

1-STD Aflatoxin M1 (AFM1) ELISA Kit

NEM219 – 96 kuyucuk

Standart Eğri Aralığı: 0 – 405 ppt

Örnek Tipi: Süt, Süt Tozu, Fermente Süt Ürünleri, Peynir, vb.

Çapraz Reaksiyon: Aflatoxin M1: %100

Bilgilendirme

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* dahil olmak üzere *Aspergillus* türü mantarlar tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Aflatoksin M1, aflatoksin B1'in bir metabolitidir. Aflatoksin M1 genellikle aflatoksin B1 ile kontamine olmuş bir diyetle beslenen ineklerin sütünde bulunur. Aflatoksin M1 oldukça kararlı olduğundan ve pastörizasyonla parçalanamadığından, aflatoksin M1 testi sadece yem hammaddelerinde değil, nihai üründe de uygulanmalıdır. Bu ELISA kiti, aflatoksin M1'in hızlı ve doğru bir şekilde analiz edilebildiği analitik yöntemlerden biridir ve süt, yoğurt, peynir ve süt tozu örneklerinde uygulanabilir.

Uygulama

1-STD Aflatoxin M1 (AFM1) ELISA Kiti tahıl ve yem gibi örneklerdeki Aflatoxin M1 (AFM1) tespit etmek için indirect competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) yöntemini kullanır. Kit, antijen kaplanmış plaka, HRP konjugatı, antikorlar, 1 standart (zero) ve diğer destekleyici reaktiflerden oluşur. Tespit sırasında, standart veya numuneler eklendiğinde, numunelerdeki AFM1, anti-AFM1 antikorlarıyla birleşmek için eşleşmiş antijenlerle rekabet edecektir. HRP konjugatı eklendikten sonra, TMB substratları ile renklendirme yapılır. Numunelerin absorbans değeri, AFM1 içeriğiyle negatif bir korelasyona sahiptir. Son olarak, numunedeki AFM1 toksin içeriği Nepenthe analiz yazılımı kullanılarak 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 (0 ppt)	1 mL
Antikor Solüsyonu	6 mL
Enzim Konjugatı	12 mL
Substrat Solüsyonu	12 mL
Durdurma Solüsyonu	6 mL
10X Konsantre Örnek Dilüsyon Solüsyonu	40 mL
20X Konsantre Yıkama Solüsyonu	60 mL
Yapışkan Membran	1 adet
Kullanım Kılavuzu	1 adet

Çalışma İçin Gerekli Diğer Materyaller

- Mikrolaka okuyucu,
- Öğütücü (katı numunelerin homojenizasyonu için),
- Vorteks karıştırıcı (çalkalama ve karıştırma için),
- Santrifüj veya filtre kağıdı,
- Hassas Terazi,
- Mikro pipetler (tek kanallı ve çok kanallı).

Çalışma Öncesi Uyarılar

- Testten önce, reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına (25°C) getirilmeli ve dengelenmelidir.
- Tüm reaktifler kullanımdan önce hafifçe ters çevrilerek karıştırılmalıdır. Köpürtmeye neden olmayınız.
- Çalışma başlatıldıktan 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 şişe kapaklarını değiştirmeyiniz.
- Çapraz kontaminasyonu önlemek için her numune ve solüsyon için ayrı bir tek kullanımlık uç kullanınız.
- Standart eğrinin OD değerleri, gerçek zamanlı test performans koşullarına (örneğin, operatör, pipetleme tekniği, yıkama tekniği veya sıcaklık etkileri) göre değişebileceğinden, kullanıcı her test için bir standart eğri oluşturmalıdır.
- Son kullanma tarihi geçmiş reaktifleri kullanmayınız.
- Farklı lotlardaki reaktifleri birleştirerek karıştırmayınız.
- 0 ppb'lik absorbans değeri 0,5'in ($A_{450nm} < 0,5$) altındaysa, reaktifin metamorfik olabileceği anlamına gelir.
- Substrat solüsyonu renksiz olmalıdır, aksi takdirde atınız.
- İşlem sırasında kullanılan laboratuvar ekipmanlarının (mikropipetler, ELISA okuyucu vb.) hem hassasiyetini hem de doğruluğunu kontrol ediniz.
- Laboratuvarda sigara içmeyin, yemek yemeyin, içecek tüketmeyin veya pipetleme işlemini ağız yoluyla yapmayınız.
- Çalışma sırasında mutlaka tek kullanımlık eldiven giyiniz.
- Substrat ve durdurma çözeltisinin cilt ve mukoza ile temasından kaçınınız (olası tahriş, 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 eşit şekilde karıştırın 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: 1X Örnek Dilüsyon Solüsyonu

Konsantre örnek dilüsyon solüsyonunu (10x) 10 faktörüyle seyreltiniz (1 birim örnek dilüsyon solüsyonuna 9 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:

Süt Örneği Hazırlama İşlemleri:

1. Taze süt veya işlenmiş süt örneklerini 25°C'de yaklaşık 1 saat bekletin.
2. Test için 50 µL alınız.

Numune Seyreltme Oranı: 1 - Tespit limiti: 5 ppt

Süt Tozu Örneği Hazırlama İşlemleri:

1. 1,0 g numuneyi 7 mL distile su ile süspansiyon haline getiriniz, 1 dakika çalkalayarak ekstraksiyon yapınız.
2. Test için 50 µL alınız.

Numune Seyreltme Oranı: 7 - Tespit limiti: 35 ppb

Fermente Süt Ürünleri Hazırlama İşlemleri:

1. 1,0 g numuneyi 4 mL 1X numune seyreltme çözeltisinde süspansiyon haline getiriniz, 2 dakika çalkalayarak ekstraksiyon yapınız.
2. Test için üst sıvıdan 50 µL alınız.

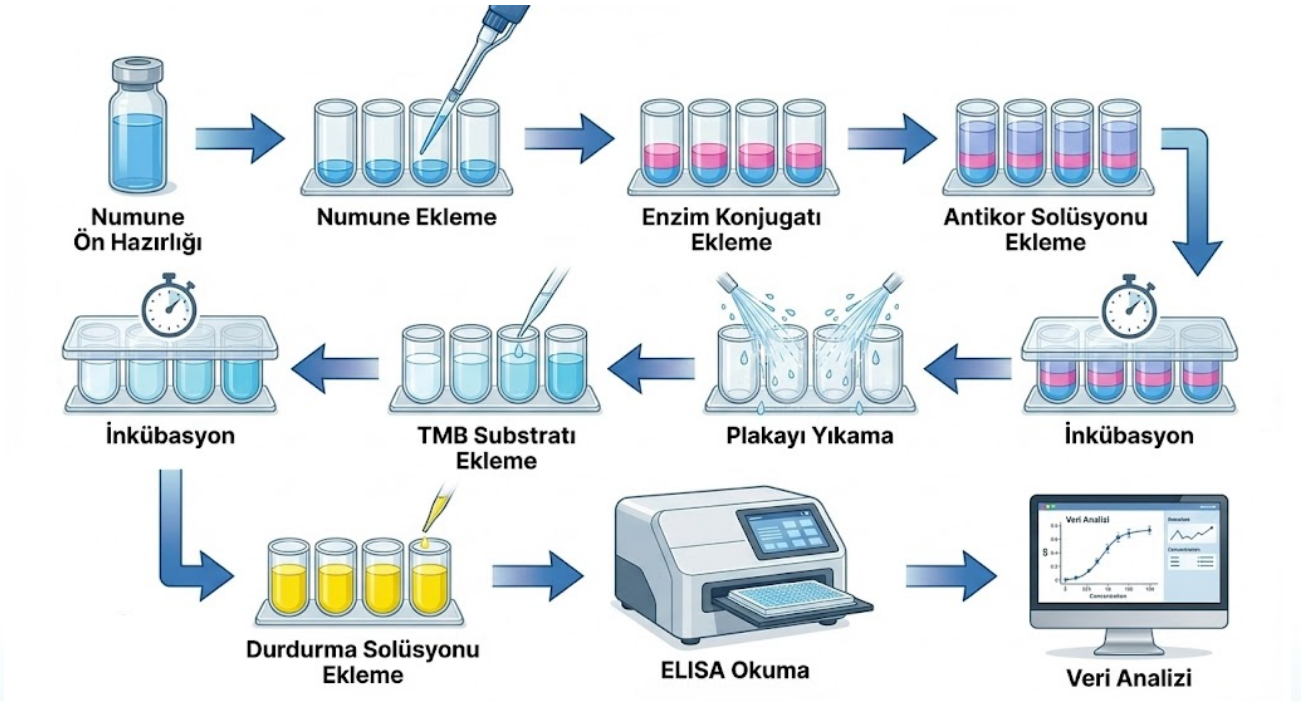
Numune Seyreltme Oranı: 5 - Tespit limiti: 25 ppt

Peynir Örneği Hazırlama İşlemleri:

1. 1,0 g numuneyi 8 mL 1X numune seyreltme çözeltisinde süspansiyon haline getiriniz, 5 dakika çalkalayarak ekstraksiyon yapınız.
2. Karışımı filtre kağıdı kullanarak süzünüz veya oda sıcaklığında 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjleyiniz.
3. Test için üst sıvıdan 50 µL alınız.

Numune Seyreltme Oranı: 8 - Tespit limiti: 40 ppt

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 standart kuyucuğuna 50 µL standart, her numune kuyucuğuna ise 50 µL numune ekleyiniz, ardından tüm kuyucuklara 50 µL antikor solüsyonu ekleyiniz. Son olarak her kuyucuğa 100 µL enzim konjugatı 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 100 µL 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

1-STD ELISA Kitini analiz edebilmek için destek@nepenthe.com.tr adresine e-posta göndererek ücretsiz Nepenthe Analiz Yazılımını temin ediniz. Kit kutusunda yazan LOT numarasını yazılımdaki PARTİ NO alanına elle giriniz. B/Bo (%) değerleri otomatik olarak yüklenecektir. Ardından ölçüm verilerinizi Numune OD Değeri alanına elle giriniz veya yapıştırınız, otomatik olarak sonuç verilecektir.