

IVERMECTINA

AMOSTRA DE TECIDO

EXTRAÇÃO

Verificar abaixo o preparo do Tampão de diluição para utilização no passo de extração

Método I:



Transfira 1 g de amostra homogeneizada para um tubo de 15 ml
Adicione 0.75ml do Tampão de Extração de Ivermectina.

Agite em vortex por 30 segundos

Adicione 1 ml de acetonitrila.

Agite em vortex por 30 segundos.

Homogeneizar por inversão por 15 minutos.

Centrifugar por 10 minutos a 2000xg.

Transfira 0.5 ml da parte superior para um tubo limpo.

Evaporar até a secar sob uma corrente de nitrogênio a 50°C.

Dissolva o resíduo em 0.75 ml de tampão de diluição.

Agite vigorosamente em vortex por 30 segundos

Usar 50 µl de amostra para a microplaca



IVERMECTINA

AMOSTRA DE TECIDO

EXTRAÇÃO

Metodo II

Preparar tampão diluição da amostra:

Adicionar 1 ml de etanol a 100% com 9 ml de tampão diluição.

0.5 M NaCl:

Dissolva 2.92 gramas NaCl com 100 ml de água destilada

0.25 M NaCl:

Dissolva 0.146 gramas NaCl com 100 ml de água destilada

Transfira 1 g de amostra homogeneizada para um tubo e adicione 1 ml com NaCl a 0.5 M e 1 ml Metanol 100%.

Agite em vortex por 1 minuto.

Adicione 5 ml de acetato de etila e homogeneíze por inversão por 10 minutos.

Centrifugar por 5 minutos a 2000xg.

Transfira 4 ml da parte superior para um tubo de vidro limpo. O Acetato de etila será evaporado sob uma corrente de nitrogênio a 50°C.

Dissolva o resíduo em 100 µl de acetonitrila, vortex, centrifugue por 5 minutos à 2000xg.

-Diluir 10 µl do sobrenadante com 190 µl de tampão de diluição de amostra, vortex.

Usar 50 µl de amostra para a microplaca



IVERMECTINA

AMOSTRA DE TECIDO

PREPARO DE REAGENTES



Deixar os Reagentes atingir a temperatura ambiente

Faça o mapa do Ensaio

Separe o número de cavidades a serem utilizadas



Tampão de diluição (dilution buffer, 4x concentrado) o tampão de diluição está 4x concentrado. Antes da diluição (20 mL de tampão + 60 mL de água destilada) o tampão concentrado deve estar em temperatura ambiente e ser agitado completamente. O tampão concentrado pode apresentar precipitação do conteúdo. Agite bem antes da diluição com água destilada. O tampão diluído 4 vezes pode ser armazenado em refrigerador (+2°C a +8°C) até a data de expiração indicada no rótulo do kit



Prepare a Solução de lavagem, concentrado 20 vezes. Para cada tira são utilizados 40 mL de tampão de lavagem diluído (2 mL de tampão de lavagem + 38 mL de água destilada) e deixe a lavadora pronta para o uso.



Reconstitua o frasco do conjugado liofilizado (Ivermectina – HRPO) com 4 mL de tampão de diluição (dilution buffer), agite completamente e mantenha protegido da luz até o momento do uso. Para armazenamento prolongado, faça alíquotas e armazene a -20°C.

Reconstitua o frasco de anticorpos liofilizados (anti-ivermectina de coelho) com 4 mL de tampão de diluição (dilution buffer), agite completamente e mantenha protegido da luz até o momento do uso. Para armazenamento prolongado, faça alíquotas e armazene a -20°C

IVERMECTINA

AMOSTRA DE TECIDO

ENSAIO



Pipete 100 μL do padrão zero em duplicata para o branco. Pipete 50 μL do padrão zero em duplicata, 50 μL de cada uma das soluções padrão em duplicata 50 μL de cada solução de amostra em duplicata nos poços restantes da microplaca, 25 μL de conjugado em todos os poços, exceto o branco e 25 μL da solução de anticorpos em todos os poços, exceto o branco



Sele a microplaca e agite por 1 minuto

Incube a placa por 1 hora, em temperatura 37°C no escuro



Remova a solução da microplaca e lave 3 vezes com o tampão de lavagem (rinsing buffer).

Pipete 100 μL de solução de substrato em cada poço.



Incube a placa por 30 minutos em temperatura ambiente (20°C – 25°C)

Adicione 100 μL de solução stop em cada poço



Leia os valores de absorbância imediatamente em 450 nm

Calcule a concentração de ivermectina em cada amostra

IVERMECTINA

AMOSTRA DE TECIDO

OBSERVAÇÕES



Não inicie o ensaio antes de confirmar os volumes e procedimento na protocolo de ensaio enviado junto com o kit. Eventualmente o ensaio é atualizado e mudanças são comuns.

Tenha certeza que a pipeta esteja calibrada



Sugerimos a utilização de uma repipetadora e ou pipeta multicanal para adicionar os reagentes ao "mesmo tempo" e para lavagem mais adequada.



Não encoste a pipeta na cavidade durante o ensaio

Cuidado com o arrasto e contaminação durante pipetagem, lavagem, e homogeneização.



Tenha em mente que o ensaio se limita a faixa de detecção da curva e ao Limite Mínimo de Detecção (LOD)

Verifique o certificado de controle de qualidade

IVERMECTINA

AMOSTRA DE TECIDO

CONTATO

Estamos a disposição, segue o nosso contato:



11 2386-3963



info@hhub.com.br



hhub.com.br