

Набор для иммуноферментного анализа авермектина (AVMS)

АРТ# DEIA041

1. Общая информация

Авермектины относятся к макролидным антибиотикам, широко применяемым в качестве противопаразитарных средств. Из-за стоимости и сложности процесса применение ВЭЖХ и ГХ для обнаружения остатков ограничено.

Набор для ИФА, который является быстрым, простым, точным и чувствительным по сравнению с обычным инструментальным анализом и требует всего 1,5 часа на один анализ, поэтому он может значительно минимизировать операционную ошибку и трудоемкость.

2. Принцип работы теста

Метод основан на непрямом конкурентном ИФА-анализе. Лунки планшета покрыты авермектином. Во время анализа образец вносится в лунки вместе с первичным антителом, специфичным для авермектина. Если авермектин присутствует в образце, он будет конкурировать с авермектином, нанесенном на поверхность планшета, за первичные антитела. Вторичные антитела, меченные ферментом пероксидазой, связываются с первичными антителами, которые, в свою очередь, связаны с авермектином, нанесенным на лунки планшета. Интенсивность окраски после добавления субстрата находится в обратной зависимости от концентрации авермектина в образце.

3. Применение

Этот набор можно использовать для количественного и качественного анализа остатков AVMS в тканях животных (мышцах, печени, рыбе и креветках) и молоке.

4. Перекрестная реактивность

Ивермектин	100%
Авермектин	200%
Дорамектин	50%

5. Дополнительные материалы

5.1. Оборудование

- Планшетный микроспектрофотометр (450/630 нм)
- Ротационный испаритель или инструменты для сушки азотом
- Гомогенизатор
- Шейкер
- Вихревой смеситель
- Центрифуга
- Аналитические весы (точность: 0,01 г)
- Градуированная пипетка: 10 мл
- Резиновая груша для пипетки
- Полистироловые центрифужные пробирки: 2 мл, 50 мл
- Стеклопластиковая пробирка: 10 мл
- Микропипетки: 20 мкл-200 мкл, 100 мкл-10000 мкл, 250 мкл-мультипипетка

5.2. Реагенты

- Метанол (AR)
- Ацетонитрил (AR)
- Глинозем-N
- N-гексан (AR)
- Деионизированная вода

6. Состав набора

- Микропланшет на 96 лунок, покрытых антигеном
- Стандартные растворы (6 флаконов по 1 мл) – 0ppb, 1ppb, 3 ppb, 9 ppb, 27 ppb, 81 ppb
- Спайк-раствор (1 флакон на 1 мл) – 1 ppm
- Ферментный конъюгат, концентрат, 1 мл, красная крышка
- Раствор антител, 10 мл, зеленая крышка

- Раствор субстрата А, 7 мл, белая крышка
- Раствор субстрата В, 7 мл, красная крышка
- Стоп-реагент, 7 мл, желтая крышка
- Промывочный раствор, 20-кратный концентрат, 40 мл, бесцветная крышка
- Раствор для экстракции, 2-кратный концентрат, 50 мл, синяя крышка

7. Подготовка реагентов

Раствор 1: раствор для экстракции. Разбавьте концентрированный экстракционный раствор в 2 раза деионизированной водой в объемном соотношении 1:1, которая будет использоваться для разбавления концентрированных антител и образцов. Этот раствор можно хранить в течение 1 месяца при температуре 4 °С.

Раствор 2: промывочный раствор. Разбавьте 20-кратный концентрированный промывочный раствор деионизированной водой в объемном соотношении 1:19, которая будет использоваться для промывки планшетов. Этот разбавленный раствор можно хранить в течение 1 месяца при температуре 4 °С.

8. Пробоподготовка

8.1 Меры предосторожности

(a) Пожалуйста, используйте одноразовые наконечники в процессе эксперимента и меняйте наконечники при абсорбции другого реагента. (b) Убедитесь, что все экспериментальные инструменты чистые. (c) Для образцов с высоким содержанием жира попробуйте добавить больше N-гексана или несколько раз экстрагируйте жир N-гексаном. Это не меняет окончательный результат.

8.2 Ткани животных (говядина, свинина, баранина)

- Гомогенизируйте образцы с помощью гомогенизатора.
- Взвесьте $4,0 \pm 0,05$ г гомогенизированного образца в 50-мл полистироловую центрифужную пробирку, добавьте в пробирку 4 мл метанола, встряхивайте в течение 5 минут до полного перемешивания.
- Центрифугируйте для разделения: 3000 g/5 мин/температура окружающей среды;
- Отберите 2 мл супернатанта в полистироловую центрифужную пробирку объемом 10 мл, добавьте 3 мл ацетонитрила и 1 мл н-гексана, затем добавьте 1 г оксида алюминия-N, перемешайте на вортексе в течение 1 минуты, чтобы полностью перемешать.
- Центрифугируйте для разделения: 3000 g/5 мин/температура окружающей среды.
- Удалите верхний слой н-гексана, возьмите 1 мл прозрачного раствора в чистую и сухую стеклянную пробирку объемом 10 мл, высушите на водяной бане при 50-60 °С в потоке азота.
- Добавьте 100 мкл метанола, встряхивать в течение 30 с, затем добавить 900 мкл экстракционного раствора (раствор 1), встряхивать в течение 30 с, чтобы полностью перемешать.
- Используйте 50 мкл приготовленного раствора для анализа.

Фактор разведения: 5.

8.3 Молоко

- Отберите 2 мл образца свежего молока в полистироловую центрифужную пробирку на 50 мл, добавьте 4 мл ацетонитрила и 1 мл N-гексана, затем добавьте 1 г оксида алюминия-N, встряхивайте в течение 5 минут до полного перемешивания.
- Центрифугируйте для разделения: 3000 g/5 мин/температура окружающей среды.
- Удалите верхний слой н-гексана, возьмите 1 мл прозрачного раствора в чистую и сухую стеклянную пробирку объемом 10 мл, высушите на водяной бане при 50-60 °С в потоке азота.
- Добавьте 100 мкл метанола, встряхивать в течение 30 с, затем добавить 900 мкл экстракционного раствора (раствор 1), встряхивать в течение 30 с, чтобы полностью перемешать.
- Используйте 50 мкл приготовленного раствора для анализа.

Фактор разведения: 3.

9. Процедура анализа

9.1 Примечания к анализу

9.1.1 Убедитесь, что все реагенты и микролуночки имеют комнатную температуру (20–25 °С).

9.1.2 Верните все остальные реагенты к температуре 2-8 °С сразу после использования.

9.1.3 Правильная промывка микролунок является важным этапом в процессе анализа; это очень важный фактор для воспроизводимости ИФА.

9.1.4 Избегайте попадания света на планшет и накрывайте микролунок во время инкубации.

9.2 Этапы анализа

9.2.1 Подержите все реагенты при комнатной температуре (20–25 °С) более 30 минут, осторожно встряхните перед использованием.

9.2.2 Достаньте необходимое количество микролунок и немедленно положите остальные в пакет с застежкой-молнией для хранения при температуре 2-8°C.

9.2.3 Перед использованием разбавленный промывочный раствор следует нагреть до комнатной температуры.

9.2.4 Пронумеруйте каждую позицию микролунок, а также все стандарты и образцы, которые должны быть проанализированы в двух экземплярах. Запишите положения стандартов и образцов.

9.2.5 Добавьте по 50 мкл стандартного раствора (компонент набора) или подготовленного образца в соответствующие лунки.

9.2.6 Смешайте концентрированный конъюгат и раствор антитела в соотношении 1:10 (например, 0,5 мл концентрированного конъюгата фермента + 5 мл разбавителя конъюгата). Раствор используйте немедленно.

9.2.7 Добавьте по 50 мкл смеси конъюгата фермента на лунку, осторожно перемешайте, встряхивая планшет вручную, и инкубируйте в течение 30 мин при 25°C под пленкой.

9.2.8. Аккуратно снимите пленкой, вылейте жидкость из лунок и промойте микролунок 250 мкл разбавленного промывочного раствора (раствор 2) с интервалом 10 с 4-5 раз. Удалите оставшуюся воду впитывающей бумагой (остатки пузырьков воздуха можно удалить с помощью чистого наконечника дозатора).

9.2.9. Добавьте в каждую лунку добавляя по 50 мкл раствора субстрата А и 50 мкл раствора субстрата В (компонент набора). Аккуратно перемешайте, покачивая планшет вручную, и инкубируйте в течение 15 мин при 37°C под пленкой (см. 12.8).

9.2.10. Добавьте по 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку. Аккуратно перемешайте, покачивая планшет вручную, и измерьте поглощение при 450 нм (рекомендуется измерять с двойной длиной волны 450/630 нм). Измерьте результат в течение 5 минут после добавления стоп-раствора.

10. Результаты

10.1 Процент поглощения

Средние значения значений абсорбции, полученные для стандартов и образцов, делят на значение абсорбции первого стандарта (нулевого стандарта) и умножают на 100%. Таким образом, нулевой стандарт принимается равным 100%, а значения абсорбции приводятся в процентах.

$$\text{абсорбция (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

B – абсорбция стандарта или образца

B_0 – абсорбция нулевого стандарта

10.2 Стандартная кривая

Чтобы нарисовать стандартную кривую: возьмите значение абсорбции стандартов по оси ординат, полулогарифм концентрации раствора стандартов AVMS (млрд) по оси абсцисс.

Концентрация AVMS каждого образца (ppb), которую можно считать по калибровочной кривой, умножается на соответствующий коэффициент разбавления каждого последующего образца, и получается фактическая концентрация образца.

Примечание: для интерпретации всех данных было разработано специальное программное обеспечение, которое может быть предоставлено по запросу.

11. Технические характеристики

Чувствительность: 1ppb

Предел обнаружения:

Ткани животных:

Ивермектин – 5 ppb

Авермектин – 2,5 ppb

Молоко

Ивермектин – 3 ppb

Авермектин – 1,5 ppb

Точность

Ткань – 90±20%

Молоко – 90±20%

Прецизионность

Коэффициент вариации набора ИФА менее 10%.

12. Примечания

12.1 Средние значения коэффициентов поглощения, полученные для стандартов и образцов, будут снижены, если реагенты и образцы не были отрегулированы до комнатной температуры (20-25°C).

12.2 Не допускайте высыхания микролунок между этапами во избежание неудачной воспроизводимости и переходите к следующему этапу сразу же после постукивания по держателю микропланшетов.

12.3 Осторожно встряхните каждый реагент перед использованием.

12.4 Держите кожу подальше от стоп-раствора, так как это 0,5 М раствор H₂SO₄.

12.5 Не используйте просроченные комплекты. Не меняйте реагенты разных партий, иначе чувствительность снизится.

12.6 Храните наборы ИФА при температуре 2-8°C, не замораживайте. Запечатайте остальные микролуночные планшеты и избегайте прямых солнечных лучей во время всех инкубаций. Рекомендуется накрывать планшеты для микротитрования.

12.7 От раствора субстрата следует отказаться, если он изменил цвет. Реагенты могут испортиться, если значение поглощения (450/630 нм) нулевого стандарта меньше 0,5 (A450 нм <0,5).

12.8 Реакция окрашивания требует 15 минут после добавления раствора А и раствора В. Вы можете продлить время инкубации в диапазоне от 20 минут до более, если цвет слишком светлый, чтобы его можно было определить. Никогда не превышайте 30 минут, наоборот, сократите время инкубации должным образом.

12.9 Оптимальная температура реакции составляет 37°C. Более высокая или более низкая температура приведет к изменению значений чувствительности и оптической плотности.

13. Хранение

Хранить при температуре 2-8°C

Срок годности 12 месяцев

14. Техническая поддержка

Поставщик в России:

ООО «Неотест»

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 649 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

+7 499 704 05 50

support@neo-test.ru



Поставщик в Беларуси:

ОДО «КомПродСервис»

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

www.komprod.com

Техническая поддержка

+375 17 336 50 54

support@komprod.com

