

Traducere manual de utilizare Metronidazole ELISA Test Kit (Miere)

Nr. catalog LSY-10048

1. Principiul

Acest kit de testare se bazează pe imunotestul enzimatic competitiv pentru detectarea Metronidazolului în probă. Antigenii de cuplare sunt pre-acoperiti pe godeurile micro-placilor. Metronidazolul din probă și antigenii de cuplare pre-acoperiți pe pe godeurile micro-placilor concurează pentru anticorpii anti-Metronidazole. După adăugarea conjugatului enzimatic, substratul TMB se adaugă pentru colorare. Valoarea densității optice (DO) a eșantionului are o corelație negativă cu metronidazolul din acesta. Această valoare este comparată cu curba standard și se obține ulterior concentrația de metronidazol.

2. Specificații tehnice

Sensibilitate: 0.05ppb

Limita de detecție

Miere: aproximativ 0.1ppb

Notă: ppb= ng/ml sau ng/g

Rata de reacție încrucișată

Metronidazole.....	100%
Ornidazole	83%
Secnidazole.....	110%
Metronidazole-OH.....	<1%
Tinidazole	<1%
Dimetridazole	<1%

Rata de recuperare: 90±30%

Coeficientul de variație pentru aceeași placă: <5%

Coeficientul de variație pentru diferite plăci: < 10%

3. Componente

- 1) Stripuri cu micro godeuri: 12 stripuri cu 8 godeuri detașabile fiecare
- 2) 6 × soluție standard (1mL fiecare): 0ppb, 0.05ppb, 0.15ppb, 0.45ppb, 1.35ppb și 4.05ppb
- 3) Conjugat enzimatic (12 ml) 1 sticlă
- 4) Soluție de lucru pentru anticorpi (7mL) 1 sticlă
- 5) Substrat soluție A (7 ml) 1 sticlă
- 6) Substrat soluție B (7 ml) 1 sticlă
- 7) Soluție de oprire (7 ml) 1 sticlă
- 8) Tampon de spălare concentrat de 20× (30 ml) 1 sticlă
- 9) Soluție de redisolvare (50 ml) 1 sticlă

4. Materiale necesare, dar ne livrate

- 1) **Echipamente:** cititor de microplaci (450nm, 630nm), imprimanta, dispozitiv de uscare a azotului, vortex, agitator, centrifugă (3000g și mai sus), pipete de măsurare, balanta (o sensibilitate reciprocă de 0,01 g), incubator (4°C, 25°C), baie de apă, cronometru;
- 2) **Micropipettoare:** un singur canal 20-200 μL, 100-1000 μL și opt canale 30~300 μL;
- 3) **Reactivi (AR):** Na₂HPO₄·12H₂O, NaH₂PO₄·2H₂O, Acetat de etil, Hexan, apă deionizată

5. Exemplele de pre-tratament

Instrucțiuni

Următoarele puncte trebuie efectuate înainte de pretratarea oricărui tip de probă:

- 1) Numai vârfurile de unică folosință pot fi utilizate pentru experimente, iar vârfurile trebuie schimbate atunci când sunt utilizate pentru absorbția diferitelor reactivi;
- 2) Înainte de experiment, fiecare echipament experimental trebuie să fie curat și să fie reconecurat, dacă este necesar, pentru a evita contaminarea care interferează cu rezultatele experimentale.

Prepararea soluției înainte de pretratarea probei:

- 1) **Tampon de spălare:** 1 parte 20 × tampon de spălare concentrat + 19 părți apă deionizată.
- 2) **0.2M tampon fosfat:** se cântăresc 25.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 4.350g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se adaugă 500ml apă deionizată pentru a se dizolva complet.

5.1 Pregătirea probelor

Miere

- 1) Se cântăresc $2,0 \pm 0,05$ g probă de miere în tub de centrifugare din plastic de 50ml;
- 2) Se adaugă 2ml **0.2M tampon fosfat**, apoi se adaugă 8ml acetat de etil, se agită puternic pentru 5min (sau se folosește un vortex pentru 3min) pentru a face contact eșantion cu faza organică complet;
- 3) Centrifugare la peste 3000 g la temperatura camerei timp de 5min;
- 4) Transferați 4ml de lichid limpede într-un tub de centrifugare de 5ml (**notă: nu luați faza de jos a fazei de apă**), introduceți pentru usucare în baie de apă la 50-60°C;
- 5) Adăugați 1ml Hexan și 0.5ml Soluție de redissolving respectiv, se agită puternic pentru 2min (sau se folosește vortex pentru 1min);
- 6) Centrifugare la peste 3000 g la temperatura camerei timp de 5min;
- 7) Aruncați faza organică în sus strat, să ia 50ul lichid din stratul de jos pentru testare.

Pliere de diluare a probei: 0,5

6. Proceduri ELISA

6.1 Instrucțiuni

- 1) Aduceți toți reactivii și si stripurile cu micro godeuri la temperatura camerei (20-25 °C) înainte de utilizare;
- 2) Se întorc toți reactivii la 2-8 °C imediat după utilizare;
- 3) Reproducibilitatea analizei ELISA, într-o mare măsură, depinde de consistența spălării plăcilor. Funcționarea corectă a spălării plăcilor este punctul cheie în procedurile ELISA;
- 4) Pentru incubare la temperaturi constante, toate eșantioanele și reactivii trebuie să evite expunerea la lumină, iar fiecare microplăcă trebuie sigilată cu membrana de acoperire.

6.2 Proceduri de operare

1. Aduceți trusa de testare la temperatura camerei (20-25 °C) timp de cel puțin 30 min, rețineți că fiecare reactiv trebuie agitat pentru a se amesteca uniform înainte de utilizare, puneți stripurile cu micro godeurile necesare în ramele plăcilor. Resigilați microplaca neutilizată, se păstrează la 2-8 °C, ne congelată.
2. Numerotare: se numerează micro godeurile în funcție de eșantioane și soluție standard; fiecare probă și soluție standard trebuie efectuate în dublu exemplar, se înregistrează pozițiile lor.
3. Se adaugă 50 μL din probă sau soluție standard în straturi separate de dubluri; apoi se adaugă 50 μL din soluția de lucru a anticorpilor în fiecare godeu, se amestecă ușor prin agitarea manuală a plăcii. Se sigilează microplaca cu membrana de acoperire și **se incubează la 4 °C timp de 60min la întuneric.**
4. Se toarnă lichid din microgodeuri, se adaugă 250 μL/bine de tampon de spălare pentru a spăla microplaca pentru 15-30 s, apoi se varsă tamponul de spălare din microgodeuri, se adaugă tampon de spălare să se spele în acest fel timp de 3-4 ori, apoi scoateți și clapeta să se usuce cu hârtie absorbantă.
5. Adăugați 100ul enzima conjugat (nu puneți microplaca la temperatura camerei pentru mult timp după spălare pentru a evita uscarea microplacii, fapt ce duce la diferențe ale rezultatului), se amestecă ușor prin agitarea plăcii manual. Se sigilează microplaca cu membrana de acoperire și **se incubează la 25 °C timp de 20 min la întuneric.** Spălarea ca pasul 4.
6. Colorare: se adaugă un amestec de 100ul soluție de substrat A și soluție de substrat B în fiecare godeu (Notă: se amestecă soluție de substrat A și soluție de substrat B la 1:1, utilizați amestecul în 10min, nu utilizați metal pentru a amesteca sau agita, pentru a evita invalidarea substratului). Se amestecă ușor prin agitarea manuală a plăcii, se sigilează microplaca cu membrana de acoperire, apoi **se incubează la 25 °C timp de 15 min la întuneric pentru colorare.**
7. Determinare: se adaugă 50 μL de soluție de oprire în fiecare godeu. Se amestecă ușor prin agitarea manuală a plăcii. Opriti atunci când se schimbă culoarea substratului de la albastru la galben. Se recomandă citirea valorii OD la lungimea de undă dublă 450/630 nm în 5 minute.

7. Interpretarea rezultatului

Există două metode de a interpreta rezultatele: prima este interpretarea dură, în timp ce a doua este determinarea cantitativă. Rețineți că valoarea DO a eșantionului are o corelație negativă cu concentrația de metronidazol.

7.1 Determinarea calitativă

Intervalul de concentrație (ng/mL) al Metronidazolului poate fi obținut prin compararea valorii medii a DO a eșantionului cu cea a soluției standard. Presupunând că valoarea DO a eșantionului este de 0,3, iar cea a eșantionului este de 1,0, valoarea DO a soluțiilor standard este: 2,243 pentru 0ppb, 1,816 pentru 0,05ppb, 1,415 pentru 0,15ppb, 0,74 pentru 0,45ppb, 0,313 pentru 1,35ppb, 0,155 pentru 4,05ppb, în consecință intervalul de concentrație al eșantionului este de 1,35 până la 4,05ppb, iar cel al eșantionului este de 0,05 până la 0,45ppb.

7.2 Determinarea cantitativă

Valorile medii ale valorilor absorbantei se obțin pentru valoarea medie OD (B) a eșantionului și soluția OD și soluția standard divizată la valoarea OD (B0) a primei soluții standard (0 standard) și, ulterior, înmulțită cu 100%, adică,

$$\text{Procentul valorii absorbantei} = \frac{B}{B0} \times 100\%$$

B — valoarea medie OD a eșantionului sau a soluției standard

B0 — valoarea medie OD a soluției standard 0 ng/ml

Se trasează curba standard cu procente de absorbție ale soluției standard și valorile semilogaritmului soluției standard metronidazole (ng/mL) ca axa Y și, respectiv, axa X.

Se citește concentrația corespunzătoare a eșantionului din curba standard prin încorporarea procentului de absorbție în curba standard. Valoarea rezultată este ulterior înmulțită cu pliul de diluție corespunzător, obținând în cele din urmă concentrația de metronidazol în probă.

Utilizarea software-ului profesional de analiză a acestui kit va fi mai convenabil pentru analiza precisă și rapidă a unei cantități mari de probe. (Vă rugăm să ne contactați pentru acest software).

8. Măsuri de precauție

1. Temperatura camerei sub 25 °C sau temperatura reactivilor și a probelor care nu sunt returnate la temperatura camerei (20-25 °C) vor duce la o valoare standard OD mai mică.
2. Uscarea microplăcii în procesul de spălare va fi însoțită de situații, inclusiv curbele standard neliniare și reproductibilitatea nedorită; Deci, continuați la pasul următor imediat după spălare.
3. Se amestecă uniform, în caz contrar va exista reproductibilitatea nedorită.
4. Soluția de oprire este soluția de acid sulfuric de 2 M, evitați contactul cu pielea.
5. Nu utilizați setul care depășește data de expirare. Utilizarea reactivilor diluați sau alterați din kituri va duce la modificări ale sensibilității și ale valorilor OD de detectare. Nu schimbați reactivii din kiturile de loturi diferite de utilizat.
6. Puneți microplăcile neutilizate într-o pungă cu auto-etanșare pentru a o resigila. Soluția standard și culoarea incoloră este sensibilă la lumină și, prin urmare, nu pot fi expuse direct la lumină.
7. Aruncați soluția de colorare cu orice culoare care indică degenerarea acestei soluții. Valoarea de detectare a soluției standard 1(0 ppb) mai mică de 0,5 indică degenerarea acesteia.

9. Data depozitării și a expirării

Depozitarea: se depozitează la 2-8 °C, ne congelat.

Data expirării: 12 luni; data producerii este pe cutie.

Shenzhen Lvshiyuan Biotehnologie Co, Ltd

D Building, National Biological Industrial Park of Marinelife, No.2 Binhai Road, Dapong, Shenzhen, 518120 China

Tel. 86-755-28438788

Fax 86-755-28938800

E-mail: info@lsybt.com

www.lsybt.com