

Pracovní postup pro cvičení

Kvantitativní stanovení T-2/HT-2 toxinů metodou ELISA

Princip stanovení

Veratox® (kit) na stanovení T-2/HT-2 toxinů využívá kompetitivní přímou ELISA metodu v mikrotitračních destičkách a umožňuje získat přesnou koncentraci T-2 a HT-2 toxinů v řádech ppb. Volné T-2 a HT-2 toxiny ve vzorcích a standardech soutěží (kompetitivně se vážou) s enzym-značeným HT-2 toxinem (konjugátem) na místech s navázanou protilátkou. Po navázání T-2/HT-2 toxinů nebo konjugátu na protilátku v jamkách následuje krok promývání, při kterém je odstraněn všechen nenavázaný antigen (konjugát). Substrát, který je přidán po promývání, reaguje s navázaným konjugátem a vzniká modré zbarvení. Čím intenzivnější modré zbarvení vzniká, tím méně je ve vzorku T-2 a HT-2 toxinů. Intenzita zbarvení je hodnocena pomocí ELISA readeru. Z intenzity zbarvení standardů je vytvořena standardní křivka, do které je vyneseno zbarvení vzorků. Ze standardní křivky se následně pomocí softwaru odečte koncentrace T-2 a HT-2 toxinů ve vzorcích.

Důležité pojmy

- Přímá ELISA metoda = slouží pro detekci antigenu (mykotoxinu)
- Konjugát = mykotoxin (HT-2 toxin) s navázaným enzymem (je součástí kitu)
- Substrát = chemická látka, která reaguje s enzymem a tím mění svou barvu (je součástí kitu)

I. Příprava vzorku

Materiál a přístrojové zařízení nezbytné pro přípravu vzorku

- 250 ml Erlenmayerova baňka
- 25 ml odměrný válec
- Nálevka, stojan s držákem na nálevku
- Filtrační papír
- 50 ml kádinka
- Předvážky
- Automatická pipeta o objemu 1-10 ml, špičky
- Alobal, lžička
- Třepačka

Základní chemikálie

- 70% roztok metanolu
- Deionizovaná nebo destilovaná voda



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Pracovní postup při přípravě vzorku

1. Získejte reprezentativní vzorek. Rozemelte vzorek na jemný prášek.
2. Navažte 5 g vzorku do Erlenmayerovy baňky.
3. Přidejte 25 ml 70% metanolu.
4. Nechte třepat na třepačce po dobu 3 minut.
5. Vzorek přefiltrujte.
6. Zřeďte zfiltrovaný vzorek destilovanou vodou 1 : 1 a zamíchejte

II. Stanovení T-2/HT-2 toxinů pomocí kitu Veratox®

Materiál a přístrojové zařízení nezbytné pro stanovení ELISA

- Strip se 12-ti mikrotitračními jamkami s protilátkou
- Strip se 12-ti mikrotitračními červeně označenými mísíci jamkami
- 5 žlutě označených lahviček se standardy T-2 toxinu v koncentracích 0, 25, 50, 100 a 250 ppb
- 1 modře označená lahvička s roztokem konjugátu (HT-2 toxin-HRP conjugate solution)
- 1 zeleně označená lahvička s roztokem substrátu (K-Blue® Substrate solution)
- 1 červeně označená lahvička s ukončovacím roztokem (Red Stop solution)
- Držák jamek
- Plastové promývací vaničky
- Kádinka s destilovanou vodou
- Multikanálová pipeta, špičky
- ELISA reader

Veratox® kit musí být skladován v chladničce při teplotě 2-8°C. Před stanovením se musí reagentie nechat temperovat na pokojovou teplotu.

Pracovní postup (pro kvantifikaci)

1. Vezměte 1 strip s červeně označenými mísíci jamkami (5 jamek pro standardy, zbytek pro vzorky – na každý vzorek jsou potřeba 2 jamky) a vložte jej do držáku.
2. Vezměte adekvátní počet mikrotitračních jamek s protilátkou (jednu řadu), vložte je do držáku tak, aby vyčnívající konec byl vpravo.
3. Zamíchejte všechny reagentie v lahvičkách.
4. Napipetujte 1,5 ml konjugátu z modře označené lahvičky do plastové vaničky. Pomocí 12-ti kanálové automatické pipety přeneste 100 µl konjugátu do každé červeně označené mísíci jamky.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



5. Pomocí pipety o objemu 100 μ l napipetujte standardy a zředěné vzorky (na každý roztok použijte čistou špičku) do červeně označených mísících jamek podle následujícího schématu:
0 25 50 100 250 vz1 vz1 vz2 vz2 vz3 vz3
6. Pomocí 12-ti kanálové automatické pipety promíchejte roztok v jamkách tak, že roztok nasajete a vypustíte celkem 3 krát.
7. Přemístěte 100 μ l roztoku z červeně označených jamek do mikrotitračních jamek s protilátkou.
8. Inkubujte po dobu 5 minut při pokojové teplotě (18-30°C), přičemž prvních 10–20 sekund promíchejte roztok v jamkách krouživými pohyby držáku tak, aby roztok zůstal uvnitř jamek. Odstraňte červeně označené promíchávací jamky.
9. Iniciační reakce (navázání antigenu-mykotoxinu na protilátku v jamce) je nyní kompletní. Vylijte z jamek všechn obsah.
10. Promyjte všechny jamky destilovanou vodou celkem 5 krát. Potom otočte jamky dnem vzhůru na destilovaný papír tak, abyste z jamek odstranili všechnu vodu. (Vodu je možno z jamek odstranit mírným poklepnutím.)
11. Napipetujte 1,5 ml substrátu ze zeleně označené lahvičky do plastové vaničky.
12. Použijte nové špičky a multikanálovou pipetou napipetujte 100 μ l substrátu do jamek.
13. Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě, přičemž prvních 10–20 sekund promíchejte roztok v jamkách krouživými pohyby držáku tak, aby roztok zůstal uvnitř jamek.
14. Napipetujte 1,5 ml Red Stop roztoku z červeně označené lahvičky do čisté plastové vaničky.
15. Použijte stejné špičky jako v kroku 12 a přidejte 100 μ l roztoku Red Stop do každé jamky. Zamíchejte roztok v jamkách a použité špičky odstraňte.
16. Držák s jamkami vložte do ELISA readeru a odečtěte při vlnové délce 650 nm. Vypočítaná koncentrace T-2/HT-2 toxinu je v jednotkách ppb. (Výsledky musí být odečteny do 20 minut po přidání ukončovacího roztoku.)

Limit detekce metody: 25 ppb

Rozmezí kvantifikace: 25 – 250 ppb

Metoda je validována pro vzorky: kukuřice, ječmen, rýže, sója, pšenice, kukuřičné výpalky, slunečnice.