

VERATOX GLIADIN R5 ALLERGEN (COD. 8510)

Validazione AOAC Certificato n. 061201

1. INDICAZIONI

Saggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa di Gliadina in campioni alimentari ed in campioni ambientali.

Ditta produttrice: Neogen Corporation (U.S.A.)

Tempo richiesto: Preparazione del campione: 15 min. – 1h 45min x campioni trattati termicamente

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 6 pozzetti per gli standard

Range quantificazione: 2.5-40 ppm gliadina

LOD: 0.60 ppm di gliadina

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: 650 nm, 630 nm o 620 nm.

3. CONTENUTO DEL KIT Q.TA' DESCRIZIONE FORMATO

48 pozzetti sensibilizzati con anticorpi

48 pozzetti rossi

6 X Standard pronti all'uso di gliadina (0; 2.5 5; 10; 20; 40 ppm) vial da 2 ml etichetta gialla

2 X Coniugato Anticorpo –HRP boccetta da 5 ml etichetta blu

1 X K-Blue Substrate cromogeno boccetta da 24 ml etichetta verde

2 X 50 grammi di additivo

1 Cucchiaino plastica

1 Red Stop Solution boccetta 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. Rotore orbitale o shaker capace di tenere tubi da centrifuga da 50 cc per 1 g di campione, oppure shaker a bagno maria capace di alloggiare beute da 125mL per 2 g di campione

2. Forno o bagno maria per testare prodotti trattati termicamente

3. Bilancia per pesare da 0.25 ± 1 g.

4. Cocktail solution per reidratate le proteine per i campioni trattati termicamente

5. Pipetta da 50-200 μ L

6. Pipetta multicanale

7. Puntali

8. Tubi per la diluizione

9. Cronometro

10. Lettore micropiastre

11. Supporto per pozzetti

12. Bottiglia per lavaggio

13. Carta assorbente

14. Due Bottiglie da 1 L. per preparare la soluzione lavaggio e la soluzione d'estrazione

15. Pennarello indelebile

16. Acqua distillata

17. Etanolo

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

Buffer di estrazione e diluizione campione (PBS) - Aggiungere il contenuto della busta di alluminio, 10mM PBS, ad 1 litro di acqua distillata o deionizzata, agitare per miscelare. Conservare in frigo.

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

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

Additivo per l'estrazione – Da utilizzare con l'apposito misurino per tutti i campioni utilizzando la procedura A o B per i campioni non trattati termicamente. Per quelli trattati termicamente, procedura C, utilizzare l'additivo **solo se** il campione contiene grano saraceno, farina di castagne, tannini e composti fenolici come il cioccolato, caffè o cacao.

Pozzetti con anticorpi – Conservare i pozzetti nell'apposito sacchetto di alluminio finché non si utilizzino. Rimuovere i pozzetti dall'astuccio di alluminio solo dopo l'estrazione del campione e poco prima l'inizio dell'esecuzione del saggio.

8. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per analizzare prodotti trattati termicamente o con origine sconosciuta seguire la procedura C. Per prodotti non trattati termicamente seguire la procedura **A o B**.

Procedura A con shaker orbitale o rotore.

1. Preparare una soluzione d'estrazione al 60% di etanolo combinando 6 parti di etanolo e 4 di acqua distillata. Preparare il buffer di estrazione come descritto precedentemente.
2. Aggiungere 1 g di campione o 1 mL in un tubo da centrifuga da 50 cc
3. Aggiungere un cucchiaino di additivo contenuto nel kit.
4. Aggiungere 10 mL (9 mL nel caso di campioni liquidi) della soluzione al 60% di EtOH chiudere e agitare vigorosamente a mano per 1 minuto o al vortex per 30 sec in modo da omogeneizzare il tutto.
5. Porre il tubo su uno shaker orbitale od un rotore (150 rpm) ed agitare a temp. ambiente per 10 min. posizionando il tubo sullo shaker e legarlo con dello scotch di carta.
6. Centrifugare (se necessario) il campione per 10 minuti a ≥ 2500 rpm.
7. Diluire il campione 1:50 aggiungendo 100 μ L dello strato superficiale dell'estratto a 4.9 mL di Buffer di diluizione (PBS) preparato precedentemente.
8. Miscelare al vortex per 5 sec o agitare capovolgendo a mano il campione.
9. Testare entro 3 ore dall'estrazione

Procedura B di campioni non trattati termicamente con shaker o con shaker a bagno maria

1. Preparare una soluzione d'estrazione al 60% di etanolo combinando 6 parti di etanolo e 4 di acqua distillata. Preparare il buffer di estrazione come descritto precedentemente.
2. Aggiungere 2 g di campione o 2 mL in una beuta da 125 mL
3. Aggiungere un cucchiaino di additivo contenuto nel kit.
4. Aggiungere 20 mL (18 mL nel caso di campioni liquidi) della soluzione al 60% di EtOH chiudere e agitare vigorosamente a mano per 20 sec. in modo da omogeneizzare il tutto.
5. Porla sullo shaker (150 rpm) ed agitare a temp. ambiente per 10 min. Nel caso di shaker ad acqua **NON RISCALDARE**
6. Centrifugare (se necessario) il campione per 10 minuti a ≥ 2500 rpm
7. Diluire il campione 1:50 aggiungendo 100 μ L dello strato superficiale dell'estratto a 4.9 mL di Buffer di diluizione (PBS) preparato precedentemente.
8. Miscelare al vortex per 5 sec o a mano capovolgendo il campione più volte
9. Testare entro 3 ore dall'estrazione

Procedura C per prodotti trattati termicamente o con origini sconosciute

I prodotti trattati termicamente necessitano del cod. 8515 "Cocktail Solution" per rinaturare le proteine presenti

1. Preparare una soluzione d'estrazione all' 80% di etanolo combinando 8 parti di etanolo e 2 di acqua distillata.
2. Preparare il buffer di estrazione (PBS) come descritto precedentemente
3. Aggiungere 0.25 g di campione in un tubo con tappo a vite da 50cc
4. Aggiungere 2.5 mL di Cocktail Solution
5. Se il campione contiene grano saraceno, farina di castagne, tannini e composti fenolici come il cioccolato, caffè o cacao, aggiungere un misurino di additivo d'estrazione
6. Chiudere ed agitare al vortex per 30 sec.
7. Incubare per 40 min in forno o a bagno maria alla temperatura di 50°C
8. Rimuovere e lasciare raffreddare per 10 min
9. Aggiungere 7.5 mL della soluzione al 80% di EtOH chiudere e agitare al vortex per 20 sec. in modo da omogeneizzare il tutto
10. Porla sullo shaker (150-200 rpm) ed agitare a temp. ambiente per 1h.
11. Centrifugare se necessario per 5 min a 2500 rpm.
12. Diluire il campione 1:12.5 aggiungendo 200 µL dell'estratto a 2.3 mL di Buffer di diluizione (PBS) preparato precedentemente

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). 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)
3. Agitare delicatamente il supporto per 10 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.

Lettura 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 in **GLIADINA** contenuta nel campione, **poiché la GLIADINA è il 50% del GLUTINE, per avere la concentrazione di GLUTINE, bisogna moltiplicare il risultato per 2.** Il campione risultato positivo con il test Elisa va confermato con le metodiche ufficiali.