

Gebrauchsanweisung

Microbial Transglutaminase (MTG) ELISA

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Mikrobieller Transglutaminase (MTG)

Art.-Nr. E021

Für Forschungs & Entwicklungszwecke

Revision Number: 2.1

Release Date: 2024-06-17



Zedira GmbH
Tel.: + 49 6151 66628-0

Roesslerstrasse 83
www.zedira.com

D-64293 Darmstadt
contact@zedira.com

Inhaltsverzeichnis

1.	Allgemeines	Seite 3
2.	Testprinzip	Seite 3
3.	Packungsinhalt	Seite 4
4.	Zusätzlich benötigte Geräte und Reagenzien	Seite 4
5.	Vorsichtsmaßnahmen	Seite 4
6.	Reagenzien und ihre Lagerung	Seite 5
7.	Probenvorbereitung	Seite 5
8.	Testdurchführung	Seite 6
8.1	Vorbereitung	Seite 6
8.2	Durchführung	Seite 7
9.	Auswertung	Seite 8
9.1	Musterkalibrierkurve	Seite 8
10.	Gewährleistung	Seite 9
11.	Zusammenfassung der Testdurchführung	Seite 10

1. Allgemeines

Mikrobielle Transglutaminase katalysiert Acyl-Transfer-Reaktionen zwischen der γ -Carboxyamid-Gruppe eines proteingebundenen Glutamin-Restes und primären Aminen. Vereinfacht ausgedrückt fungiert Mikrobielle Transglutaminase als biologischer Kleber, der Proteine kovalent verknüpft. Industrielle Anwendungsgebiete der mikrobiellen Transglutaminase finden sich in der Lebensmittelindustrie zur Herstellung von Molkereiprodukten, Fleisch-, Wurst- und Backwaren.

Der Microbial Transglutaminase (MTG) ELISA (Art. Nr. E021) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay, der zur quantitativen Bestimmung von nativer MTG entwickelt wurde. Im Rahmen der Testentwicklung wurden folgende Lebensmittel untersucht: Klebefleisch (roh), Joghurt, Quark, Käse, Salami und Brot. Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind abhängig von der jeweiligen Probenmatrix, dem Grad der Prozessierung und dem Extraktionsverfahren.

Es wird darauf hingewiesen, dass für jede Art von Probenmaterial die Vorbereitung gesondert vom Anwender abgestimmt werden muss.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays sind im Testkit enthalten. Ein Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	homogenisieren, extrahieren
Standardmaterial:	mikrobielle Transglutaminase (0 – 150 ng/mL)
Nachweisgrenze:	0,6 ng/mL (ppb) MTG (1 mL $\triangleq$ 1 g)
Bestimmungsgrenze:	3,0 ng/mL (ppb) MTG (1 mL $\triangleq$ 1 g)

2. Testprinzip

Grundlage des Testkits ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen (Kavitäten) sind mit spezifischen Antikörpern gegen Mikrobielle Transglutaminase (Fängerantikörper) beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe bindet vorhandene mikrobielle Transglutaminase an die spezifischen Fängerantikörper und es kommt ein Antikörper-Antigen-Komplex zustande. Nicht gebundene Anteile werden in einem Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des Biotin-gekoppelten Antikörpers, der wiederum die mikrobielle Transglutaminase erkennt. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Biotin-Komplex (Sandwich). Nichtgebundenes Antikörperkonjugat wird in einem Waschschrift entfernt. Durch die Biotinfunktion wird Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin an das Sandwich konjugiert, sodass, nach einem weiteren Waschschrift der Nachweis durch Zugabe von Substrat erfolgt. Das an den Komplex gebundene Enzym wandelt das farblose Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion ist proportional zu der Mikrobiellen Transglutaminase-Konzentration in der Probe.

3. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen).

Jeder Kit enthält:

- 1x Mikrotiterplatte (*Coated plate*) mit 96 Kavitäten (12 Streifen à 8 Einzelkavitäten) beschichtet mit anti-mikrobieller-Transglutaminase-Antikörper.
- 1x Mikrobielle Transglutaminase Standard (*MTG-standard*) ausreichend für die Herstellung von sieben Standards (5 – 150 ng/mL).
- 1x Probenpuffer (*Sample buffer, 100 mL*), gebrauchsfertig, orange gefärbt. Enthält TBS, BSA, Tween und Natriumazid.
- 1x Waschpuffer (*Wash buffer, 100 mL*), 10-fach Konzentrat, blau gefärbt. Enthält TBS, Tween und Bronidox.
- 1x MTG-Antikörper-Konjugat (*MTG-Ab conjugate, 12 mL*), gebrauchsfertig, grün gefärbt. Enthält Bronidox und Methylisothiazolone
- 1x Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat, (*Streptavidin-HRP conjugate, 12 mL*), gebrauchsfertig, grün gefärbt. Enthält Bronidox und Methylisothiazolone.
- 1x Substrat (*Substrate solution, 14 mL*), gebrauchsfertig, farblos.
- 1x Stopp-Reagenz (*Stop solution, 14 mL*), gebrauchsfertig, farblos.
Achtung: enthält 0,2 M Schwefelsäure.
- 1x Gebrauchsanweisung

4. Zusätzlich benötigte Geräte und Reagenzien

- Zentrifuge und zentrifugierbare Reagenzgefäße.
- Geräte zur Homogenisation der Probe z.B. Ultra-Turrax®, Mörser, Mixer.
- Rührer und Schüttler.
- Destilliertes, deionisiertes oder vollentsalztes Wasser.
- Messzylinder, 1 Liter.
- Messpipetten, 10 – 100 – 1000 µL.
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit Filter, Wellenlänge 450 nm (empfohlene Referenzwellenlänge 620 nm).
- Automatischer Dispenser für 100 µL, empfohlen.
- ELISA Auswertesoftware, empfohlen.

5. Vorsichtsmaßnahmen

Die *Stop solution* enthält 0,2 M Schwefelsäure (H290/H314, P302+P352/P305+P351+P338). Puffer enthalten Bronidox (H302/H314; P260/P280/P301+P312+P330/P303+P361+P353/P304+P340+P310/P305+P351+P338) und Methylisothiazolone (H301/H311/H330/H314/H317/H410). *Sample buffer* und *MTG-standard* enthalten zur Konservierung Natriumazid.

6. Reagenzien und ihre Lagerung

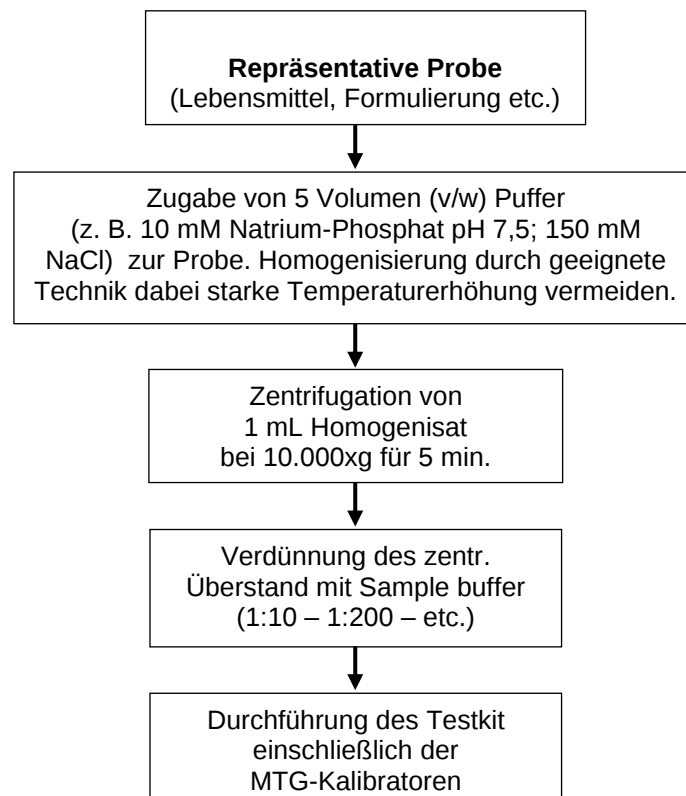
Den gesamten Testkit bei 6 - 8°C lagern. Komponenten des Testkit auf keinen Fall einfrieren. Es ist wichtig, dass der *MTG-Standard* nicht unter 6°C gelagert wird. Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 6-8°C lagern. Die farblose *Substrate solution* ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden. Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden. Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

7. Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung von Proben werden normale Labortechniken verwendet. Eine gründliche Homogenisierung der eingesetzten Proben ist wichtig, dabei sollte eine zu starke Erwärmung der Probe vermieden werden. Proben von Jogurt oder Quark sollten gut durchmischt sein. Wurst, Fleisch oder feste Materialien müssen gut homogenisiert sein z. B. durch Verwendung eines Mixers. Bei Lebensmittelproben können Störeffekte aufgrund des Probenhintergrundes das Testkit Signal beeinflussen. Daher sollten Verdünnungen über einen breiten Bereich analysiert werden (1:10 – 1:200 – etc.).

Das folgende Flusschema beschreibt exemplarisch die Probenvorbereitung zum Nachweis von mikrobieller Transglutaminase.

Es wird darauf hingewiesen, dass für jede Art von Probenmaterial die Vorbereitung vom Anwender gesondert abgestimmt werden muss. Das Schema kann als Orientierungshilfe herangezogen werden.



8. Testdurchführung

8.1 Vorbereitung

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 – 25°C) bringen.

Der **Wash buffer** liegt als 10-fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit vollentsalztem Wasser verdünnt werden (z.B. 100 mL **Wash buffer** + 900 mL vollentsalztem Wasser). Der verdünnte Waschpuffer hat eine Haltbarkeit von vier Wochen bei 6 - 8°C.

Herstellung der MTG-Kalibratoren

- Dem Reaktionsgefäß **MTG-Standard** werden **635 µL Sample buffer** zugegeben.
- Das Reaktionsgefäß wird kurz zentrifugiert (z.B. 5000xg, 10 sec) und durchmischt.
- In einem zweiten Reaktionsgefäß werden **820 µL Sample buffer** vorgelegt und **10 µL** der zuvor hergestellten **MTG-Standard** Verdünnung zugegeben.
- Diese zweite Verdünnung wird **MTG-standard (II)** genannt und für die weiteren Verdünnungen zur Herstellung der MTG-Kalibratoren verwendet.

Für die Herstellung der MTG-Kalibratoren das vorliegende Schema beachten.

Kalibrator Nr.	Konzentration	Volumen (entnommen von ...)	Sample buffer
1	150 ng/mL	50 µL MTG-standard (II)	350 µL
2	100 ng/mL	50 µL MTG-standard (II)	550 µL
3	75 ng/mL	50 µL MTG-standard (II)	750 µL
4	50 ng/mL	40 µL MTG-standard (II)	920 µL
5	25 ng/mL	20 µL MTG-standard (II)	940 µL
6	10 ng/mL	100 µL Kalibrator Nr. 2	900 µL
7	5 ng/mL	50 µL Kalibrator Nr. 2	950 µL
8	0 ng/mL (neg. Kontrolle)	-	500 µL

8.2 Durchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten ist zu vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben benötigt werden. Die Position der Standards und Proben protokollieren.
2. Die Kavitäten mit 350 µL verdünntem Waschpuffer befüllen und nach 10 Sekunden den Waschpuffer durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen.
3. Je 100 µL der MTG-Kalibratoren bzw. der vorbereiteten Proben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 30 min bei Raumtemperatur (20 – 25°C) inkubieren.
4. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 350 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Diesen Vorgang dreimal wiederholen (insg. 4 mal 350 µL).
5. Danach je 100 µL *MTG-Ab conjugate* (ready-to-use) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und weitere 30 min bei Raumtemperatur (20 – 25°C) inkubieren.
6. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 350 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Diesen Vorgang dreimal wiederholen (insg. 4 mal 350 µL).
7. Danach je 100 µL *Streptavidin-HRP conjugate* (ready-to-use) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und weitere 30 min bei Raumtemperatur (20 – 25°C) inkubieren.
8. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 350 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Diesen Vorgang dreimal wiederholen (insg. 4 mal 350 µL).
9. Je 100 µL *Substrate solution* in die Kavitäten pipettieren und 30 min bei Raumtemperatur (20 – 25°C) inkubieren.
10. Je 100 µL *Stop solution* in jede Kavität pipettieren
(**Vorsicht:** 0,2 M Schwefelsäure!)
Die Extinktion sofort bei 450 nm, spätestens innerhalb von 30 min nach Zugabe der *Stop solution*, messen. Es wird empfohlen den Plattenhintergrund durch eine Messung bei 620 nm aufzunehmen und vom Messwert bei 450 nm abzuziehen.

9. Auswertung

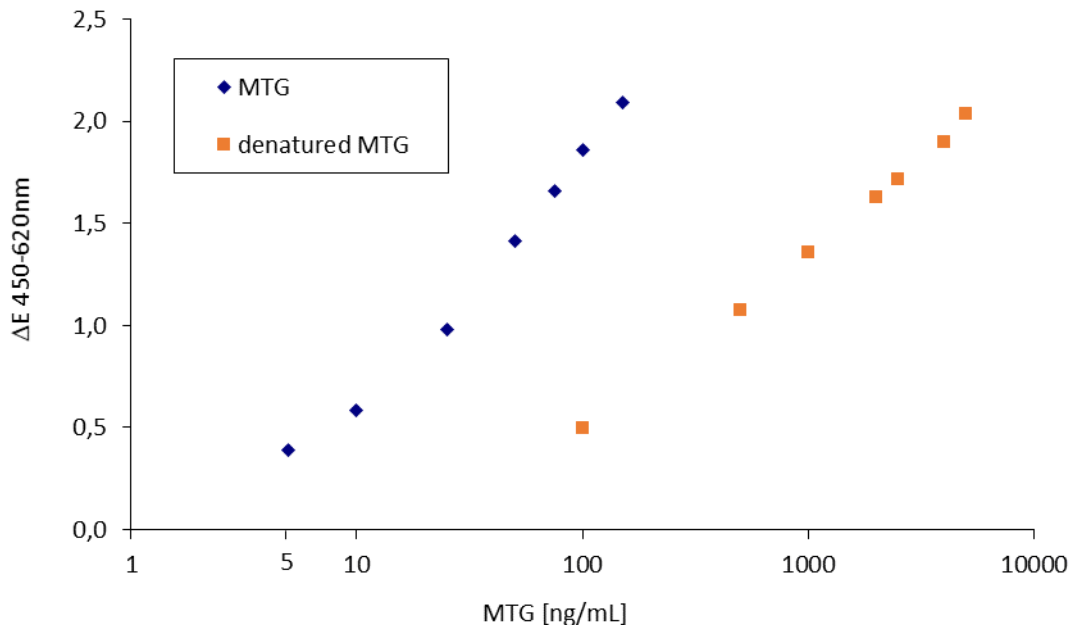
Zur Auswertung des Tests empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen. Alternativ kann auch von Hand eine Punkt-zu-Punkt-Kurve erstellt werden.

Information:

Dieser ELISA hat das Ziel mikrobielle Transglutaminase (MTG) mit Hilfe von spezifischen Antikörpern zu quantifizieren. Neben dem nativen Enzym wird auch die denaturierte Proteinform der mikrobiellen Transglutaminase von den Antikörpern erkannt. Die Sensitivität des Testkit gegenüber der denaturierten Transglutaminase ist etwa um den Faktor 20 geringer (siehe Graphik 9.1).

9.1 Musterkalibrierkurve

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des Testkits verwendet werden.



10. Gewährleistung

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über den *Microbial Transglutaminase (MTG) ELISA (Art. Nr. E021)* und dessen Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften des *Microbial Transglutaminase (MTG) ELISA* oder dessen Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. Die Zedira GmbH übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Für darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung des *Microbial Transglutaminase (MTG) ELISA* haftet Zedira nicht.

11. Zusammenfassung der Testdurchführung

- a. Proben und Kalibratoren mit *Sample buffer* verdünnen und mischen.
- b. *Wash buffer* 10-fach Konzentrat mit vollentsalztem Wasser verdünnen.
- c. Benötigte Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, mit 350 µL verdünntem Waschpuffer einmal die Oberfläche benetzen und sorgfältig ausklopfen.
- d. Verteile 100 µL Proben- bzw. Kalibratorverdünnung auf die Kavitäten. Doppelbestimmungen werden empfohlen.
- e. Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur (20 – 25°C)
- f. Jede Kavität mit 350 µL verdünntem Waschpuffer 4x waschen und sorgfältig ausklopfen.
- g. Verteile 100 µL *MTG-Ab conjugate* in jede verwendete Kavität.
- h. Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur (20 – 25°C).
- i. Jede Kavität mit 350 µL verdünntem Waschpuffer 4x waschen und sorgfältig ausklopfen.
- j. Verteile 100 µL *Streptavidin-HRP conjugate* in jede verwendete Kavität.
- k. Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur (20 – 25°C).
- l. Jede Kavität mit 350 µL verdünntem Waschpuffer 4x waschen und sorgfältig ausklopfen.
- m. Verteile 100 µL *Substrate solution* in jede verwendete Kavität.
- n. Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur (20 – 25°C).
- o. Die Farbreaktion wird durch Zugabe von 100 µL *Stop solution* beendet.
- p. Die Extinktion sofort bei 450 nm, spätestens innerhalb von 30 min nach Zugabe der *Stop solution*, messen. (Empfehlung: 620 nm abziehen)

Quantitative Bestimmung:

Mit Hilfe der Kalibratoren wird eine Standardkurve aufgenommen. Diese dient der Umrechnung von Absorptionswerten der Probenverdünnungen in die zugehörige Angabe einer Konzentration.

Lagerung von übrigen Reagenzien bei 6 – 8°C, falls diese wiederverwendet werden sollen.