

## Ochratoxin A (OTA) ELISA Kit

### NE070800601 – 96 kuyucuk

**Standart Eğri Aralığı:** 0 – 48.6 ppb

**Örnek Tipi:** Tahıl, Yem, vb.

**Çapraz Reaksiyon:** Ochratoxin A: %100

### Bilgilendirme

Aspergillus veya Penicillium familyaları tarafından üretilen ikincil bir metabolit olan Okratoksin A (OTA), özellikle tarım ürünleri ve tahıllarda bulunan, gıdaları kirleten en yaygın mikotoksinlerden biridir. Okratoksin A doğada en yaygın olanıdır, en toksik olanıdır ve insanlar ve hayvanlar üzerinde en büyük etkiye sahiptir. Başlıca karaciğer ve böbrekleri etkileyen güçlü bir toksindir. Bu nedenle, okratoksin A ile kirlenmiş gıda ve yemlerin doğrudan veya dolaylı olarak insan gıda zincirine girmesini önlemek, okratoksin A'nın tespiti açısından çok önemlidir.

### Uygulama

Bu kit, tahıl ve yem gibi numunelerdeki Okratoksin A'yı (OTA) 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 OTA, anti-OTA antikorlarıyla birleşmek için eşleşmiş antijenlerle rekabet edecektir. HRP konjugatları eklendikten sonra, TMB substratları ile renklendirme yapılır. Numunelerin absorbans değeri, OTA içeriğiyle negatif bir korelasyona sahiptir. Son olarak, standart eğri ile karşılaştırılarak, elde edilen konsantrasyon numune seyreltme oranı ile çarpılır. Numunedeki OTA 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, 0.03ppb, 0.09ppb, 0.27ppb, 0.81ppb, 2.43ppb) (siyah kapak) Analiz Karşılığı: <b>0ppb, 0.6ppb, 1.8ppb, 5.4ppb, 16.2ppb, 48.6ppb</b>	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

- Mikropılaka 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),
- Sodyum Bikarbonat,
- Sodyum Klorür.
- 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 oluŐturmalıdır.
- Son kullanma tarihi geçmiŐ reaktifleri kullanmayınız.
- Farklı lotlardaki reaktifleri birleŐtirerek karıŐtırmayınız.
- 0 ppb'lik absorbands değerleri 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 eŐit 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).

**Çözelti 3:** 0.1M Sodyum Bikarbonat Solüsyonu

4.2g of sodyum bikarbonat tartınız ve 400 mL deiyonize suda karıştırarak çözündürünüz. Tamamen çözüldükten sonra 500 mL'e tamamlayınız.

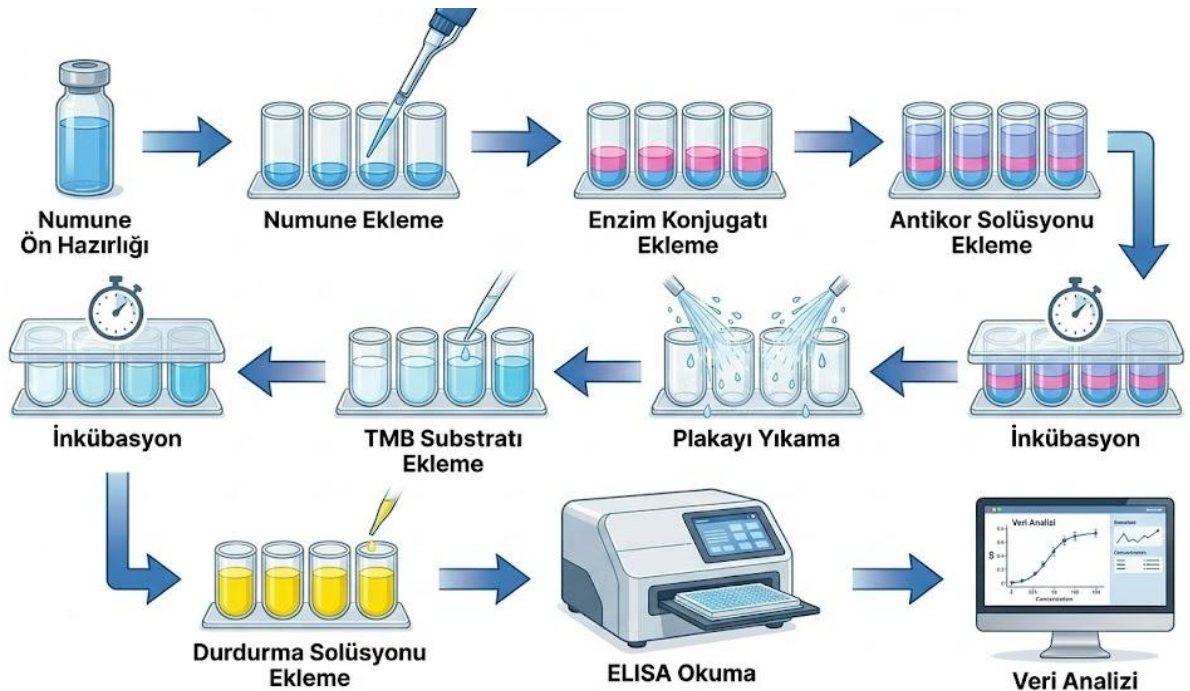
### Numune Hazırlama:

#### Tahıl, Yem, vb. Örneği Hazırlama İşlemleri:

- İyice öğütülmüş numuneyi (20 mesh elekten geçen) iyice karıştırınız ve numune alınız.
- 5.0 g homojenize numuneyi ve 1 g sodyum klorürü 50 mL'lik bir santrifüj tüpünde tartınız, 25 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 250 µL yeni tüpe aktarınız ve üzerine 750 µL 0.1M Sodyum Bikarbonat Solüsyonu ekleyiniz, tamamen karıştırınız.
- Test için 50 µL alınız.

**Numune Seyreltme Oranı: 20 - Tespit limiti: 0,6 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 Reaktifi ve ardından üzerine 50 µL B Substrat Reaktifi 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;

A<sub>0</sub>—0 ppb'lik standartın ortalama OD değeri.

Standartın veya numunenin absorbans yüzdesini hesaplamak için kullanılır.

### • Standart Eğrinin Çizilmesi ve Hesaplanması:

Standartların absorbans yüzdesini (A/A<sub>0</sub>) 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 OTA konsantrasyonunu verir.

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