

## Validace nových ELISA souprav na stanovení obsahu kaseinu a hovězího sérového albuminu

Gabrovská D.<sup>1</sup>, Hanák P.<sup>1</sup>, Rysová J.<sup>1</sup>, Šturm F.<sup>2</sup>, Tomková K.<sup>2</sup>, Šafářová P.<sup>2</sup>, Dvorská P.<sup>2</sup>, Nesládková K.<sup>1</sup>, Hušková M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.

<sup>2</sup>) SEDIUM RD, s.r.o.

V rámci projektu 2B06138 "Metody stanovení alergenních složek v potravinách" byly vyvinuty, validovány a zkompletovány 2 ELISA soupravy kompetitivního typu a jednotného formátu na stanovení mléčného kaseinu a hovězího sérového albuminu. Obě soupravy budou sloužit ke stanovení alergenních složek v potravinách, jak je požadováno Vyhláškou č. 101/2007 Sb., o způsobu označování potravin a tabákových výrobků. Stanovení přítomnosti hovězího sérového albuminu může sloužit i ke kontrole uváděného složení masných výrobků.



### ELISA souprava pro stanovení kaseinu

antigen – Casein from bovine milk, kat. č. C - 5890, Sigma - Aldrich

#### ELISA souprava kompetitivního typu

Deska s víčkem: 12 stripů po 8 jamkách v rámečku, dodavatel Dialab, jamky jsou potaženy specifickou polyklonální protilátkou.

Standardy: 5 standardních roztoků obsahujících kasein s koncentracemi 0; 0,1; 0,3; 1,0 a 3,0 µg/ml

Kontrolní vzorky: 2 kontrolní vzorky s hodnotami obsahu kaseinu 0 a 0,5 µg/ml

Extrakční pufr: pufr obsahující borát a stabilizátory

Biotinylovaný kasein: roztok biotinylovaného kaseinu v pufru obsahující fosfát a stabilizátory

Koncentrát konjugátu: koncentrát konjugátu HRP - STR ve fosfátovém pufru se stabilizátory

Chromogenní substrát TMB (tetramethylbenzidin)

Stop roztok: 2M kyselina chlorovodíková

Koncentráty pufrů na ředění konjugátu

Koncentrát promývacího roztoku: fosfátový pufr s detergenty



#### Princip stanovení

V jamkách destičky, které jsou pokryty specifickou protilátkou je smíchán vzorek s kaseinem značeným biotinem, při následné inkubaci dochází k navázání kaseinu na stěny jamek. Kasein ve vzorcích a biotinylovaný kasein soutěží o omezený počet vazebných míst na protilátce proti kaseinu. Po inkubaci jsou jamky promyty a do jamek je přidán konjugát křivočerné peroxidázy se streptavidinem (HRP-STR). Po následné inkubaci jsou jamky promyty a na jamkách navázaná peroxidáza je detekována přidávkem chromogenního substrátu (TMB). Intenzita vzniklého zbarvení je nepřímo úměrná koncentraci kaseinu ve standardech a vzorcích.

#### Příprava vzorku

Extrakce 1,0 g vzorku v 10 ml extrakčního pufru po dobu 5 minut, za stálého třepání. Vzorky potravin obsahující maso je nutné během extrakce ohřát na 70 °C. Extrakt je následně odstředěn a supernatant použit přímo na stanovení ELISA metodou.

**Parametry soupravy** – byly stanoveny a testovány

<b>Limit detekce</b>	0,024 µg/ml	0,24 mg/kg
<b>Limit stanovitelnosti</b>	0,130 µg/ml	1,3 mg/kg

**Opakovatelnost:** testována **ve stanovení** (nemléčné matrice byly kontaminovány přidávkem kaseinu a analyzovány ve 25 jamkách); **vliv extrakce** (5 nezávislých extrakcí 2 potravin s přirozeným obsahem kaseinu); **mezi stanoveními** (nemléčné matrice byly kontaminovány přidávkem kaseinu, rozdělány na alikvoty, skladovány při -25 °C a analyzovány v několika pokusech lišících se použitými složkami soupravy)

**Správnost: standardní přídavek** (nemléčné matrice byly kontaminovány přidávkem kaseinu na 2 hodnoty koncentrace a analyzovány); **vliv ředění** (vzorky obsahující kasein byly ředěny roztokem nulového standardu a analyzovány)

**Testování nulových matic:** analyzována řada potravinových nemléčných matic pokrývajících základní suroviny pro výrobu potravin (olej, cukr, mouka, vejce, ryby, maso, kakao, koření)

**Zátěžové testy a testy stability: drift** (sledování vlivu doby prodloužení 10, 20, 30 a 40 minut v pipetování); **tepelné zátěžové standardů** (teplota 8 °C a 37 °C po dobu 7, 14, 21 a 28 dní), **konjugátu** (teplota 8 °C a 37 °C po dobu 5 a 8 dní) a **biotinylovaného kaseinu** (8 °C a 37 °C po dobu 3 a 5 dní); **celé soupravy** (teplota 8 °C, -25 °C a 37 °C po dobu 4 a 7 dní); byl proveden **test odpařování kapalných komponent soupravy** (kapalné komponenty soupravy byly za laboratorní teploty (18 - 25 °C) otevřeny a ponechány stát po dobu 180 minut, po uplynutí doby bylo provedeno stanovení a porovnání s referenční soupravou) a **test překlopení soupravy** (všechny kapalné komponenty v soupravě byly překlopeny dnem vzhůru a takto skladovány po dobu 3 dnů při teplotě 8 °C, po uplynutí doby bylo provedeno stanovení spolu s referenční soupravou)

Bylo provedeno mezilaboratorní testování (8 laboratoří), souprava je komerčně dostupná.

### ELISA souprava pro stanovení hovězího sérového albuminu

antigen - BSA - Serva kat. č. 11930, Albumin bovine fraction V, pH 7.0

Provedeno testování specifity vybrané protilátky – ovčí, kozí, vepřový albumin – nedetekována žádná zkřížená reakce

#### ELISA souprava kompetitivního typu

Deska s víčkem: 12 stripů po 8 jamkách v rámečku, dodavatel Dialab, jamky jsou potaženy specifickou polyklonální protilátkou.

Standardy: 5 standardních roztoků BSA v pufru obsahujícím Tris a stabilizátory s koncentracemi 0; 0,3; 1,5; 6,0 a 30 µg/ml

Kontrolní vzorky: 2 kontrolní vzorky s hodnotami 0 a 5 µg/ml

Koncentrát extrakčního pufru: pufr obsahující Tris a stabilizátory

Koncentrát konjugátu: koncentrát konjugátu BSA s peroxidázou ve fosfátovém pufru se stabilizátory

Chromogenní substrát TMB

Stop roztok: 2 M kyselina chlorovodíková

Pufr na ředění konjugátu: fosfátový pufr se stabilizátory

Koncentrát promývacího roztoku: fosfátový pufr s detergenty



#### Princip stanovení

V jamkách destičky, které jsou pokryty komerční protilátkou, je smíchán vzorek s konjugátem BSA-HRP (horse radish peroxidase), při následné inkubaci dochází k navázání BSA na stěny jamek. BSA ve vzorcích a BSA v konjugátu soutěží o omezený počet vazebných míst na protilátce proti BSA. Po následné inkubaci jsou jamky promyty a na jamkách navázaná peroxidáza je detekována přidávkem chromogenního substrátu (TMB). Intenzita vzniklého zbarvení je nepřímo úměrná koncentraci BSA v roztocích standardů a vzorcích.

#### Příprava vzorku

Extrakce 0,5 gramu pevného nebo 0,5 ml kapalného vzorku v 5 ml extrakčního pufru. Extrakce probíhá po dobu 30 minut za stálého třepání. Po skončení extrakce je vzorek odstředěn po dobu 10 minut, supernatant je odebrán přímo na stanovení ELISA metodou.

**Parametry soupravy** – byly stanoveny a testovány

<b>Limit detekce</b>	0,020 µg/ml	0,2 mg/kg
<b>Limit stanovitelnosti</b>	0,370 µg/ml	3,7 mg/kg

**Opakovatelnost:** testována **ve stanovení** (matrice bez přirozeného obsahu BSA byly kontaminovány přidávkem BSA a analyzovány ve 25 jamkách); **vliv extrakce** (3 nezávislé extrakce 3 matic s přirozeným obsahem BSA); **mezi stanoveními** (3 matrice s přirozeným obsahem BSA byly extrahovány, extrakt rozdělán na alikvoty, které byly skladovány při -25 °C a analyzovány v pokusech lišících se použitými složkami soupravy)

**Správnost: standardní přídavek** (matrice bez přítomnosti BSA byly kontaminovány definovaným přidávkem BSA na 2 hodnoty a analyzovány); **vliv ředění** (matrice obsahující BSA byly ředěny extrakčním pufrům a analyzovány)

**Testování nulových matic:** analyzována řada potravinových matic pokrývajících základní suroviny, u kterých lze předpokládat nulový obsah BSA pro výrobu potravin (olej, cukr, mouka, rýže, ovesné vločky, džus, pivo, hořčice, ryby, maso vepřové a kuřecí)

**Zátěžové testy: drift** (sledování vlivu doby prodloužení 10, 20, 30 a 40 minut v pipetování), **vliv teploty inkubace na stanovení BSA** (testován vliv teplot inkubace při 18 °C, 22 °C, 25 °C a 37 °C), **tepelné zátěžové standardů** (roztoky standardů byly rozdělány na alikvoty a skladovány při teplotách 8 °C a 37 °C po dobu 7, 14, 21 a 28 dní a byly analyzovány, ostatní složky soupravy byly skladovány při 8 °C); **nakoutovaných desek** (desky byly skladovány při teplotách 8 °C a 37 °C po dobu 7, 14, 21 a 28 dní a analyzovány); **celé soupravy** (skladování při teplotách 8 °C, -20 °C a 37 °C po dobu 4 a 7 dní); **test odpařování kapalných komponent soupravy** (kapalné komponenty soupravy byly za laboratorní teploty (18 - 25 °C) otevřeny a ponechány stát po dobu 180 minut, po uplynutí doby bylo provedeno stanovení a porovnání s referenční soupravou) a **test překlopení soupravy** (všechny kapalné komponenty v soupravě byly překlopeny dnem vzhůru a takto skladovány po dobu 3 dnů při teplotě 8 °C, po uplynutí doby bylo provedeno stanovení spolu s referenční soupravou)

Bylo provedeno mezilaboratorní testování (8 laboratoří), souprava je komerčně dostupná.