



OKATEST

ZE/OA48C

ZE/OA96C

Test for detection of Okadaic Acid-toxins group

**Test para la detección de las toxinas del grupo
del Ácido Okadaico**

ZEU-INMUNOTEC, S.L.

Pol. Plaza. C/ Bari, 25 dpdo. • 50197 Zaragoza (SPAIN)

Tel.: +34 976 731 533 • Fax: +34 976 524 078

info@zeulab.com • www.zeulab.com

SCOPE

This protocol specifies a method for the quantitative determination of Okadaic Acid (OA) and other carboxylic toxins of the OA group including DTX1, DTX2 and DTX3 by a colorimetric phosphatase inhibition assay. This method is applicable to shellfish species such as mussels, clams, oysters and scallops.

PRINCIPLE

Test based on the phosphatase activity inhibition by OA-toxins group, responsible for diarrhetic shellfish poisoning (DSP).

Phosphatase enzyme PP2A is able to hydrolyse a specific substrate, yielding a product that can be detected at 405 nm. Samples containing toxins from the okadaic acid group will inhibit the enzyme activity proportionally to the amount of toxin contained in the sample. The concentration of toxin in the sample can be calculated using a standard curve.

KIT CONTENTS

	48 Tests Kit	96 Tests Kit
Microtiter plate strips (8 wells per strip)	6	12
Vials of Phosphatase (Phosphatase)	2	4
Set of Okadaic Acid Standards (Okadaic acid 0.5, 0.8, 1.2, 1.8 and 2.8 nM)	1	1
Chromogenic Substrate (Chromogenic Substrate)	1	1
Phosphatase Dilution Buffer (Phosphatase Dilution Buffer)	1	1
Stock Buffer Solution (Stock Buffer Solution)	1	1
Stop Solution (Stop Solution)	1	1
Adhesive film	1	2
Kit instructions	1	1

ADDITIONAL MATERIAL AND REAGENTS NEEDED

- Micropipettes
- Blender (Ultraturax) or mortar and pestle
- Heater at $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (i.e. FX Incubator, Ref ZE/FX, from ZEU-INMUNOTEC)
- Microplate reader (wavelength at 405 nm)
- Water bath for $76 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Methanol (analytical grade)
- NaOH 2.5 N made by titration, (NaOH of analytical grade)
- HCl 2.5 N made by titration, (HCl of analytical grade)
- Deionised water (grade 2, ISO3696)
- Graded 50 mL centrifuge tubes with screw caps
- Tube shaker

SOLUTIONS

- 1.- **Okadaic Acid Standards:** to make sure these solutions are homogeneous, it is very important to mix well using a vortex, before applying to the plate.
- 2.- **Chromogenic Substrate solution:** The solution contains stabilization resin. Make sure this resin is not added to the microwells. To assure that, it is recommended to transfer the volume needed into a transparent labware (i.e.: test tube or eppendorf) and take the solution from that container to add into the wells. *Note:* Do not use this solution if the absorbance of 90 μ L of this solution at 405 nm is over 0.6.
- 3.- **Phosphatase solution:** Add 2.0 mL of phosphatase dilution buffer (**Phosphatase Dilution Buffer**) to one of the phosphatase vials (**Phosphatase**) and dissolve by mixing gently for 1 hour $\pm$ 5 minutes at room temperature (22 ± 2 °C) to ensure that the enzyme is fully hydrated. **Do not use the tube shaker at any moment.** This solution must be stored under refrigeration if not in use immediately after preparation. Do not use the phosphatase solution for following days. Each enzyme vial contains enough volume for 24 wells. If more than one vial is used in the assay, dissolve each vial as described above, make a pool with the content of the vials and mix gently, by inversion, before use.
***Attention:** this reagent is blue and becomes brownish when dissolved. If brownish colour is noticed before hydration, discard this reagent as it could be damaged.
- 4.- **Buffer solution x1:** dilute the **Stock Buffer Solution** included in the kit by mixing 1 volume with 9 volumes of deionised water. Use buffer solution x1 only freshly made, and store under refrigeration if not in use immediately after preparation.
- 5.- **2.5 N NaOH:** weigh 100 g of NaOH and add 500 mL of water and dissolve. Transfer to a volumetric flask and add deionised water up to a final volume of 1000 mL.
- 6.- **2.5 N HCl:** add 205 mL of HCl (37 %) to 400 mL of deionised water already contained in a volumetric flask. Make the volume up to 1000 mL with deionised water.

SAMPLES EXTRACTION

The method described below includes a hydrolysis step to detect all toxins forms of okadaic acid (okadaic acid and dinophisistoxins).

- 1.- Clean the shell thoroughly using water
- 2.- Open the shellfish by cutting the adductor muscles.
- 3.- Wash inside the shell thoroughly to get rid of any dirt.
- 4.- Remove the tissue inside the shell by cutting all the muscles attached to the shell.
- 5.- Place the shellfish tissue in a filter paper for few minutes to remove water in excess.

It is recommended to use graded 50 mL centrifuge tubes with screw caps during the following steps of hydrolysis in order to prevent losses due to labware changes.

- 6.- Mash the shellfish tissue to obtain a representative sample and weigh 5 g. Add 25 mL of Methanol and homogenise the mixture for 2 minutes using a tube shaker.
- 7.- Centrifuge at 2000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant (*methanolic extract*) is poured into a centrifuge tube.
- 8.- Take 640 μ L of *methanolic extract* and pour into another centrifuge tube.
- 9.- Add 100 μ L of 2.5 N NaOH.
- 10.- Seal and heat at 76 ± 2 °C for 40 minutes.

- 11.- Add 80 μ L of 2.5 N HCl (the sample does not need to be cooled down previously).
- 12.- Add up to 20 mL of **Buffer solution x1**.

TEST PROCEDURE

Warning:

The volume of some reagents used in this assay is small and special attention must be paid when added to the wells:

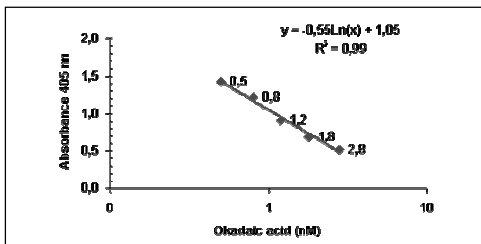
- Make sure the pipettes are calibrated before running the assay.
- Use pipettes according to the volumes to be dispensed. Use pipettes with a maximum pipette volume of 100 or 200 μ L.
- Be sure that the incubator's temperature is stabilized before use.

It is recommended to run samples and standards in duplicate.

- 1.- Add 50 μ L of samples or standards.
- 2.- Add 70 μ L of the Phosphatase Solution to each well. Mix well by gentle tapping on the side of the plate.
- 3.- Cover the plate with the adhesive film provided and incubate for 20 ± 0.5 minutes at 30 ± 2 °C.
- 4.- Remove the adhesive film and add 90 μ L of Chromogenic Substrate to each well. Mix well by gently tapping on the side of the plate.
- 5.- Cover the plate with the adhesive film and incubate 30 ± 0.5 minutes at 30 ± 2 °C.
- 6.- Remove the adhesive film and add 70 μ L of Stop Solution to each well.
- 7.- Read absorbance of samples and standards at 405 nm.

GRAPHIC REPRESENTATION AND CALCULATIONS OF RESULTS

- 1.- Obtain a standard curve by plotting the absorbance values in a linear *y axis* and the concentration of okadaic acid in a logarithmic *x axis* and use a logarithmic fitting as shown in the graphic next page. R^2 has to be greater than or equal to 0.96.



- 2.- The OA concentration contained in the sample (C_s) is calculated by interpolation into the calibration curve or using the following equation:

$$x = \text{EXP}(y - b/a)$$

Where x is the OA concentration in the sample (C_s) and y the absorbance of the sample.

Note: An Excel worksheet to calculate results is available upon request.

- 3.- Calculate the diarrhetic shellfish toxins concentration in tissue (C_t) as follows:

$$C_t (\mu\text{g/kg}) = \frac{(C_s (\text{nM}) \times \text{FD} \times \text{MW} (\text{g/mol}) \times V_e (\text{L}))}{M_t (\text{g})}$$

C_t: toxins concentration in tissue, expressed as equivalents of OA; **C_s:** toxins concentration in sample; **FD:** Methanolic extract dilution factor (i.e. 640 $\mu\text{L}/20 \text{ mL} \rightarrow \times 31.25$); **MW:** Okadaic acid molecular weight = 805; **V_e:** Methanolic extract volume (0.025L); **M_t:** Tissue weight (5g).

Example: for OA concentration of 1.5 nM: $1.5 \text{ nM} \times 31.25 \times 805 \text{ g/mol} \times 0.025 \text{ L} / 5 \text{ g} = 189 \text{ } \mu\text{g OA eq/kg}$.

For samples with OA concentration falling outside the working range ($< 0.5 \text{ nM}$ or $> 2.8 \text{ nM}$), results will be reported as $< 0.5 \text{ nM}$ (or $< 63 \text{ } \mu\text{g/Kg}$) or $> 2.8 \text{ nM}$ (or $> 352 \text{ } \mu\text{g/kg}$), respectively.

STABILITY AND STORAGE

The kit contents must be stored at $4 - 12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and protected from light. This kit has a shelf life of 4 - 6 months when stored under optimal conditions. See the expiry date on the kit package.

SAFETY

Safety clothing should be worn and skin contact with the reagents avoided. Do not ingest. A SAFETY DATA SHEET is available from your local distributor on request.

***Warning:** Okadaic Acid is toxic. Gloves, mask and other protective clothing must be worn when handling okadaic acid solutions.

REFERENCES

1. A Fluorescent Microplate Assay for Diarrheic Shellfish Toxins. Vieytes M. R. et al. Analytical Biochemistry 248, 258-264 (1997).
2. Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels. Mounfort D. O. et al. Toxicon 39, 383-390 (2001).
3. Inter-laboratory validation of the fluorescent protein phosphatase inhibition assay to determine diarrheic shellfish toxins: intercomparison with liquid chromatography and mouse bioassay. Gonzalez J. C., et al. Analytica Chimica Acta 466, 233-246 (2002).

OBJETIVO

Test para la determinación cuantitativa de Ácido Okadaico (OA) y otras toxinas del grupo del OA, incluyendo DTX1, DTX2 and DTX3. Consiste en un ensayo colorimétrico de inhibición de la actividad enzimática de una fosfatasa. Este método es aplicable a especies como mejillones, almejas, ostras y vieiras.

PRINCIPIO

Okatest es un test basado en la inhibición de la actividad enzimática de una fosfatasa (PP2A) por toxinas del grupo del ácido okadaico. En condiciones normales, la fosfatasa es capaz de hidrolizar un sustrato específico obteniéndose un producto que puede ser detectado a 405 nm. En presencia de toxina diarreica se producirá una inhibición de la actividad enzimática proporcional a la cantidad de toxina diarreica presente en la muestra. Mediante la utilización de una curva de calibrado se pueden obtener los valores de concentración de toxina presentes en la muestra analizada.

COMPONENTES DEL KIT

	Kit de 48 Tests	Kit de 96 Tests
Tiras de 8 pocillos de placa microtiter	6	12
Fosfatasa (Phosphatase)	2	4
Set de patrones de ácido okadaico (Okadaic acid 0.5, 0.8, 1.2, 1.8 y 2.8 nM)	1	1
Sustrato Cromogénico (Chromogenic Substrate)	1	1
Solución de Dilución de la Fosfatasa (Phosphatase Dilution Buffer)	1	1
Solución Tamponante (Stock Buffer Solution)	1	1
Solución Stop (Stop Solution)	1	1
Lámina adhesiva	1	2
Guión de instrucciones	1	1

MATERIAL Y REACTIVOS ADICIONALES NECESARIOS

- Micropipetas
- Homogeneizador (e.j. Ultraturax) o mortero
- Incubador a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. (Ej. FX Incubator Ref ZE/FX, de ZEÜ-INMUNOTEC)
- Lector de placas microtiter con filtro a 405 nm.
- Baño termostático $76 \pm 2^\circ\text{C}$
- Metanol (grado analítico)
- NaOH (grado analítico)
- HCl (grado analítico)
- Agua desionizada (al menos de grado 2, ISO 3696)
- Tubos de centrifuga de 50 mL
- Centrífuga
- Agitador para tubos (tipo vortex)

SOLUCIONES

- 1.- **Estándares de Ácido Okadaico:** Es muy importante agitar bien estas disoluciones justo antes de su utilización (p.e.: en vortex), para asegurar su homogeneidad
- 2.- **Sustrato Cromogénico:** esta solución contiene una resina estabilizante que no debe añadirse a los pocillos. Con este fin, se recomienda transvasar el volumen a utilizar a un vial transparente (p.e.: eppendorf o tubo de ensayo), asegurándose de no coger resina, y de ahí pipetear a los pocillos. *Nota:* no usar esta solución si la absorbancia de 90 μ L es superior a 0.6.
- 3.- **Preparación de la Fosfatasa:** reconstituir el liofilizado de Fosfatasa (**Phosphatase**) en 2.0 mL de Solución de Dilución de la Fosfatasa (**Phosphatase Dilution Buffer**). Mantener la solución a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y con agitación suave durante 1 hora para asegurar así la correcta hidratación del liofilizado. **No usar el agitador de tubos en ningún momento.** Una vez reconstituido el enzima, mantenerlo en condiciones de refrigeración. No conservar la solución de Fosfatasa para su uso en días posteriores. Cada vial de Fosfatasa contiene la cantidad necesaria para 24 pocillos. Si se va a utilizar más de uno, disolver cada vial como se ha explicado anteriormente y mezclar el contenido de todos en uno único antes de usar. Agitar suavemente antes de su utilización.
Atención: el liofilizado posee una coloración azulada y al reconstituirlo se convierte en marrón. Si observa que este reactivo posee una coloración marrón antes de reconstituirlo, no usarlo, ya que podría estar dañado.
- 4.- **Solución Tamponante x1:** diluir la **Stock Buffer Solution** incluida en el kit, mezclando 1 volumen de esta solución con 9 volúmenes de agua desionizada. Preparar sólo la que se vaya a utilizar en el momento y mantener en refrigeración hasta entonces.
- 5.- **NaOH 2.5 N:** pesar 100 g de NaOH y disolver en 500 mL de agua desionizada. Seguidamente, enrasar hasta un volumen final de 1000 mL usando un matraz aforado.
- 6.- **HCl 2.5 N:** Añadir 205 mL de HCl (37 %) a 400 mL de agua desionizada. Mezclar y enrasar hasta 1000 mL con agua desionizada usando un matraz aforado.

EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

El método de preparación de muestras que se describe a continuación incluye una etapa de hidrólisis que permite la detección de todas las formas tóxicas de ácido okadaico (ácido okadaico y dinofisistoxinas).

- 1.- Limpiar la superficie externa del molusco con agua.
- 2.- Abrir los moluscos seccionando los músculos aductores.
- 3.- Lavar el contenido de las conchas con agua hasta conseguir eliminar todas las sustancias extrañas que puedan contener.
- 4.- Separar la carne de las conchas, retirando todos los músculos o tejidos que estén en contacto con ellas.
- 5.- Colocarlos en un papel de filtro y dejarlos secar durante unos minutos.
Se recomienda el uso de tubos calibrados para centrifuga de 50 mL durante las siguientes etapas de hidrólisis para evitar pérdidas por transvase de líquidos.
- 6.- Triturar el tejido hasta obtener una muestra homogénea, tomar 5 g (peso húmedo) y extraer con 25 mL de Metanol durante 2 minutos, usando un agitador para tubos.
- 7.- Centrifugar el homogeneizado a 2000 g durante 10 minutos a 4 $^\circ\text{C}$. Al sobrenadante lo llamaremos *extracto metanólico* y lo pasaremos a otro tubo de centrifuga por decantación.

- 8.- Tomar 640 μL del *extracto metanólico* y transvasarlo a un tubo para centrifuga nuevo.
- 9.- Añadir 100 μL de NaOH 2.5 N.
- 10.- Cerrar y calentar la muestra a $76 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 40 minutos.
- 11.- Sin dejar enfriar, añadir 80 μL de HCl 2.5 N
- 12.- Añadir **Solución Tamponante x1** hasta un volumen final de 20 mL.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Atención:

En este ensayo se usan reactivos en volúmenes pequeños y se debe tener especial cuidado cuando se añaden a la placa:

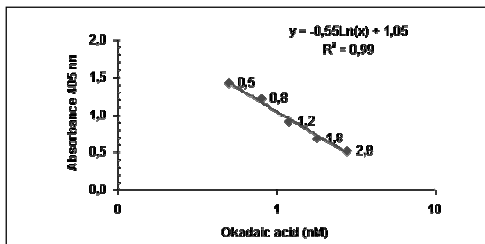
- Asegurarse de que las pipetas están calibradas antes de realizar el ensayo.
- Usar pipetas de 100 ó 200 μL de volumen máximo.
- Comprobar que la temperatura del incubador está estabilizada antes de su uso.

Es aconsejable aplicar las muestras y patrones por duplicado.

- 1.- Aplicar 50 μL de cada estándar o muestra.
- 2.- Aplicar en cada pocillo 70 μL de la Solución de Fosfatasa. Mezclar bien golpeando suavemente en el lateral de la placa.
- 3.- Tapar la placa con la lámina adhesiva incluida en el kit e incubar a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 20 ± 0.5 minutos.
- 4.- Aplicar 90 μL en cada pocillo de Sustrato Cromogénico y tapar la placa con la lámina adhesiva.
- 5.- Incubar a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 ± 0.5 minutos.
- 6.- Retirar la lámina adhesiva y añadir en cada pocillo 70 μL de Solución Stop.
- 7.- Leer la absorbancia a 405 nm en un lector de placas microtiter.

REPRESENTACIÓN Y CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- 1.- Obtener una curva de calibrado representando las absorbancias en el eje de ordenadas frente a las concentraciones de ácido okadaico en el eje de abscisas (este último en escala logarítmica). A continuación se muestra un ejemplo de curva patrón. R^2 deberá ser mayor o igual a 0.96.



- 2.- A partir de la curva de calibrado obtener los valores de ácido okadaico de las muestras (Cs) por interpolación o aplicando la ecuación correspondiente:

$$x = \text{EXP} (y - b/a)$$

x: concentración de ácido okadaico en la muestra

y: absorbancia de la muestra

*ZEU-INMUNOTEC puede proporcionar una plantilla Excel para calcular los resultados. Para más información contacte con nosotros.

- 3.- Calcular la concentración de toxinas diarreicas en el tejido (Ct) a partir de la siguiente fórmula:

$$Ct (\mu\text{g/kg}) = \frac{Cs (\text{nM}) \times FD \times PM (\text{g/mol}) \times Ve (\text{L})}{Mt (\text{g})}$$

Ct: Concentración de toxinas en tejido; **Cs:** Concentración de toxinas de cada muestra aplicada en el pocillo; **FD:** Factor de dilución del extracto metanólico en la preparación de la muestra (p.e. 640 $\mu\text{L}/20 \text{ mL} \rightarrow \times 31.25$); **PM:** Peso molecular ácido okadaico = 805; **Ve:** Volumen de extracto metanólico obtenido (0.025L); **Mt:** Masa de tejido pesada inicialmente (5 g).

Ej.: Para una muestra 1.5 nM de OA: $1.5 \text{ nM} \times 31.25 \times 805 \text{ g/mol} \times 0.025 \text{ L} / 5 \text{ g} = 189 \text{ } \mu\text{g eq OA/kg}$

NOTA: Aquellas muestras cuya concentración (Cs) esté fuera del rango de trabajo ($< 0.5 \text{ nM}$ ó $> 2.8 \text{ nM}$), los resultados se expresarán como $< 0.5 \text{ nM}$ (ó $< 63 \text{ } \mu\text{g/Kg}$) ó $> 2.8 \text{ nM}$ (ó $> 352 \text{ } \mu\text{g/kg}$) respectivamente.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Conservar los componentes del kit de 4 -12 °C y en oscuridad. El kit tiene una estabilidad de 4 - 6 meses en las condiciones de conservación anteriormente indicadas.

SEGURIDAD

Se recomienda seguir unas prácticas correctas de laboratorio, así como el empleo de ropa y material de seguridad adecuados para el desarrollo del test. Evitar el contacto directo con la piel. No ingerir.

*Atención: El ácido okadaico es un producto tóxico, para su manejo es imprescindible el uso de guantes y trabajar con precaución.

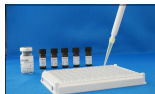
Puede solicitar la hoja de seguridad del producto contactando con su distribuidor habitual o fabricante.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- A Fluorescent Microplate Assay for Diarrheic Shellfish Toxins. Vieytes M. R. et al. Analytical Biochemistry 248, 258-264 (1997).
- 2.- Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels. Mounfort D. O. et al. Toxicon 39, 383-390 (2001).
- 3.- Inter-laboratory validation of the fluorescent protein phosphatase inhibition assay to determine diarrheic shellfish toxins: intercomparison with liquid chromatography and mouse bioassay. González J. C., et al. Analytica Chimica Acta 466, 233-246 (2002).

FLOWCHART PROCEDURE

ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO



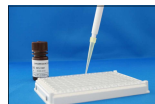
1. Add 50 μ L samples/standars
2. Add 70 μ L Phosphatase Solution

1. *Añadir 50 μ L muestras/estándares*
2. *Aplicar 70 μ L Solución de Fosfatasa*



3. Incubate 20 min at 30°C

3. *Incubar 20 min a 30°C*



4. Add 90 μ L Cromogenic Substrate

4. *Añadir 90 μ L Sustrato Cromogénico*



5. Incubate 30 min at 30°C

5. *Incubar 30 min a 30°C*



6. Add 70 μ L Stop Solution

6. *Añadir 70 μ L Solución Stop*



7. Read absorbance at 405 nm

7. *Leer absorbancia a 405 nm*

