

# TETRACICLINA

AMOSTRA DE TECIDO

## EXTRAÇÃO



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

Pesar 1 g de tecido finamente cortado e subseqüentemente homogeneizado em um tubo limpo



Adicione 0,5 ml de água destilada, adicione 1,5 ml de metanol a 100%, homogeneize em vortex, e misture por inversão durante 15 minutos

Centrifugar (5 minutos, 2000 x g)



Diluir 50  $\mu$ l desta solução com 350  $\mu$ l de tampão de diluição para amostras \*, misture em vortex

Uma alíquota de 50  $\mu$ L de amostra diluída no teste ELISA



# TETRACICLINA

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

Este ELISA contém dois frascos de tampão de diluição.

Do capítulo 5 no.1 do tampão de diluição é 4x concentrado. Diluir o tampão 1: 4 (1 ml de tampão + 3 ml de água destilada) antes de usar. Este tampão é para dissolver o conjugado e preparar o tampão de diluição da amostra



Tampão de diluição de amostra \*

O tampão de diluição da amostra não é fornecido no kit. Prepare esse buffer da seguinte maneira: 18 ml de tampão de diluição, adicionar 2 ml de 100% de metanol, misturar e conservar este tampão a 4°C até usar



Mcllvain Buffer

Prepare 0,2 M de solução dibásica de sódio:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  28,4 g

Água destilada até 1 litro

Prepare solução de citrato trissódico 0,1 M Dihydrate:

# TETRACICLINA

AMOSTRA DE TECIDO

## PREPARO DE REAGENTES



$C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$  29,4 g | Água destilada até 1 litro | Misture acima das soluções 1: 1, verifique o pH; ajustar o pH para 7,0 com HCl | Diluir 1: 1 com metanol antes de usar



Padrões: Este ELISA contém dois padrões, 2 ng / ml e 1000 ng / ml, respectivamente

Padrão 2 ng / ml:

Prepare uma faixa de diluição dos padrões de tetraciclina. Adicione 2 ml de tampão de diluição da amostra \* para o padrão de tetraciclina e misture. Esta solução contém 2 ng de tetraciclina por ml. Pipetar 0,25 ml desta solução para um tubo limpo e adicionar 0,25 ml de diluição da amostra amortecedor\*. Continue a fazer um intervalo de diluição de 1,0, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 ng / ml. Para armazenamento prolongado: congelar alíquotas a  $-20^{\circ}C$



Padrão 1000 ng / ml

Este padrão é para spiking. Adicione 1 ml de tampão de diluição de amostra \* ao padrão de tetraciclina e misture. Esta solução contém 1000 ng de tetraciclina por ml. Para armazenamento prolongado: congelar alíquotas a  $-20^{\circ}C$



# TETRACICLINA

AMOSTRA DE TECIDO

## PREPARO DE REAGENTES



Reconstituir o frasco do conjugado liofilizado (tetraciclina-HRP) com 6 ml de diluição buffer (capítulo 5 no.1), misture bem e mantenha no escuro até o uso. Para armazenamento prolongado: congelar alíquotas a  $-20^{\circ}\text{C}$



A solução de substrato / cromogénio (pronta a usar) tende a precipitar a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Leva cuidado para que este frasco esteja à temperatura ambiente quando usado (mantenha no escuro) e misture o conteúdo antes de pipetar nos poços



Prepare a Solução de lavagem (Wash Solution Concentrate): tampão de lavagem (rinsing buffer) é fornecido concentrado 20 vezes. Prepare as diluições pouco antes do uso. 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

# TETRACICLINA

AMOSTRA DE TECIDO

## ENSAIO



Pipete 100  $\mu$ L do padrão zero em duplicata para o branco. Pipete 50  $\mu$ L do padrão zero em duplicata, 50  $\mu$ L de cada uma das soluções padrão em duplicata 50  $\mu$ L de cada solução de amostra em duplicata nos poços restantes da microplaca, 50  $\mu$ L de conjugado em todos os poços, exceto o branco



Sele a microplaca e agite por 1 minuto



Incube a placa por 1 hora, em temperatura ambiente (20°C – 25°C) no escuro

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

Pipete 100  $\mu$ L de solução de substrato em cada poço.



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

Adicione 100  $\mu$ L de solução stop em cada poço



Leia os valores de absorbância imediatamente em 450 nm

Utilize o fator 24 para amostras de tecido

# TETRACICLINA

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

# TETRACICLINA

AMOSTRA DE TECIDO

CONTATO

Estamos a disposição, segue o nosso contato:



11 2386-3963



info@hhub.com.br



hhub.com.br