



Инструкция

Карбендазим ИФА набор

REF DEIA6860

Σ 96Т

RUO

Этот продукт предназначен только для исследовательских целей и не предназначен для диагностического использования.

Только для иллюстративных целей. Для проведения анализа необходимо использовать инструкции по применению, прилагаемые к набору.

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

Поставщик в России:
ООО «Неотест»



ул. Расточпина, 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

ИНФОРМАЦИЯ О НАБОРЕ

Применение

Carbendazim ELISA Kit представляет собой конкурентный иммуноферментный анализ для количественного анализа карбендазима в меде, молоке, соке, рисе, мясе, манго.

Уникальными преимуществами набора являются:

1. Быстрый (10 минут) метод экстракции без органических реагентов с высоким выходом (75 - 105%).
2. Высокая чувствительность (0,5 нг/г или ppb) и низкий предел обнаружения (1 нг/г или ppb для меда).
3. Высокая воспроизводимость.
4. Быстрый анализ ELISA (менее 2 часов независимо от количества образцов).

Принцип работы теста

Метод основан на конкурентном ИФА. Исследуемое вещество было нанесено в лунки планшета. Во время анализа образец добавляется вместе с первичным антителом, специфичным к целевому веществу. Если мишень присутствует в образце, она будет конкурировать за антитело, тем самым предотвращая связывание антитела с аналитом, прикрепленным к лунке. Вторичное антитело, помеченное ферментом пероксидазой, нацелено на первичное антитело, образующее комплекс с лекарственным средством, нанесенным на лунки планшета. Результат оценивают по интенсивности окраски после добавления субстрата, которая обратно пропорциональна концентрации определяемого вещества в образце.

Предоставляемые реагенты и материалы

1. Планшет, 1 x 96-луночный планшет (8 лунок x 12 стрипов)
2. Стандарты карбендазима:
Отрицательный контроль (пробирка с белой крышкой)
0,5 нг/мл (пробирка с желтой крышкой), 1,0 мл
1,5 нг/мл (пробирка с оранжевой крышкой), 1,0 мл
3 нг/мл (пробирка с розовой крышкой), 1,0 мл
6 нг/мл (пробирка с фиолетовой крышкой), 1,0 мл
12 нг/мл (пробирка с синей крышкой), 1,0 мл
100 нг/мл (добавка, пробирка с красной крышкой), 1,0 мл
3. Антитело к карбендазиму №1, 6 мл
4. 100X HRP-конъюгированное антитело № 2, 250 мкл
5. Разбавитель антител № 2, 20 мл.
6. Промывочный раствор 20X**, 30 мл
7. Стоп-раствор**, 14 мл.
8. Субстрат ТМБ**, 10 мл
9. 10-кратный буфер для экстракции образцов F, 25 мл
10. Концентрат экстракционного буфера CBD, 30 г.
11. Реагент для очистки CBD, 25 г
12. 10-кратный буфер для экстракции манго (по запросу), 20 мл
13. 100-кратный балансирующий буфер для манго (по запросу), 1 мл
14. 20X CBD Мёд R. Vf. (по запросу), 6 мл

* Если вы не планируете использовать набор в течение более 3 месяцев, храните антитело № 1 к карбендазиму и антитело № 2, конъюгированное с 100X HRP, при температуре -20 °C или в морозильной камере.

Необходимые материалы, не входящие в состав набора

1. Ридер для микротитровальных планшетов (450 нм)
2. Вортекс (например, вортекс Gneie VWR)
3. Пипетки на 10, 20, 100 и 1000 мкл
4. Многоканальная пипетка: 50–300 мкл (необязательно)

Хранение

В комплект Carbendazim ELISA Kit рассчитан на 96 определений или тестирования 42 образцов в двух экземплярах (при условии, что для стандартов используется 12 лунок). Верните все неиспользованные микролуночки в пакет из фольги и снова запечатайте их осушителем, входящим в оригинальную упаковку. Хранить набор при температуре 2-8°C *. Срок годности 12 месяцев при правильном хранении набора.

Сбор и подготовка образцов

Убедитесь, что образцы правильно хранятся. Как правило, образцы следует хранить в холодильнике при температуре 2–4 °C не более 1–2 дней. Заморозьте образцы до температуры не ниже -20°C, если их необходимо хранить в течение более длительного периода. Замороженные образцы перед использованием можно разморозить при комнатной температуре (20–25°C / 68–77°F) или в холодильнике.

1. Подготовка буфера для экстракции образцов 1X

Смешайте 1 объем буфера для экстракции образцов 10X с 9 объемами дистиллированной воды.

2. Подготовка буфера для экстракции 1X CBD

Перенесите весь порошок из пакета буфера для экстракции концентрата CBD в бутылку емкостью 125 мл, добавьте 90 мл дистиллированной воды, встряхните 2 минуты вручную, оставьте раствор при комнатной температуре на 20 минут. Ничего страшного, если на дне бутылки будет наблюдаться небольшой остаток соли.

3. Приготовление 1X медового ресуспендирующего буфера CBD

Смешайте 1 объем 20X CBD медового ресуспендирующего буфера с 19 объемами дистиллированной воды.

4. Приготовление 1% уксусной кислоты/ацетонитрила

Смешайте 1 мл 100% уксусной кислоты с 99 мл ацетонитрила.

5. Подготовка буфера для экстракции манго 1X

Смешайте 1 объем 10X буфера для экстракции манго с 9 объемами дистиллированной воды.

6. Приготовление балансирующего буфера 100X для манго

Смешайте 1 объем 100X балансирующего буфера с 99 объемами дистиллированной воды.

Мед

1. Растворите 1 г меда в 1 мл буфера для экстракции 1X CBD в центрифужной пробирке на 15 мл.

2. Добавьте 4 мл 1% раствора уксусной кислоты/ацетонитрила. Смешивайте на вортексе в течение 3 минут на максимальной скорости вручную или в течение 10 минут с помощью многопробирочного вортекса.

3. Центрифугируйте образец в течение 5 минут при 4000 g при комнатной температуре (20–25 °C/68–77 °F).

4. Перенесите 1,6 мл супернатанта ацетонитрила в новую пробирку, содержащую 300 мг (280–320 мг) реагента для очистки CBD. Перемешайте на вортексе в течение 30 секунд на максимальной скорости и оставьте при комнатной температуре не менее чем на 5 минут.

5. Центрифугируйте образец в течение 5 минут при 4000 g при комнатной температуре (20–25 °C/68–77 °F).

6. Перенесите 600 мкл супернатанта в другую пробирку (соответствует 0,15 г исходного образца) и с помощью роторного испарителя высушите образец при 60–70 °C при пониженном давлении. В качестве альтернативы образец можно высушить, продувая его газообразным азотом на водяной бане с температурой 60–70 °C.

7. Растворите высушенный остаток в 1,5 мл 1X CBD медового ресуспендирующего буфера и энергично встряхивайте в течение 1 минуты. Поместите образцы в инкубатор при 60 °C или в термоблок при 60 °C на 10 минут. Встряхивайте образцы снова в течение 1 минуты, чтобы убедиться, что все остатки растворились.

8. Используйте для анализа 50 мкл образца на лунку.

Примечание: коэффициент разбавления: 10.

Сок/Молоко

1. Добавьте 0,8 мл буфера для экстракции 1X CBD, 0,2 мл балансирующего буфера для манго и 4 мл ацетонитрила к 1 мл образца сока/молока, перемешайте в вортексе в течение 1 минуты на максимальной скорости.

2. Центрифугируйте в течение 5 минут при 4000 g при комнатной температуре (20–25 °C / 68–77 °F).

3. Перенесите 1,6 мл супернатанта с ацетонитрилом в другую пробирку, добавьте около 300 мг (280–320 мг) реагента для очистки CBD, вортексируйте в течение 30 секунд на максимальной скорости, оставьте при комнатной температуре не менее чем на 5 минут.

4. Перенесите 1,0 мл супернатанта в другую пробирку (что соответствует 0,25 мл исходного образца) в новый флакон и с помощью роторного испарителя высушите образец на водяной бане при 60–70 °C при пониженном давлении. В качестве альтернативы образец можно высушить путем продувки газообразным азотом на водяной бане при температуре 60–70 °C.

5. Растворите высушенный остаток в 0,5 мл 1X буфера для экстракции образцов путем встряхивания на максимальной скорости в течение 1 минуты.

6. Используйте 50 мкл образца на лунку для анализа.

Примечание: коэффициент разбавления – 2.

Пюре из манго

1. К 1 мл жидкого пюре манго добавьте 10 мкл балансирующего буфера для манго. Смешайте образец на вортексе в течение 20-30 секунд.
2. Добавьте к образцу 1,990 мл 1X буфера для экстракции манго.
3. Смешайте образец на вортексе в течение 3–5 минут.
4. Центрифугируйте образец в течение 10 минут при 4000 g при комнатной температуре.
5. В анализе используйте 50 мкл супернатанта на лунку.

Примечание: Коэффициент разбавления – 3.

Мясо

1. Добавьте 1 мл буфера для экстракции 1X CBD и 4 мл ацетонитрила к 1 г образца мяса, встряхивайте в течение 3 минут на максимальной скорости вручную или в течение 10 минут с помощью многопробирочного вортексера.
2. Центрифугируйте в течение 5 минут при 4000 g при комнатной температуре (20–25°C/68–77°F).
3. Перенесите 1,6 мл супернатанта с ацетонитрилом в другую пробирку, добавьте около 300 мг (280-320 мг) реагента для очистки CBD, вортексируйте в течение 30 секунд на максимальной скорости, оставьте при комнатной температуре не менее чем на 5 минут.
4. Перенесите 1,2 мл супернатанта в другую пробирку (соответствует 0,3 г исходного образца) в новый флакон и с помощью роторного испарителя высушите образец на водяной бане при 60–70°C при пониженном давлении. В качестве альтернативы образец можно высушить путем продувки газообразным азотом на водяной бане при температуре 60-70°C.
5. Растворите высушенный остаток в 0,3 мл 1X буфера для экстракции образцов F путем встряхивания на максимальной скорости в течение 1 минуты.
6. Используйте для анализа 50 мкл образца на лунку.

Примечание: Коэффициент разбавления – 1.

Рис

1. Добавьте 2 мл буфера для экстракции 1X CBD и 4 мл ацетонитрила к 1 г образца риса, встряхивайте в течение 3 минут на максимальной скорости.
2. Центрифугировать в течение 5 минут при 4000 g при комнатной температуре (20–25°C / 68–77°F).
3. Перенесите 1,6 мл супернатанта с ацетонитрилом в другую пробирку, добавьте около 300 мг (280-320 мг) реагента для очистки CBD, вортексируйте в течение 30 секунд на максимальной скорости, оставьте при комнатной температуре не менее чем на 5 минут.
4. Перенесите 1,0 мл супернатанта в другую пробирку (что соответствует 0,25 мл исходного образца) в новый флакон и с помощью роторного испарителя высушите образец на водяной бане при 60–70°C при пониженном давлении. В качестве альтернативы образец можно высушить путем продувки газообразным азотом на водяной бане при температуре 60-70°C.
5. Растворите высушенный остаток в 0,5 мл 1X буфера для экстракции образцов путем встряхивания на максимальной скорости в течение 1 минуты.
6. Используйте 50 мкл образца на лунку для анализа.

Примечание: коэффициент разбавления – 2.

Подготовка реагентов

ВАЖНО: Перед использованием все реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (1–2 часа при 20–25°C/68–77°F); Обязательно прочтите раздел «Меры предосторожности». Растворы должны быть приготовлены непосредственно перед тестом ИФА. Все реагенты следует смешивать, осторожно переворачивая или взбалтывая перед использованием. Подготовьте объемы, необходимые для запуска лунок. Не возвращайте реагенты в исходные пробирки/бутылки. Использование одноразовых резервуаров при работе с реагентами может свести к минимуму риск загрязнения и рекомендуется.

1. Приготовление 1X HRP-конъюгированного антитела № 2

Смешайте 1 объем 100X антител № 2 с 99 объемами разбавителя антител № 2.

2. Подготовка промывочного раствора 1X

Смешайте 1 объем 20X концентрата промывочного буфера с 19 объемами дистиллированной воды.

Процедура анализа

Пометьте отдельные полоски, которые будут использоваться, и аликвоты реагентов, как показано в следующем примере:

Компонент	Объем на 1 реакцию	24 реакции
Антитела карбендазима #1	50 мкл	1,2 мл
1X HRP-конъюгат антител #2	150 мкл	3,6 мл
1X промывочный раствор	2,0 мл	48 мл
Стоп-реагент	100 мкл	2,4 мл
Субстрат ТМВ	100 мкл	2,4 мл

1. Добавьте по 50 мкл каждого стандарта ципрогептадина в двух экземплярах в разные лунки (добавляйте стандарты в планшет только в порядке от низкой концентрации к высокой концентрации).

2. Добавьте по 50 мкл каждого образца в двух экземплярах в разные лунки для образцов.

3. Добавьте 50 мкл антитела #1 в каждую лунку и хорошо перемешайте, аккуратно покачивая планшет вручную в течение 1 минуты.

4. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при комнатной температуре (20–25°C/68–77°F).

5. Промойте планшет 3 раза 250 мкл промывочного раствора 1X. После последней промывки переверните тарелку и аккуратно постучите тарелкой насухо о бумажные полотенца (выполните следующий шаг сразу после мытья тарелки. Не допускайте высыхания тарелки на воздухе между рабочими этапами).

6. Добавьте 150 мкл 1X антитела #2 в каждую лунку, инкубируйте планшет в течение 30 минут при комнатной температуре (20–25°C/68–77°F).

7. Промойте планшет 3 раза 250 мкл промывочного раствора 1X. После последней промывки переверните тарелку и аккуратно постучите тарелкой насухо о бумажные полотенца (выполните следующий шаг сразу после мытья тарелки. Не допускайте высыхания тарелки на воздухе между рабочими этапами).

8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМВ. Время реакции сразу после добавления субстрата. Смешайте раствор, осторожно покачивая планшет вручную в течение 1 минуты во время инкубации. (Не помещайте какой-либо субстрат обратно в исходный контейнер, чтобы

избежать потенциального загрязнения. Любой раствор субстрата, проявляющий окраску, свидетельствует о порче и должен быть утилизирован. Рекомендуется накрывать планшеты для микротитрования во время инкубации).

9. После инкубации в течение 10–15 минут при комнатной температуре добавьте 100 мкл стоп-буфера, чтобы остановить ферментативную реакцию.

10. Считайте планшеты как можно скорее после добавления стоп-буфера на планшет-ридер с длиной волны 450 нм (перед чтением протрите дно планшета безворсовой салфеткой, чтобы убедиться, что влага или отпечатки пальцев не мешают показаниям).

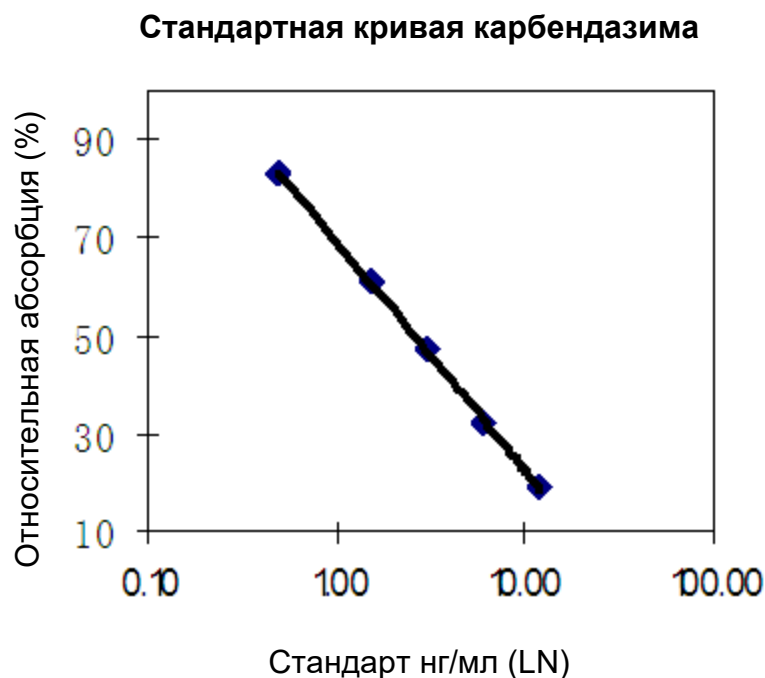
Вычисления

Стандартную кривую можно построить, нанеся на логарифмическую кривую среднюю относительную абсорбцию (%), полученную для каждого эталонного стандарта, в зависимости от его концентрации в нг/мл.

$$\text{Относительная абсорбция (\%)} = \frac{\text{стандарт абсорбции (или образец)} \times 100}{\text{нулевой стандарт абсорбции}}$$

Типичная стандартная кривая

На следующем рисунке представлена типичная стандартная кривая карбендазима:



Чувствительность

Мед – 5 мкг/кг (ppb)

Сок – 2 мкг/кг (ppb)

Рис кормовой – 2 мкг/кг (ppb)

Манго – 3 мкг/кг (ppb)

Мясо – 1 мкг/кг (ppb)

Специфичность

Карбендазим: 100%

Мебендазол: 100%

Фенбендазол: 80%

4'-гидроксибенбендазол: 48%

Бензальдегид: <0,1%

Камбендазол: <0,1%

Предупреждения

1. Стандарты содержат карбендазим. Обращаться с особой осторожностью.
2. Не используйте набор после истечения срока годности.
3. Не смешивайте реагенты из разных наборов или партий, за исключением компонентов с одинаковыми номерами деталей в течение срока годности.
4. Старайтесь поддерживать температуру в лаборатории на уровне 20-25°C (68-77°F). Избегайте проведения анализов под вентиляционными отверстиями или рядом с ними, так как это может привести к чрезмерному охлаждению, нагреву и/или испарению. Кроме того, не проводите анализы под прямыми солнечными лучами, так как это может привести к чрезмерному нагреву и испарению. Следует избегать холодных столешниц, помещая несколько слоев бумажных полотенец или другого изоляционного материала под планшеты для анализа во время инкубации.
5. Убедитесь, что вы используете только дистиллированную или деионизированную воду, так как качество воды очень важно.