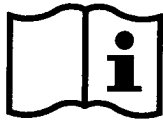


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Aflatoxin (total) Im- munoaffinity Column

Sample Preparation and Concentration for the Quantitative Analysis
of Aflatoxin with ELISA or HPLC

REF

DEAFBA01



96

Capacity	> 200 ng
Recovery (spiked samples)	97 %

1. GENERAL INFORMATION

Aflatoxins belong to the class of mycotoxins. Chemically they are defined as difuranocyclopentanocumarines or difuranopentanolidocumarines, i.e. aflatoxins contain a dihydrofuran or a tetrahydrofuran ring, to which a substituted coumarin system is condensed. Out of about 20 known aflatoxins, the moulds *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* produce exclusively aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂, and all the other aflatoxins are derivatives of these four. The derivatives are developed either by metabolism in humans, animals and microorganisms or by environmental reactions.

Aflatoxins belong to the strongest mycotoxins, which act primarily in a hepatotoxic and carcinogenic way. The four main aflatoxins show a different toxicity. B₁ is without doubt the most toxic aflatoxin, followed by G₁, B₂ and G₂. Aflatoxin B₁, however, does not show a direct toxic action. In the process of biotransformation in the liver, the lipophilic toxin is epoxidated and transformed into an active derivative, the so-called aflatoxin B₁-2,3-epoxid. This highly reactive epoxid is able to react with nucleophilic regions of macromolecules. Amongst others this metabolite of aflatoxin B₁ binds covalently to the N-7 atom of the guanine bases of DNA. This covalent bond causes an inhibition of the DNA replication, the RNA synthesis and mutations.

Both chronic and acute intoxications are effected by aflatoxins. There are only few documented reports about acute intoxications, which are caused by uptake of mycotoxins. Of special importance for human beings are the chronic intoxications by aflatoxins. To the diseases, which develop after such chronic intoxications, belong primary liver carcinoma, hepatitis, Reye's syndrome and Kwashiorkor. Besides the generation of primary liver carcinoma, aflatoxins are presumably also responsible for other sorts of tumors, like intestinal cancer.

Contaminations with aflatoxins occur mostly with nuts and grain. In most cases aflatoxins penetrate the human body via the food. Aflatoxins are stable to heat and are only partly destroyed by boiling. In order to protect people against aflatoxin-induced diseases, there is a need for the quantitative and qualitative control of endangered foodstuff, besides appropriate hygienic precautions, which avoid the formation of aflatoxins.

The **Aflatoxin Immunoaffinity Column (IAC)** is a helpful tool in specific isolation and enrichment of aflatoxin from different matrices. It binds the aflatoxin derivatives B₁, B₂, G₁, G₂ and M₁. After the IAC procedure the eluate can be quantitatively analyzed by various analytical techniques like the **Aflatoxin ELISA** or HPLC.

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

The **Aflatoxin Immunoaffinity Column** is based on the principle of an antibody-antigen reaction. A polyclonal antibody raised against aflatoxin is bound on a sepharose gel, which is fixed between two frits in a polypropylene column. By passing the sample solution through the column, aflatoxin is bound selectively by the antibody fixed on the sepharose gel. Unbound matrix material is removed in a wash step. Bound aflatoxin is eluted by a small amount of methanol (100 %). This eluate is used for further quantification by ELISA, HPLC or any other appropriate analytical method.

3. PRECAUTIONS

Full compliance of the following good laboratory practices (GLP) will determine the reliability of the results:

1. Prior to beginning of the immunoaffinity column cleanup procedure, bring all reagents to room temperature (20-25 °C).
2. Once the cleanup procedure has been started, all subsequent steps should be completed without interruption.
3. Use a separate disposable tip for each specimen to prevent cross-contamination.
4. Do not use reagents after expiration date.
5. Check both precision and accuracy of the laboratory equipment used during the procedure (micropipets, etc.).

4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

1. Do not smoke or eat or drink or pipet by mouth in the laboratory.
2. Wear disposable gloves whenever handling patient specimens or any other material of biological origin. Note that aflatoxins are very toxic substances, which may cause cancer and other serious diseases due to inhalation, ingestion or skin contact.
3. Handling and disposal of chemical products must be done according to good laboratory practices (GLP).

5. CONTENT

10 immunoaffinity columns for the cleanup and concentration of aflatoxin containing samples.

6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)

Instrumentation

- Syringe
- Pump unit
- Balance
- Homogenizer (mixer, magnetic stirrer)
- Clamp
- Centrifuge, filtering paper
- Funnel, beakers
- Micropipets

Reagents

- Double distilled/deionised water
- Methanol (100 %)
- 0.01 M PBS
- Hydrochloric acid (1 N)
- Hydrochloric acid, concentrated (36 %)
- Sodium hydroxide (1 N)

7. SAMPLE PREPARATION

Basically all aqueous solutions can be used as samples. Make sure that the pH is at 7.0 ± 0.5 . If this is not the case, use hydrochloric acid (1 N) or sodium hydroxide (1 N) for pH adjustment. If the sample is not clear, it must be filtered or centrifuged for not risking a blockade of the column.

Solid samples

- An appropriate amount of solid sample (e.g. grain or nuts) is crushed in a mortar or mixer to produce a fine to medium-fine powder. If flour is used, the first step can be omitted.
- 2 g of this powder are extracted with 10 mL methanol / double distilled water (70/30 v/v). This mixture is agitated for 30 minutes on a horizontal shaker (120 / minute). Alternatively also a magnetic stirrer can be used.
- The mixture is filtrated or centrifuged afterwards for 5 minutes at 3000 g.
- The filtrate is diluted 1:10 in 0.01 M PBS (pH 7).

Liquid samples

- Samples with a high fat content (e.g. full cream milk) should be centrifuged prior to use (2-8°C, 3000g, 15 minutes) to separate the fat.
- After removal of the fat layer the sample can be applied directly onto the column. If the sample is highly viscous it can be diluted 1:2 to 1:10 in 0.01 M PBS.
- Protein rich samples can be deproteinated prior to use. 20 µL concentrated hydrochloric acid (36%) is added to 5 mL sample and incubated for 45 minutes at 60°C. The sample is centrifuged for 10 minutes at 3000 g and the pH is adjusted with sodium hydroxide solution (1 N).

8. PROCEDURE

1. For each sample use a new column.
2. Let column and sample reach ambient temperature before use.
3. Take off the upper cap of the column and cut the bottom of the cap horizontally using a knife. Then place the opened cap again onto the column.
4. Connect the column to the syringe and fix the whole combination with a clamp. Place a beaker under the column.
5. Fill prepared sample into the syringe. The necessary sample volume depends on the sensitivity to be reached with the following quantification technique. Uncap the lower end of the column.
6. The sample is passed through the column using gravity. Application of slight pressure might be helpful until the first drop appears at the lower end of the column.
7. After the binding the column is washed by adding 10 mL distilled water to the syringe and passing it through the column. Remove any unbound water from the gel by passing quickly 1-2 times air through the column using the pump unit.
8. Place a clean vial under the column. Add 1 mL methanol (100 %) into the dry syringe and let it pass through under gravity. In case the methanol should not pass through immediately, push the first drop through the column using the pump unit. Do not elute in less than 1 minute!
9. Push some air through the column to elute the last drop of methanol.

9. PERFORMANCE

Capacity

The capacity of the **Aflatoxin Immunoaffinity Column** was determined to be >200 ng. Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ and M₁ is bound by the specific antibody onto the column.

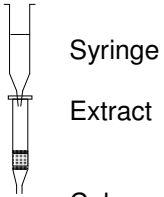
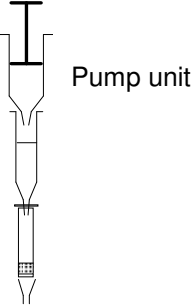
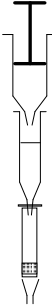
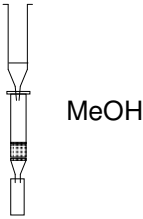

Recovery

The recovery of spiked samples was determined to be 97 %.

10. REFERENCES

1. Reiß, J. (ed.): Mykotoxine in Lebensmitteln; Gustav Fischer Verlag, 1981.
2. Heathcote, J.G. und Hibbert, J.R.(eds): Aflatoxins: Chemical and biological aspects; Elsevier, Amsterdam, 1978.
3. Betina, V. (ed): Aflatoxins, sterigmatocystin and versicolorin; In: Mycotoxins, Band 9, 1. Auflage, Elsevier, Amsterdam, 1989.
4. Teuscher, E. und Lindequist, U. (eds): Biogene Gifte - Biologie, Chemie, Pharmakologie; 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 1994.

11. WORKING SCHEME FOR ABSORPTION AND ELUTION

A	B	C	D	E
 <p>Syringe Extract Column</p>	 <p>Pump unit</p>		 <p>MeOH</p>	
Absorption of sample under gravity	Washing step 10 mL dist. Water	Removing of unbound water by passing air through IAC	Elution of Aflatoxin with 1 mL MeOH under gravity	ELISA or HPLC Analysis

1. ALLGEMEINES

Aflatoxine gehören zur Klasse der Mykotoxine. Von den ungefähr 20 bekannten Aflatoxinen werden ausschließlich B₁, B₂, G₁ und G₂ von den Schimmelpilzen *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus* produziert, während es sich bei allen anderen Aflatoxinen um Derivate dieser vier handelt. Die Derivate entstehen entweder durch Metabolisierung von Mensch, Tier und Mikroorganismen oder durch umweltbedingte Reaktionen.

Aflatoxine gehören zu den stärksten Mykotoxinen, wobei sie in erster Linie hepatotoxisch und karzinogen wirken. Die vier Hauptaflatoxine weisen unterschiedliche Toxizität auf. B₁ ist das zweifellos giftigste Aflatoxin, gefolgt von G₁, B₂ und G₂. Aflatoxin B₁ wirkt nicht direkt toxisch. In den Biotransformationsprozessen der Leber wird das lipophile Toxin epoxidiert und in ein aktives Derivat überführt, das Aflatoxin B₁-2,3-Epoxid. Dieses hochreaktive Epoxid ist in der Lage, mit nukleophilen Bereichen von Makromolekülen zu reagieren.

Zu den Intoxikationen, die durch Aflatoxine hervorgerufen werden, gehören chronische und akute Vergiftungserscheinungen. Über akute Vergiftungserscheinungen, die durch die Aufnahme von Mykotoxinen hervorgerufen werden, gibt es wenig gesicherte Berichte. Von besonderer Bedeutung für den Menschen sind chronische Vergiftungserscheinungen durch Aflatoxine. Zu den Erkrankungen, die durch solche chronischen Vergiftungen entstehen, gehören der primäre Leberkrebs, Hepatitis, das Reye's Syndrom und das Kwashiorkor. Neben der Entstehung von primärem Leberkrebs sind Aflatoxine vermutlich an der Entstehung anderer Krebsformen, wie dem Dünndarmkrebs beteiligt.

Von Kontaminationen mit Aflatoxinen sind besonders Nüsse und Getreide betroffen. Der Befall dieser Produkte mit Schimmelpilzen erfolgt meist vor der Ernte, so daß sie unter geeigneten Umwelt-/Lagerungsbedingungen Toxine produzieren und die Lebensmittel vergiften. Dementsprechend gelangen auch Aflatoxine in den meisten Fällen über die Nahrung in den menschlichen Körper. Aflatoxine sind hitzestabil und werden beim Kochen nur teilweise zerstört.

Um den Menschen durch aflatoxinbedingte Krankheiten zu schützen, bedarf es neben entsprechenden Hygienemaßnahmen, die die Bildung von Aflatoxinen vermeiden helfen, einer quantitativen und qualitativen Kontrolle gefährdeter Lebensmittel.

2. PRINZIP

Die Immunoaffinitätssäule kann spezifisch Aflatoxine aus diversen Probenmaterialien isolieren. Sie besteht aus polyklonalen Anti-Aflatoxin-Antikörpern, die kovalent auf einer derivatisierten Agarosematrix gebunden sind. Die Antikörper sind spezifisch für Aflatoxin. Auf der Säule gebundene Aflatoxine werden mittels Denaturierung der Antikörper-Aflatoxin Bindung durch Methanol eluiert und in reiner Form erhalten.

3. VORSICHTSMAßNAHMEN

Die volle Übereinstimmung mit den folgenden Regeln für eine gute Laborpraxis (GLP) wird zu vertrauenswürdigen Ergebnissen führen:

1. Vor der Testdurchführung müssen die Immunoaffinitätssäulen sowie alle einzusetzenden Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (20°C-25°C).
2. Wenn mit der Aufreinigung einmal begonnen ist, sollten alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung vollzogen werden.
3. Für jede Probe muss eine separate Einmal-Pipettenspitze verwendet werden, um eine Verschleppung bzw. Kreuzkontamination zu vermeiden.
4. Komponenten von verschiedenen Chargen dürfen nicht verwendet oder gemischt werden.
5. Reagenzien dürfen nach der Verfallszeit nicht benutzt werden.
6. Es sollten ständig die Präzision und die Richtigkeit für die Laborgeräte kontrolliert werden, die man für das Testverfahren benutzt.

4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.
3. Aflatoxine sind sehr giftige Substanzen. Sie können Krebs oder irreversible Schäden in der genetischen Substanz hervorrufen. Aflatoxine sind toxisch beim Einatmen, Verschlucken oder bei Hautkontakt. Geeignete Sicherheitskleidung ist zu tragen !!

5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND GERÄTE

Geräte:

- 1000 µl-Mikropipette
- Klemmvorrichtung
- Auffanggefäße
- Glaszylinder
- Spritze (20 ml)
- Gummistopfen
- Zentrifuge/Filterpapier

Reagenzien:

- Methanol
- bidestilliertes Wasser

6. PROBENVORBEREITUNG

Als Probenvorbereitung für die Extraktion von Aflatoxinen aus Lebensmitteln eignen sich alle gebräuchlichen Methoden, die auf methanolischen oder acetonhaltigen Extraktionsmedien beruhen. Ebenso können Extraktionen mit Chloroform o.ä. Lösungsmitteln durchgeführt werden. Solche Lösungsmittel müssen allerdings in den folgenden Schritten eingedampft und die Rückstände in Methanol oder Aceton wieder aufgenommen werden.

Bei dem Probenauftrag ist allerdings darauf zu achten, dass die Extraktionslösung, die auf die Säule aufgetragen wird, nicht mehr als 10 % Methanol oder 5 % Aceton enthält. Gegebenenfalls muss die Extraktionslösung mit bidestilliertem Wasser verdünnt werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

1. Für jede zu untersuchende Probe wird eine neue Immunoaffinitätssäule verwendet.
2. Der obere farbige Säulenverschluss wird von der Säule entfernt, die Spitze abgeschnitten und wieder auf die Säule gesteckt.
3. Die Immunoaffinitätssäule wird mit dem Glasspritzenzylinder verbunden, in eine entsprechende Vorrichtung gespannt und ein Auffanggefäß unter die Säule gestellt.
4. Die Probe wird in den Glasspritzenzylinder gefüllt. Das einzusetzende Volumen richtet sich nach dem gewünschten Anreicherungsgrad. Anschließend wird die untere Verschlusskappe der Säule entfernt.
5. Die Probe wird ohne zusätzliches Drücken die Säule durchlaufen.
6. Nach dem Probenauftrag wird die Säule mit 10 ml bidestilliertem Wasser gespült. Dafür wird das Wasser in den Glasspritzenzylinder gefüllt und die aufgezoogene Spritze über den Gummistopfen mit dem Glasspritzenzylinder verbunden. Das Wasser wird mit der Spritze langsam durch die Säule gedrückt. Anschließend wird die Säule mit einem Spritzenvolumen trocken geblasen.
7. Für die Elution wird ein neues sauberes Auffanggefäß unter die Säule gestellt. 1 ml Methanol wird auf die Säule gegeben und wiederum ohne mechanische Hilfe eluiert. Durch das Trocknen der Säule im vorangegangenen Schritt ist es möglich, daß das Methanol nicht in das Säulenbett einsickern kann. In diesem Fall empfiehlt es sich, mit Hilfe der Spritze einen leichten Druck auszuüben, bis der erste Tropfen am Säulenausgang erscheint. Wenn das Methanol die Säule passiert hat, wird die Säule mit 1 ml bidest. Wasser nachgespült. Das Wasser wird mit Hilfe der Spritze durch die Säule gedrückt.







8. SÄULENKAPAZITÄT

Die Säulenkapazität wurde mit >200 ng Aflatoxin bestimmt.

9. LITERATUR

1. Reiß, J. (ed.): Mykotoxine in Lebensmitteln. Gustav Fischer Verlag, 1981.
2. Heathcote, J.G. und Hibbert, J.R.(eds): Aflatoxins: Chemical and biological aspects. Elsevier, Amsterdam, 1978.
3. Betina, V. (ed): Aflatoxins, sterigmatocystin and versicolorin. In: Mycotoxins, Band 9, 1. Auflage, Elsevier, Amsterdam, 1989.
4. Eusecher, E. und Lindequist, U. (eds): Biogene Gifte - Biologie, Chemie, Pharmakologie. 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 1994.
5. Nendza, R.: Chromatographische Methoden zur Protein-Reinigung. Bioforum 16, 426 - 432 (1993).
6. Livingston, D.M.: Immunoaffinity chromatography of proteins. Methods in enzymology, 34, 723 - 731 (1974)

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità