

Total Aflatoxin (AFT) ELISA Kit NE070500601 – 96 kuyucuk

Standart Eğri Aralığı: 0 – 16.2 ppb

Örnek Tipi: Tahıl, Yem, vb.

Çapraz Reaksiyon: Aflatoxin B1: %100; Aflatoxin B2: %80; Aflatoxin G1: %75; Aflatoxin G2: %45; Aflatoxin M1: %8

Bilgilendirme

Aflatoxinler, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* dahil olmak üzere *Aspergillus* türü mantarlar tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Başlıca mısır, yer fıstığı ve fındık gibi ürünleri kirletirler. Aflatoxinler temel olarak dört türe ayrılır: AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2. Toplam aflatoxin miktarı genellikle bu dört toksinin toplam miktarını ifade eder. 1. Grup kanserojenler olarak sınıflandırılırlar ve insanlarda ve hayvanlarda karaciğer ve böbrekler gibi organ ve dokular için önemli tehlikeler oluşturdukları gösterilmiştir. Aflatoxinler güçlü ve oldukça toksik kanserojen maddelerdir.

Uygulama

Bu kit, tahıl ve yem gibi örneklerdeki Total Aflatoxin (AFT) tespit etmek için indirect competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) yöntemini kullanır. Kit, antijen kaplanmış plaka, HRP konjugatı, antikorlar, standartlar ve diğer destekleyici reaktiflerden oluşur. Tespit sırasında, standartlar veya numuneler eklendiğinde, numunelerdeki AFT, anti-AFT antikorlarıyla birleşmek için eşleşmiş antijenlerle rekabet edecektir. HRP konjugatı eklendikten sonra, TMB substratları ile renklendirme yapılır. Numunelerin absorbans değeri, AFT içeriğiyle negatif bir korelasyona sahiptir. Son olarak, elde edilen absorbans değerlerini standart eğri ile karşılaştırarak, numunedeki AFT toksin içeriğini hesaplanabilir.

Kit İçeriği ve Saklama Koşulu

Kitin raf ömrü 12 aydır ve 2-8 °C'de saklanmalıdır. Dondurulmamalıdır.

İçerik	Miktar
ELISA Microplakası (Ayrılabilir plaka)	8 kuyu x 12 strip
Standartlar (0ppb, 0.01ppb, 0.03ppb, 0.09ppb, 0.27ppb, 0.81ppb) (siyah kapak) Analiz Karşılığı: 0ppb, 0.2ppb, 0.06ppb, 1.8ppb, 5.4ppb, 16.2ppb	1 mL / her biri
Antikor Solüsyonu (mavi kapak)	5.5 mL
HRP Konjugatı (kırmızı kapak)	5.5 mL
Substrat A Solüsyonu (beyaz kapak)	6 mL
Substrat B Solüsyonu (siyah kapak)	6 mL
Durdurma Solüsyonu (sarı kapak)	6 mL
20X Konsantre Yıkama Solüsyonu (beyaz kapak)	40 mL
Yapışkan Membran	1 adet
Kullanım Kılavuzu	1 adet

Çalıőma İçin Gerekli Diğer Materyaller

- Mikrolaka okuyucu,
- Öđütücü (katı numunelerin homojenizasyonu için),
- Vorteks karıőtırıcı (alkalama ve karıőtırma için),
- Santrifüj veya filtre kağıdı,
- Hassas Terazi,
- Mikro pipetler (tek kanallı ve çok kanallı),
- Metanol.

Çalıőma Öncesi Uyarılar

- Testten önce, reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına (25°C) getirilmeli ve dengelenmelidir.
- Tüm reaktifler kullanımdan önce hafifçe ters çevrilerek karıőtırılmalıdır. Köpürtmeye neden olmayınız.
- Çalıőma baőlatıldıktan sonra, tüm adımlar kesintisiz ve önerilen süre sınırları içinde tamamlanmalıdır.
- Yıkamadan hemen kuyucukların kuru olduğundan emin olduktan sonra hızlı bir Şekilde sonraki adıma geçiniz.
- İnkübasyon sırasında mikro plakaları yapışkan membranla örtünüz.
- Tüm reaktiflerin kapaklarını kullanımdan hemen sonra kapatınız ve Őiőe kapaklarını deđiőtirmeyiniz.
- Çapraz kontaminasyonu önlemek için her numune ve solüsyon için ayrı bir tek kullanımlık uç kullanınız.
- Standart eğrinin OD değerleri, gerçek zamanlı test performans koőullarına (örneğin, operatör, pipetleme tekniği, yıkama tekniği veya sıcaklık etkileri) göre deđiőebileceđinden, kullanıcı her test için bir standart eğri oluőtürmelidir.
- Son kullanma tarihi geçmiő reaktifleri kullanmayınız.
- Farklı lotlardaki reaktifleri birleőtirerek karıőtırmayınız.
- 0 ppb'lik absorbands değer 0,5'in (A450nm < 0,5) altındaysa, reaktifin metamorfik olabileceği anlamına gelir.
- Substrat solüsyonu renksiz olmalıdır, aksi takdirde atınız.
- İőlem sırasında kullanılan laboratuvar ekipmanlarının (mikropipetler, ELISA okuyucu vb.) hem hassasiyetini hem de doğruluğunu kontrol ediniz.
- Laboratuvarda sigara içmeyin, yemek yemeyin, içecek tüketmeyin veya pipetleme iőlemini ağız yoluyla yapmayınız.
- Çalıőma sırasında mutlaka tek kullanımlık eldiven giyiniz.
- Substrat ve durdurma çözeltisinin cilt ve mukoza ile temasından kaçınınız (olası tahriő, yanık veya toksisite tehlikesi). Temas halinde, etkilenen bölgeyi bol su ile yıkayınız.
- Kimyasal ürünlerin kullanımı ve imhası, iyi laboratuvar uygulamalarına (GLP) uygun olarak yapılmalıdır.
- Lütfen kuyucuklardaki içerikleri eőtit Şekilde karıőtırın ve plakayı iyice yıkayın. Tekrarlanabilirlik büyük ölçüde yıkama adımının tutarlılığına bağlıdır.

Ön Hazırlık

Lütfen laboratuvar malzemelerinin temiz olması gerektiğini unutmayınız. Örnek ve reaktiflerin birbirlerine karışmalarını önlemek için tek kullanımlık pipet uçları kullanınız.

Çözelti Hazırlama:

Çözelti 1: %70 Metanol Çözeltisi

7 birim Metanol üzerine 3 birim Deiyonize su ekleyiniz.

Çözelti 2: 1X Yıkama Tamponu

Konsantre yıkama tamponunu (20x) 20 faktörüyle seyreltiniz (1 birim Konsantre yıkama tamponuna 19 birim Deiyonize su ekleyiniz).

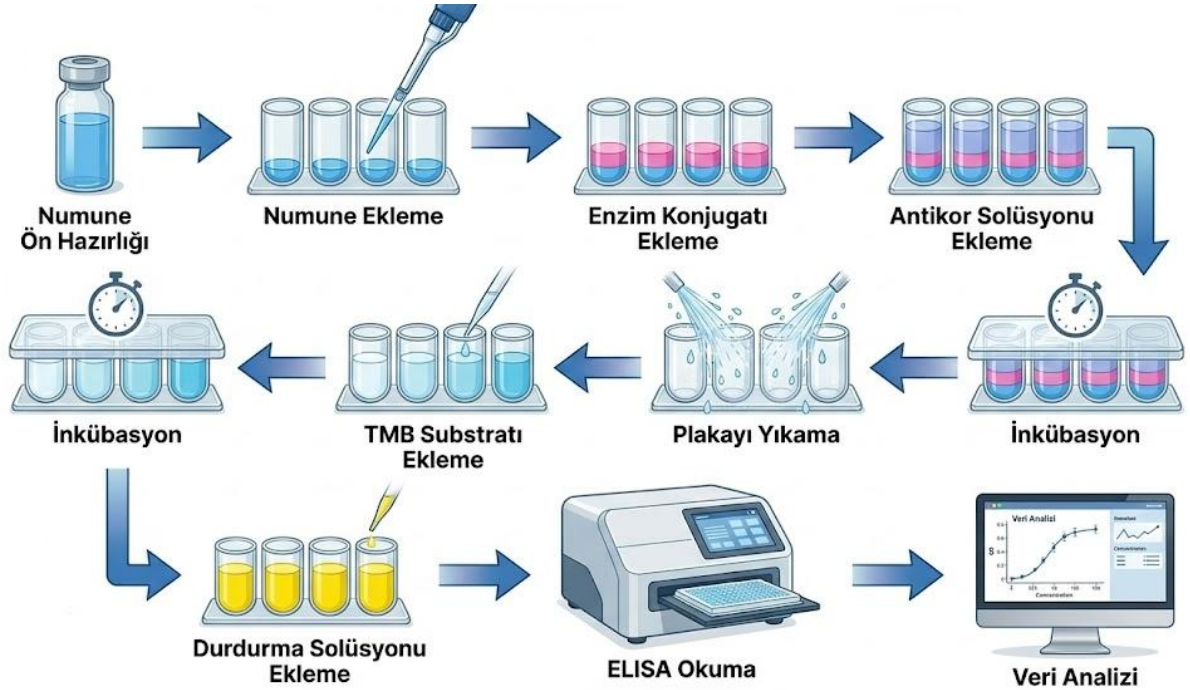
Numune Hazırlama:

Tahıl, Yem, vb. Örneği Hazırlama İşlemleri:

- İyice öğütülmüş numuneyi (20 mesh elekten geçen) iyice karıştırınız ve numune alınız.
- 5.0 g homojenize numuneyi 50 mL'lik bir santrifüj tüpünde tartınız, 50 mL %70 Metanol Çözeltisi ekleyiniz ve 5 dakika karıştırınız.
- Karışımı filtre kağıdı kullanarak süzünüz veya oda sıcaklığında 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjleyiniz.
- Üst sıvıdan 500 µL yeni tüpe aktarınız ve üzerine 500 µL deiyonize su ekleyiniz, tamamen karıştırınız.
- Test için 50 µL alınız.

Numune Seyreltme Oranı: 20 - Tespit limiti: 0,2 ppb

ELISA Protokol Şablonu



ELISA Protokolü

Tüm reaktifleri ve numuneleri yaklaşık 30 dakika oda sıcaklığında bekletiniz. Kullanmadan önce reaktif şişelerini hafifçe alt üst ediniz.

Mikroplaka çerçevesini ve gerekli sayıda kuyucuğu çıkarınız. Kullanılmayan mikroplaka kuyucuklarını, verilen kurutucuyla birlikte kapalı poşete koyunuz. Kalan kiti buzdolabında 2-8°C'de saklayınız.

- 1. Numaralandırma:** Standart ve numuneleri karşılık gelen mikrokuyucuklara sırayla numaralandırınız, her numune ve standart için 2 kuyucuklu tekrar önerilir.
- 2. İnkübasyon:** Numaralandırılmış her standart kuyucuğuna 50 µL standart, her numune kuyucuğuna ise 50 µL numune ekleyiniz, ardından tüm kuyucuklara 50 µL HRP konjugatı ekleyiniz. Son olarak her kuyucuğa 50 µL antikor solüsyonu ekleyiniz. Mikroplakayı yapışkan membranla örtünüz ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe ediniz.
- 3. Yıkama:** Yapışkan membranı dikkatlice açınız ve kuyucuklardaki sıvıyı ters döndürerek dökünüz. Her kuyucuğa 300 µL 1X Yıkama Tamponu pipetleyiniz ve ters çevirerek dökünüz, bu işlemi 5 kez tekrarlayınız. Plağı ters çeviriniz ve kağıt havlu üzerine kalan sıvının akması için vurunuz. (Kabarcık kalmadığından emin olunuz).
- 4. Substrat:** Her kuyucuğa 50 µL A Substrat Reaktif ve ardından üzerine 50 µL B Substrat Reaktif ekleyiniz. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika reaksiyona girmesine izin veriniz. (Mavi renk çok soluksa, reaksiyon kontrollü şekilde uzatılabilir.)
- 5. Durdurma:** Her kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu ekleyiniz.
- 6. Okuma:** Bir mikro plaka okuyucu ile 450 nm'de (Referans dalga boyu 595 veya 630 nm) okutarak Optik Yoğunluğu (OD değeri; absorbans değeri) belirleyiniz. (Durdurma solüsyonu eklendikten 10 dakika içinde okuma tamamlanmalıdır.)

Sonucun Yorumlanması

• Absorbans Değerinin Yüzdesinin Hesaplanması:

Absorbans değerinin yüzdesi (%) = $A / A_0 \times \%100$

A—numunenin veya standartın ortalama OD değeri;

A₀—0 ppb'lik standartın ortalama OD değeri.

Standartın veya numunenin absorbans yüzdesini hesaplamak için kullanılır.

• Standart Eğrinin Çizilmesi ve Hesaplanması:

Standartların absorbans yüzdesini (A/A₀) Y eksenini ve standartların karşılık gelen logaritmik konsantrasyonunu (ppb) X eksenini olarak alınız.

Standart yarı logaritmik eğrileri X eksenini ve Y eksenini ile çiziniz.

Numunelerin absorbans yüzdesini standart eğriye alınız, ardından standart eğriden karşılık gelen konsantrasyonu elde ediniz. Son olarak, elde edilen konsantrasyon değerlerinin karşılık gelen seyreltme süreleriyle çarpılması, numunelerin gerçek AFT konsantrasyonunu verir.

Kitin profesyonel analiz yazılımının hesaplama için kullanılması, çok sayıda numunenin doğru ve hızlı bir şekilde analiz edilmesini daha kolay hale getirir.