml 70% metanolu) a premiešať Pretrepať na trepačke 3 minúty. Vzorku nechať postáť 2-3 minúty. Po vytrepaní obsah banky prefiltrovať a takto získaný filtrát použiť na analýzu.

Veratox kit T-2/HT-2 toxín je určený pre kvantitatívne stanovenie toxínov v obilninách (jačmeň, kukurica, ovos, raž, sója).

7. Podmienky stanovenia

Veratox kit T-2/HT-2 toxín sa uskladňuje pri teplote 2-8 C a môže sa použiť do dátumu expirácie. Pri stanovení je potrebné dodržiavať priložený návod. Pred použitím všetky roztoky vytemperovať na laboratórnu teplotu. Extrakty vzoriek by mali mať pH 6-8(+/-). Hodnota pH nadmerne kyslých alebo zásaditých vzoriek by sa mala upraviť.

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