

VERATOX[®] HAZELNUT ALLERGEN (COD. VX 8420)**1. INDICAZIONI**

Saggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa di proteine di nocciole in campioni alimentari ed in campioni ambientali

I campioni risultati positivi con il kit vanno confermati con le metodiche ufficiali.

Ditta produttrice:	Neogen Corporation (U.S.A.)
Tempo richiesto:	
Preparazione del campione:	20 min.
Esecuzione del test:	30 min.
N° determinazioni effettuabili:	48
N° di analisi effettuabili:	Dipende da quante volte si utilizza il kit: ogni volta che si allestisce un test si utilizzano 5 pozzetti per gli standard
Range quantificazione:	2.5-25 ppm oppure da 1 ppm a 10 ppm con estrazione campione 1:10
LOD:	0.60 ppm
Validità del kit:	6 mesi dalla data di produzione.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Saggio tipo sandwich su fase solida (ELISA).

Nel kit vengono forniti due set di strip: strip con pozzetti marcati in rosso (mixing wells) e strip sensibilizzate con anticorpi. Il campione dopo l'estrazione e la successiva diluizione, viene aggiunto ai pozzetti bianchi e si ha la prima incubazione (10 min), successivamente si ha la fase di lavaggio per allontanare ciò che non si è legato quindi si aggiunge il coniugato e si aspettano altri 10 min (seconda incubazione), a questo punto si lava e si aggiunge il substrato (terza incubazione per 10 min), al termine della quale si aggiungerà la soluzione di stop e si potrà osservare la colorazione.

Si consiglia la lettura dei risultati al lettore di micropiastre con uno dei seguenti filtri: 620nm; 630nm; 650nm.

3. CONTENUTO DEL KIT

Q.TA	DESCRIZIONE	FORMATO	
4	Strip da 12 pozzetti separabili, sensibilizzati con anticorpi	busta di alluminio	
5	Standard pronti all'uso (0; 2.5; 5; 10; 25ppm)	vial da 2 ml	etichetta gialla
2	Coniugato Anticorpo –HRP	bocchetta da 5 ml	etichetta blu
1	K-Blue Substrate [®] cromogeno	bocchetta da 24 ml	etichetta verde
1	50 grammi di additivo		
1	Cucchianino plastica		
1	Red Stop Solution	bocchetta da 32 ml	etichetta rossa
1	Soluzione di lavaggio conc. PBS-Tween 10 mM pH 7.4	bottiglia da 40 mL	
1	PBS disidratato 10 mM - buffer di estrazione	busta di alluminio	
1	Libretto di istruzioni		

4. MATERIALI NECESSARI NON FORNITI NEL KIT

1. Shaker a bagno maria capace di alloggiare beute da 250 mL per 2 g di campione	6. Beute da 250 mL
2. Bilancia per pesare da 5 g	
3. Carta da filtro Whatman n°4	
4. Supporto per micropozzetti	
5. Cilindro graduato da 250 ml	

5. CONSERVAZIONE:

1. Conservare il kit a 2-8 °C. Non congelare.
2. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.
3. Conservare il substrato al riparo dalla luce.
4. Il kit deve essere portato a temperatura ambiente (18-30 °C) prima dell'uso.

6. AVVERTENZE

1. I campioni potrebbero essere contaminati, usare i guanti.
2. Non usare reagenti provenienti da kit di lotti diversi.
3. Usare pipette, puntali puliti fra un campione e l'altro per evitare cross-contaminazioni.
4. Non eseguire il test con più di 24 pozzetti contemporaneamente.
5. Tempi di incubazione diversi da quelli specificati possono portare a risultati poco accurati.

7. PREPARAZIONE DEI REAGENTI ED AVVERTENZE

Substrato: pronto all'uso, se una volta aperto assume un colore marrone sostituirlo

Buffer di estrazione e diluizione campione - Aggiungere il contenuto della busta di alluminio ad 1 litro di acqua distillata o deionizzata. Conservare in frigo ed al riparo dalla luce.

Soluzione di lavaggio - La soluzione fornita è concentrata, quindi diluire i 40 ml in 960 ml di acqua distillata o deionizzata. Conservare in frigo ed al riparo dalla luce.

8. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Scaldare il buffer di estrazione, preparato come descritto precedentemente, fino a 60°C, per ogni campione servono 125 mL.
2. Aggiungere 5 g di campione o 5 mL in una beuta da 250 mL con tappo.
3. Aggiungere un cucchiaino di additivo contenuto nel kit.
4. Trasferire in beuta 125 mL di buffer a 60°C
5. Porre la beuta su uno shaker a bagno maria (150 rpm) ed agitare, riscaldando a 60°C, per 15 min.
6. Rimuoverlo e lasciarlo riposare per 5 min.
7. Filtrare l'estratto, almeno 5 mL, attraverso carta da filtro Whatman n°4, oppure centrifugare per 5 min a 14000 rpm, centrifugare per 20 min se si usano velocità di centrifuga minori, prelevare il surnatante.
8. Prima di testare lasciarlo raffreddare fino a temperatura ambiente, usare 100 µL di tale soluzione nel test Elisa.

N.B.: per quantificare tra 1 ppm e 10 ppm al punto 4 aggiungere 50 mL di buffer invece che 125 mL

9. ESECUZIONE DEL SAGGIO

Portare i reagenti a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente il contenuto prima dell'uso.

1. Prelevare il numero di pozzetti necessario per l'analisi (campioni + standard). Es.: 6 pozzetti rossi (5 std + 1 campione) e 6 pozzetti bianchi. Chiudere il sacchetto e riporre i pozzetti inutilizzati nel frigo.
2. Porre i pozzetti nel porta pozzetti. Trasferire 150 µL sia di standard che dei campioni nei pozzetti rossi (cambiare puntale ogni volta) quindi trasferire dai pozzetti rossi ai pozzetti bianchi (che contengono l'anticorpo) 100 µL di standard e campioni (sempre cambiando puntale), alternativamente si possono dispensare i 100 microlitri di standard e campioni direttamente nei pozzetti bianchi, si può scegliere ciò che si preferisce.
3. Agitare delicatamente il supporto per 20 sec.
4. **Incubare 10 min. a temp. ambiente**
5. Vuotare il contenuto dei pozzetti e lavare 5 volte (riempire e svuotare) con il tampone di lavaggio preparato precedentemente, al termine sbattere i pozzetti su carta assorbente.
6. Aggiungere in tutti i pozzetti 100 µL di coniugato (bocchetta azzurra) ed agitare per 20 sec ed **incubare a temp. ambiente per altri 10 min.**
7. Al termine del periodo d'incubazione procedere al lavaggio come sopra
8. Aggiungere 100 µL di substrato in tutti i pozzetti (bocchetta verde) ed agitare per 20 sec ed **incubare a temp. ambiente per altri 10 min.**
9. Al termine del periodo d'incubazione aggiungere in tutti i pozzetti 100 µL della soluzione di stop (bocchetta rossa) agitare per 20 sec, pulire con carta assorbente il fondo esterno dei pozzetti e leggere al lettore con filtro a 650nm oppure 630nm oppure 620nm

10. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

**VISIVAMENTE UN CAMPIONE RISULTA NEGATIVO SE IL COLORE E' ROSA BRILLANTE
ESATTAMENTE COME LO STANDARD ZERO.**

Letture con lettore:

Scegliere per la lettura uno dei seguenti filtri: 650nm; 630nm; 620nm.

Impostare il metodo di regressione (di solito si usa una regressione lineare)

Il lettore estrapolerà dalla curva di calibrazione la concentrazione di proteine contenuta nel campione, gli standard tengono già conto delle diluizioni effettuate sul campione, la concentrazione letta è quella effettiva.

Il campione risultato positivo con il test Elisa va confermato con le metodiche ufficiali.