

MAIA Pesticide MultiTest®

GIDALARDA PESTİSİT KALINTILARI İÇİN AB MAKSİMUM KALINTI LİMİTLERİ İLE UYUMLU ÇOKLU KALINTI TARAMA TESTİ

Microplate Acetylcholinesterase Inhibition Assay (MAIA) katı veya sıvı gıda örneklerinin hidro-asetonitrilik ekstraktlarında organik fosforlu, organik klorlu ve karbamatlı pestisitlerin kalıntılarını tespit etmek için geliştirilmiştir. Bu üç gruba ait pestisit moleküllerinin ortak özelliği asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesini inhibe etmeleridir. MAIA testi, AChE aktivitesinin inhibisyonu prensibine dayalı yarı kantitatif kolorimetrik bir metottur.

MAIA ile gıdalarda pestisit kalıntılarının tespiti için öncelikle oldukça pratik bir protokol ile pestisit ekstraksiyonu gerçekleştirilmelidir. Elde edilen ekstrat ve AChE ön inkübasyona bırakılır. MAIA mikrolakalarında gerçekleştirilen ön inkübasyon sonrasında enzim-ekstrakt sistemine reaksiyonun uygun substratı olan asetil tiyokolin ve tiyokolin için geliştirilmiş kromojenik detektör ilave edilir. Son olarak reaksiyon bir enzimatik protein denatürantı tarafından durdurulur. Böylece test prosedürü tamamlanmış olur. Sonuçların değerlendirilmesi plaka okuyucudan elde edilen absorbans değerleri ile veya doğrudan örnek kuyucuklarındaki renk değişimlerinin kontrol kuyucukları ile kıyaslanması ile gerçekleştirilebilir.

KİT İÇERİĞİ

1 mikrolaka (96 kuyucuklu)

1 yapışkanlı bant

10 ampul liyofilize MAIA MEDIUM (memeli AChE ve pH tamponu içerir)

10 ampul MAIA STARTER (ATCI (acetylthiocholine iodide) ve DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) içerir)

1 şişe MAIA Tuz (ekstraksiyon için)

Çok kanallı pipet için küvet

İlave Reaktifler

HPLC grade saf su

ACS grade Asetonitril

GEREKLİ CİHAZ ve EKİPMAN

1-5 ml' ye ayarlanabilir pipet

50-300 µl' ye ayarlanabilir çok kanallı pipet

Terazi

Blender

Vorteks

Masaüstü santrifüj

Mikroplaka çalkalayıcı

Mikroplaka okuyucu ($\lambda = 405$ nm, filtreli)

TEST PROSEDÜRÜ

Gıda, su ve içeceklerde organik fosforlu, organik klorlu ve karbamatlı pestisitlerin kalıntılarını tespit etmek için geliştirilmiş AChE inhibition assay (MAIA) prosedürü aşağıdaki adımlarda açıklanmıştır:

1.Sıvı gıdalarda ekstraksiyon

- 4 ml sıvı örnek test tüpüne aktarılır
- 4 ml asetonytril eklenir
- Test tüpü kapatılarak 1 d vorteks veya manuel olarak karıştırılır
- Kapak açılarak 2 g tuz ilave edilir
- 1 d vorteks veya manuel olarak karıştırılır
- 3000 rpm'de 10 d santrifüj edilir. Santrifüj sonrası supernatant EKSTRAKT olarak kullanılır.

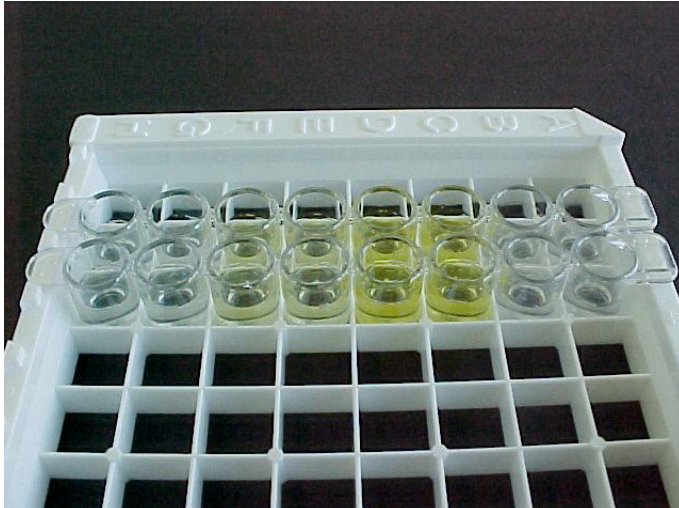
2.Katı gıdalarda ekstraksiyon

- Hayvansal veya bitkisel, donmuş veya taze gıda örneğinden 50 g alınır ve blender ile parçalanır
- 10 ml' lik test tüpüne, 4 g parçalanmış gıda örneği, 1 ml saf su ve 4 ml asetonytril eklenir
- 30 s vorteks ile homojenize edilir.
- 2 g tuz ilave edilir ve test tüpü kapatılır.
- 1 d vorteks ile homojenize edilir.
- 3000 rpm' de 10 d santrifüj edilir. Santrifüj sonrası supernatant EKSTRAKT olarak kullanılır

- 3.** Mikroplaka üzerindeki test kuyucuklarına 100 µl EKSTRAKT dağıtılır.
- 4.** Kuyucuklar içerisindeki EKSTRAKT doğrudan hava akımını altında oda sıcaklığında kurutulur. Kuruma süreleri laboratuvar sıcaklığına bağlı olarak değişim gösterir.
- 5.** MEDIUM ampulüne 3,5 ml saf su ilave edilerek MEDIUM solüsyonu hazırlanır. 1 MEDIUM ampülü 4 test kolonu için yeterlidir. Solüsyonun çözünmesi için ampul karıştırılır. Çok kanallı pipet küvetine MEDIUM solüsyonu ilave edilir.
- 6.** Test edilecek tüm kuyucuklara 100 µl MEDIUM solüsyonu çok kanallı pipet yardımıyla dağıtılır.
- 7.** Kit içerisinde mevcut olan yapışkanlı bant ile mikroplaka kapatılır.
- 8.** Mikroplaka oda sıcaklığında ve çalkalayıcı üzerinde 50 d ön-inkübasyona bırakılır.
- 9.** STARTER ampülü içerisine 2,5 ml saf su ilave edilerek STARTER solüsyonu hazırlanır. 1 STARTER ampülü 4 test kolonu için yeterlidir. Solüsyonun çözünmesi için ampul karıştırılır ve direk ışıktan korunur. Çok kanallı pipet küvetine STARTER solüsyonu ilave edilir.
- 10.** Test edilecek tüm kuyucuklara 50 µl STARTER solüsyonu çok kanallı pipet yardımıyla dağıtılır. STARTER solüsyonu dağıtıldıktan sonra yapışkanlı bant ile mikroplaka kapatılarak reaksiyonun karanlıkta gerçekleştirilmesi sağlanır.
- 11.** Kuyucuklara STARTER solüsyonu dağıtıldıktan 8 d sonra 100 µl STOPPER solüsyonu çok kanallı pipet yardımıyla dağıtılır.
- 12.** Mikroplaka çalkalayıcıda 3 d bekletilir.
- 13.** 405 nm dalga boyunda kuyucuklardaki absorbans ölçülür.

SONUÇLARIN YORUMLANMASI

Sonuçların değerlendirilmesi plaka okuyucudan elde edilen absorbans değerleri ile veya doğrudan örnek kuyucuklarındaki renk değişimlerinin kontrol kuyucukları ile kıyaslanması ile gerçekleştirilebilir.



TESPİT LİMİTİ

Aşağıdaki tabloda süt örnekleri için tespit limitleri verilmiştir.

Pestisit	Tespit Limiti
Paraoxon	< 0,01 mg/kg
Carbaryl	< 0,1 mg/kg
DDT	< 0,1 mg/kg

ÖNERİLER

1. Kurutma süresi laboratuvar sıcaklığına göre değişim gösterir. (Örneğin 25°C için 15 d, 20°C için 30 d, 18°C için 45 d). Gereken sürenin dışında kurutma işlemini uzatmayınız.
2. Enzim aktivitesi laboratuvar sıcaklığına göre değişim gösterir. STARTER (kromojenik reaksiyon) adımı şu şekilde ayarlayınız: 25°C için 8 d, 20°C için 10 d, 18°C için 12 d.
3. MEDIUM solüsyonunu hazırlarken köpük oluşturmada dairesel hareketlerle karıştırınız.
4. MEDIUM solüsyonunu ilave ettikten sonra yapışkanlı bandın kuyucuklar üzerinde yapışıp yapışmadığını kontrol ediniz.
5. STARTER solüsyonunu küvet içerisinde ve reaksiyon aşamasında direk ışıktan uzak tutunuz.
6. STOPPER solüsyonu ve kuyucuklar içerisindeki inkübe edilmiş örneklerin iyice karışması 2 kez pipetleme yapılarak sağlanır. Her kolonda reaksiyonun durdurulmasından sonra pipet uçlarını değiştiriniz.
7. MEDIUM solüsyonundan STARTER solüsyonuna geçerken çok kanallı pipetinizi 100 µl' den 50 µl' ye; STARTER solüsyonundan STOPPER solüsyonuna geçerken çok kanallı pipetinizi 50 µl' den 100 µl' ye ayarlayınız.

KULLANICI İÇİN KALİTE KONTROLÜ

Kullanıcı negatif ve pozitif kontrolü kontrol kolonlarını kullanarak test edebilir. Kontrol kolonları; pestisit içermeyen kurutulmuş süt ve Paraoxon (organik fosforlu) ve Carbaryl (karbamatlı) pestisitlerini içeren kurutulmuş süt örnekleri içermektedir.

SAKLAMA KOŞULLARI

2-8°C' de saklayınız.

HIZLI SONUÇ
UYGULAMA KOLAYLIĞI
GENİŞ SPEKTRUM
DÜŞÜK MALİYET