



## Enzymimmunoassay zum Nachweis von Deoxynivalenol

(Best.-Nr.: MD100 / MD101)

Der *Celer* DON ELISA Kit ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Deoxynivalenol. Eine Testpackung enthält Reagenzien, einschl. Standards und Anweisungen für 96 (MD100) bzw. 48 (MD101) Bestimmungen.

### Probenmaterial

Getreide, Futtermittel.

### Probenvorbereitung

- Getreide (Mais, Weizen) und Futtermittel: Mahlen, Extraktion in Methanol/Wassergemisch, filtrieren, verdünnen (optional).
- Durum Weizen: Mahlen, Extraktion in Wasser, zentrifugieren, verdünnen.

**Testdauer:** 20 Minuten (ohne Probenvorbereitung)

### Nachweisgrenzen

Mais, Weizen und Futtermittel: 0,04 ppm

Durum Weizen: 0,12 ppm

Spezifizität	
Substanz	Kreuzreaktivität
3-acetyl-DON	>100%
DON	100%
15-acetyl-DON	2%

### 1. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte (Festphase) sind mit gereinigtem anti-DON-Antikörper beschichtet. Die DON enthaltenden Standards, die Proben und enzymkonjugiertes DON werden zuerst nacheinander in die Vorverdünnungsplatte pipettiert und sorgfältig gemischt. Anschließend wird das Gemisch in die entsprechenden

Vertiefungen der beschichteten Platte zugegeben. Während der ersten Inkubation konkurrieren DON aus den Standards bzw. aus der Probe und enzym-konjugiertes DON um die auf der Festphase gebundenen anti-DON-Antikörperbindungsstellen. Anschließend werden nicht gebundene Reagenzien in einem Waschschrift entfernt. Chromogenlösung (Substrat) wird hinzu gegeben und durch das Enzymkonjugat entsteht ein blauer Farbumschlag. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe der Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag nach gelb stattfindet. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die DON Konzentration ist der Extinktion der Lösung umgekehrt proportional.

### 2. Mitgelieferte Reagenzien

Vorverdünnungs-Mikrotiterplatte: nicht beschichtet!

MD100: 96 Wells (12 Streifen à 8 Vertiefungen).

MD101: 48 Wells (6 Streifen à 8 Vertiefungen).

Test-Mikrotiterplatte: Eine mit anti-DON Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte in einem Aluminiumbeutel mit Trocknungsmittel.

MD100: 96 Wells (12 Streifen à 8 Vertiefungen).

MD101: 48 Wells (6 Streifen à 8 Vertiefungen).

*Alle Vertiefungen sind einzeln verwendbar (brechbar). Um die Vertiefungen einzeln zu verwenden, Streifen aus dem Streifenhalterahmen entnehmen und die benötigte Anzahl abbrechen.*

DON Standards: 5 braune Glasfläschchen mit je 1,5 ml DON-Standardlösung (Deoxynivalenol) in den folgenden Konzentrationen: 0 ppm; 0,04 ppm; 0,25 ppm; 1,25 ppm und 5,0 ppm, weiße Kappen.

Enzymkonjugat: 1 braune Glasflasche mit 18 ml (MD100) bzw. 12ml (MD101) Enzymkonjugatlösung, rote Kappe.

Waschpufferlösung 10X: 1 Kunststoffflasche mit 50 ml Pufferlösung Konzentrat.

Chromogenlösung: 1 braune Kunststoffflasche mit 15 ml Chromogenlösung.

Stopp-Lösung: 1 Glasfläschchen mit 9 ml Stopp-Lösung, weiße Kappe.

### 3. Zusätzlich benötigte Materialien Für die Probenvorbereitung

- Präzisionswaage
- Methanol
- dest. Wasser
- NaCl
- Mühle
- Hochgeschwindigkeits-Homogenisator z.B. Ultra Turrax, Osterizer bzw. Mischer (400 upm)
- Zentrifuge (Durum Weizen), Filterpapier (z.B. Whatman 1)

#### Für die Testdurchführung

- Variable Mikropipetten, 20-200µl
- Variable Multikanal-Mikropipette, 50-300µl
- Absorbierendes Papier
- Mikrotiterplatten-Photometer mit 450nm Filter

### 4. Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur In-vitro Diagnostik.
- Einige Reagenzien enthalten Konservierungsmittel. Die Stopp-Lösung enthält Schwefelsäure und ist ätzend! Die Standards enthalten Methanol und sind toxisch und leicht entflammbar. Reagenzien mit Vorsicht behandeln. Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhaut vermeiden.
- Sicherheitsdatenblätter sind auf den Tecna Webseiten verfügbar. ([www.tecnalab.com](http://www.tecnalab.com))

### 5. Lagerung und Handhabung

- Kit und Kitkomponenten bei +2 bis +8°C lagern. Nicht einfrieren!
- Unbenutzte Teststreifen zusammen mit dem beigefügten Trocknungsmittel sofort wieder einschließen.
- Kitkomponenten nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden!
- Einzelreagenzien aus Testkits verschiedener Chargen nicht austauschen.
- Gebrauchsanweisungen aus dem Testkit verwenden, keine Kopie aus früheren Testkits verwenden.

### 6. Probenvorbereitung

#### 6.1 Weizen, Mais und Futtermittel

1. Die Probe gut mischen und anschließend fein zermahlen, um eine homogene Verteilung zu gewährleisten.
2. 50 g der zermahlenden Probe in einem geeigneten Gefäß wiegen, 10 g NaCl zugeben und in 250 ml 70% Methanol/Wasser-Gemisch suspendieren. **Alternativ:** 5 g der Probe in einem geeigneten Gefäß wiegen, 1 g NaCl zugeben und in 25 ml 70% Methanol/Wasser-Gemisch suspendieren.\*
3. 3 Minuten (Hochgeschwindigkeits-Homogenisator) gründlich mischen.
4. Mit einem Papierfilter (Whatmen Nr. 1) filtrieren.
5. Den Extrakt unverdünnt in den Test einsetzen. Messbereich: 0,04 ppm - 5,0 ppm. Für zu erwartende Konzentrationen über 5,0 ppm den Extrakt 1:5 mit

70% Methanol/Wasser-Gemisch verdünnen und die Verdünnung in den Test einsetzen.

#### 6.2 Durum Weizen

1. Die Probe gut mischen und anschließend fein zermahlen, um eine homogene Verteilung zu gewährleisten.
2. 50 g der zermahlenden Probe in einem geeigneten Gefäß wiegen und in 250 ml dest. Wasser suspendieren. **Alternativ:** 5 g der Probe in einem geeigneten Gefäß wiegen und in 25 ml dest. Wasser suspendieren.\*
3. 15 Minuten (Hochgeschwindigkeits-Homogenisator) gründlich mischen.
4. Bei 3500 g 5 Minuten zentrifugieren.
5. Den Überstand 1:3 (z.B. 100 µl + 200 µl) mit Methanol verdünnen. Diese Verdünnung in den Test einsetzen, wenn Konzentrationen bis 15,0 ppm zu erwarten sind.
6. Für zu erwartende Konzentrationen über 15,0 ppm den Extrakt 1:5 mit 70% Methanol/Wasser-Gemisch verdünnen und diese Verdünnung in den Test einsetzen. Messbereich: 0,6 ppm - 75,0 ppm.

\**Hinweis:* Wir empfehlen eine Einwaage von 50 g.

### 7. Testvorbereitung

#### Reagenzienvorbereitung

- DON Standards: Die Standards sind gebrauchsfertig. (**Achtung: vor Gebrauch vorsichtig schütteln**)
- Enzymkonjugat: Das Enzymkonjugat ist gebrauchsfertig.
- Waschpufferlösung 10X: Waschpufferkonzentrat 1:10 (1+9) mit destilliertem Wasser verdünnen. **ACHTUNG! Bei Auftreten von Kristallbildung das Konzentrat auf RT erwärmen, bis es vollständig gelöst ist und erst anschließend verdünnen.**
- Chromogenlösung: Die Chromogenlösung ist gebrauchsfertig. Vor Licht schützen!
- Stopp-Lösung: Die Stopplösung ist gebrauchsfertig. Vorsicht, enthält 2M Schwefelsäure, mit Vorsicht behandeln. Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhaut vermeiden.

### 8. Testdurchführung

#### 8.1 Wichtige Hinweise

- Vor Testbeginn alle Reagenzien für ca. 1 Stunde auf Raumtemperatur erwärmen.
- Sofort nach Gebrauch Reagenzien wieder im Kühlschrank (2-8°C) aufbewahren.
- Keine Änderungen an der Gebrauchsanweisung vornehmen, insbesondere:
  - Inkubationszeiten strikt einhalten, Verlängerungen bzw. Verkürzungen sind nicht zulässig.
  - Inkubationsschritte nicht bei über 25°C und nicht bei unter 18°C durchführen.
  - Mikrotiterplatte während der Inkubationsschritte nicht schütteln.

- Nur genaue und präzise Mikropipetten mit geeigneten Pipettenspitzen verwenden.
- Test zügig durchführen (ohne Unterbrechung oder lange Pausen). Mikrotiterplatte darf nicht austrocknen.
- Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Unzureichendes Waschen führt zu fehlerhaften Ergebnissen.
- Um Kreuzkontamination zu verhindern, immer frische Pipettenspitzen für Proben, Standards und Kontrollen verwenden.
- Bitte beachten, dass die Pipettenspitzen nicht mit den in den Mikrotiterplatten-Vertiefungen befindlichen Flüssigkeiten bzw. dem Rand der Vertiefungen in Berührung kommen, da dies zu einer Kontamination führen könnte.
- Mikrotiterplatte während der Inkubation vor Licht schützen.
- Nicht benötigte Teststreifen in den Beutel mit Trocknungsmittel wieder verschließen.

## 8.2 ELISA Testdurchführung

1. Zunächst sollte ein Testprotokoll erstellt werden. Dabei Standards (Standard 0 ppm = B<sub>0</sub>) bzw. Kontrollen und Proben den entsprechenden Vertiefungen zuweisen. Die erforderliche Anzahl Vertiefungen in den Halterahmen einsetzen. Restliche Vertiefungen wieder in der Verpackung verschließen. Die genaue Anzahl Vertiefungen der Vorverdünnungsplatte vorbereiten.

**ACHTUNG: Es wird empfohlen, nicht mehr als 48 Proben (einschl. Standards) in einem Arbeitsgang durchzuführen, bzw. nur 16 Proben, wenn keine Multikanalpipetten eingesetzt werden.**

2. Mittels einer Multikanalpipette 100 µl Enzymkonjugat in alle benötigten Vertiefungen der Vorverdünnungs-Mikrotiterplatte pipettieren.
3. Je 50 µl der Standards bzw. Kontrollen und Proben in die vorgesehenen Vertiefungen pipettieren. Vorsicht beim Pipettieren, die Standards und Proben enthalten 70% Methanol, Pipettenspitzen mit Standards bzw. Proben vorspülen. Pipettenhersteller Anweisung für Lösungsmittelproben beachten.
4. Mittels einer Multikanalpipette die Flüssigkeit in den Vertiefungen vorsichtig mischen und sofort 100 µl des Gemisches in die korrespondierenden Vertiefungen der beschichteten Mikrotiterplatte transferieren.

**Achtung: Bei jeder Reihe neue Pipettenspitzen verwenden, um Kontaminationen auszuschließen.**

5. Genau 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Inkubation nicht verlängern! Nicht schütteln!
6. Waschsequenz -
  - Vertiefungen entleeren
  - Mittels Waschflasche bzw. Multikanalpipette die Vertiefungen mit frisch verdünnter Waschlösung füllen und anschließend die Flüssigkeit abdekantieren. Überschüssige Flüssigkeit entfernen, indem die Mikrotiterplatte mit der Rückseite nach oben auf absorbierendes Papier geschlagen wird.

Diesen Vorgang 3mal wiederholen.

- Vorsicht; die Vertiefungen dürfen nicht austrocknen!
7. Mittels einer Multikanalpipette 100 µl Chromogenlösung in alle Vertiefungen pipettieren. Vorsichtig mischen!
  8. Anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Vor Licht schützen!
  9. Mittels einer Multikanalpipette 50 µl Stopp-Lösung in alle Vertiefungen pipettieren. Vorsichtig mischen.
  10. Innerhalb 60 Minuten in einem Mikrotiterplattenreader bei 450 nm ablesen.

## 9. Berechnungen

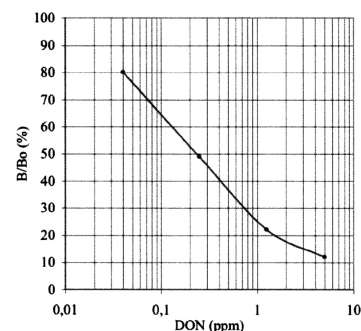
1. Die Extinktionsmittelwerte für die Standards und Proben berechnen.
2. Die Extinktionsmittelwerte der Standards bzw. Proben durch die Extinktion des Nullstandards (B<sub>0</sub>) dividieren und dann mit 100 multiplizieren.

$$\frac{\text{Extinktion Std. / Proben}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = \frac{B}{B_0} (\%)$$

3. Die B/B<sub>0</sub> Werte für die Standards ausrechnen. Die Werte der Standards werden auf halblogarithmischem Millimeterpapier aufgetragen bzw. in ein EDV-Programm eingegeben und eine Eichkurve erstellt.
4. Mit Hilfe der Eichkurve wird für die gemittelten B/B<sub>0</sub> der Proben deren Konzentration abgelesen bzw. vom EDV-Programm errechnet.
  - Für Weizen-, Mais- und Futtermittelproben ist die errechnete Konzentration gleich der DON Konzentration in der Probe.
  - Bei Maisproben empfehlen wir, einen Korrekturfaktor von x 1,2 zu verwenden.
  - Für Durum Weizenproben müssen die errechneten Konzentrationen mit 3 multipliziert werden.
  - Für alle weiterverdünnten Proben die errechnete Konzentration mal 5 multiplizieren!

*HINWEIS: Für die Berechnung der Ergebnisse stehen Excel-Spreadsheets unter [www.tecnalab.com](http://www.tecnalab.com) zur Verfügung.*

## 10. Eichkurven Beispiel



## 11. Auswertung

Um mögliche Fehler bzw. falsche Ergebnisse auszuschließen, müssen die erzielten Werte mit den Testspezifikationen der in den Testkits mitgelieferten Gebrauchsanweisungen übereinstimmen. Sollte dies nicht der Fall sein, sollten folgende Fehlermöglichkeiten geprüft werden:

Verfallsdatum! Ist das Testkit schon verfallen? Wurde der richtige Filter (450 nm) verwendet? Wurden die Testanleitungen genau befolgt?

Wenn keine ersichtlichen Gründe für die fehlerhaften Ergebnisse vorliegen, bitte Kontakt mit unserer technischen Abteilung aufnehmen.

HINWEIS: Bei Vorliegen einer Reklamation bitte das Testkit wieder bei 2-8°C lagern. Eine Ersatzlieferung kann nur nach Rücknahme der reklamierten Ware erfolgen.

## 12. Testspezifikationen

### 12.1 Messrichtwerte

Mittel B<sub>0</sub> Extinktion       $\geq 0,7 \text{ OD}_{450}$

B/B<sub>0</sub> 50%                    0,07 - 0,41 ppm

### 12.2 Test Merkmale

LOQ (Weizen, Mais, Futtermittel)    0,125 ppm

LOQ (Durum Weizen)                    0,25 ppm

## 13. Literatur

Rapid and sensitive DON mycotoxin assay comparison on wheat, durum wheat and corn. F. Diana, G.Rosar, L. Persic and M Paleologo. Food and Beverage Test Expo, 8-10 Feb. 2011, Cologne, Germany.

## 14. Haftungsbeschränkungen

1. Proben, die mit der ELISA Methode als positiv getestet werden, müssen mit einer Referenzmethode bestätigt werden.
2. Der Hersteller haftet nicht für direkte oder indirekte Schäden, die aus einem unsachgemäßen Einsatz des Testkits bzw. einer fehlerhaften Testdurchführung entstehen.