



НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИГИДРОТЕСТОСТЕРОНА (DHT)

Кат. № : EIA-4132
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

Методика от 11-03-2011
Версия 2.1

**Набор предназначен только для исследовательских целей.
Не для использования в диагностических целях**

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения дигидротестостерона в человеческой сыворотке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор DRG DHT ELISA базируется на типическом принципе конкуренции. Конкуренция проходит между немеченым антигеном (присутствующим в стандартах, контролях и образцах пациента) и энзимо-меченым антигеном (конъюгатом) для определенного числа антител, связующих на стенках микропланшета. Несвязанный материал промывается во время промывочных и декантирующих процедур. После промывания добавляется субстрат энзима. Ферментная реакция останавливается добавлением стоп раствора. Абсорбция измеряется с помощью микропланшетного ридера. Интенсивность развитого окраса обратно пропорциональна концентрации дигидротестостерона в образце. Набор стандартов используется для построения кривой, с которой и считываются значения DHT в образцах пациента и контролях.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ/ ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Пользователь должен полностью понимать эту инструкцию для успешного использования набора. Правильное исполнение будет достигнуто только при точном исполнении требований инструкций.
2. Контрольный материал и пули сыворотки должны использоваться при каждом проведении анализа при высоких и низких уровнях для оценки надежности результатов.
3. Если в анализе необходимо использование воды, используйте дистиллированную или деионизированную воду.
4. Используйте одноразовые перчатки при обращении с образцами и реагентами.
5. Все реагенты набора и образцы нужно привести к комнатной температуре и тщательно, но осторожно смешать перед использованием.
6. Для каждого анализа нужно строить калибровочную кривую.
7. Неправильная процедура, неточное пипетирование, недостаточное промывание, неправильное хранение реагентов может отражаться на результатах анализа. В каждом анализе нужно использовать контроль и он не должен превышать установленные границы.
8. При считывании микропланшета, присутствие пузырьков в планшете будет влиять на оптическую плотность. Осторожно удалите пузырьки перед считыванием.
9. ТМВ - чувствительный к свету и должен оставаться бесцветным при правильном хранении. Нестабильность или контаминация может проявляться при появлении голубого окраса. В этом случае его нельзя использовать.
10. При внесении раствора субстрата и стоп раствора не используйте пипетки, в которых жидкости будут контактировать с металлическими частями пипетки.
11. Чтобы предотвратить контаминацию реагентов используйте одноразовые пипетки для внесения каждого реагента, образца, контроля и стандарта.
12. Не смешивайте компоненты разных наборов и не используйте их после истечения срока годности.
13. Реагенты набора нужно считать опасным и уничтожать согласно местному законодательству.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Все реагенты набора калиброваны для прямого определения DHT в человеческой сыворотке. Набор не предназначен для определения DHT в слюне, плазме или других образцах человеческого или животного происхождения.
2. Не использовать сильно гемолизированные, липемические, иктерические образцы или такие, что неправильно хранились.
3. Образцы или контроли сыворотки, содержащие азид или тиомерозал – несовместимы с набором и могут давать неправильные результаты.
4. Только Калибратор А можно использовать для разбавления высоких образцов сыворотки. Использование каких-либо других реагентов может привести к получению неправильных результатов.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

Человеческая сыворотка, которая может использоваться в приготовлении стандартов и контролей была протестирована и определена как не реактивная на Гепатит В поверхностный антиген и была также протестирована на присутствие антител к HCV и HIV и также была определена как негативная. Тем не менее, ни один тестовый метод не может полностью гарантировать, что в сыворотке отсутствуют вирусы или же инфекционный фактор. По этому реагенты должны считаться опасными и с ними нужно обращаться как и с какими либо образцами крови.

ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ

Избегайте контакта с реагентами, содержащими ТМВ, перекись водорода и серную кислоту. При контакте с любым из этих реагентов, промойте большим количеством воды. ТМВ считается канцерогенным.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для дублированного определения необходимо приблизительно по 0,2 мл сыворотки. Соберите 4-5 мл крови в соответствующе меченую пробирку и дайте ей сгуститься. Центрифугируйте и тщательно удалите сывороточный шар. Храните при 4 °С до 24 часов или при -10 °С или ниже если анализ будет проведен позже. Считайте все образцы человеческой сыворотки потенциально опасными и при обращении с ними соблюдайте меры предосторожности.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Не нужно никакой предварительной обработки образцов.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ.

1. Калиброванные точные пипетки для внесения 50, 100, 150 и 300 мкл.
2. Одноразовые наконечники для пипеток.
3. Дистиллированная вода или деионизированная вода.
4. Планшетный шейкер.
5. Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и верхнем пределе ОП 3,0 или выше (см. Процедура анализа, этап 10).

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшет, покрытый кроличьими Anti-DHT антителами, разделяемые лунки. Готов к использованию.

Содержание: один микропланшет с 96 лунками, покрытыми поликлональными антителами в запечатанном мешке с влагопоглотителем.

Хранение: при 2-8 °С

Стабильность: 12 месяцев или же согласно этикетке.

2. Концентрат дигидротестостерона-пероксидазы хрена (HRP) Конъюгата. Необходима подготовка.

Содержание: DHT-HRP конъюгат в протеиновом буфере с консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 200 мкл/флакон

Хранение: при 2-8 °С

Стабильность: 12 месяцев или же согласно этикетке.

Приготовление: Разбавьте 1:100 в тестовом буфере перед использованием (например: 20 мкл HRP в 2 мл тестового буфера) Если используется весь планшет, разбавьте 120 мкл HRP в 12 мл тестового буфера. Избавьтесь от лишнего.

3. Калибраторы дигидротестостерона. Готовы к использованию.

Содержание: Шесть флаконов, содержащих DHT в протеиновом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлен блокирующим буфером с известным количеством DHT. Указанные ниже концентрации являются приблизительными. См. точные концентрации на этикетке флакона.

Калибратор	Концентрация	Объем/флакон
Калибратор А	0 пг/мл	2.0 мл
Калибратор В	25 пг/мл	0.6 мл
Калибратор С	100 пг/мл	0.6 мл
Калибратор D	500 пг/мл	0.6 мл
Калибратор E	1000 пг/мл	0.6 мл
Калибратор F	2500 пг/мл	0.6 мл

Хранение: при 2-8 °С

Стабильность: 12 месяцев в неоткрытых флаконах или же согласно этикетке. Если флакон открыт, его нужно использовать в течении 14 дней или же приготовить аликвоты и хранить в замороженном виде. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

4. Контроль. Готов к использованию.

Содержание: Один флакон, содержащий DHT в протеиновом буфере с консервантом, не содержащим ртуть. Приготовлен блокирующим буфером с известным количеством DHT. Для ожидаемых значений и принятых границ см. этикетку на флаконе.

Объем: 0,6 мл/флакон

Хранение: при 2-8 °С

Стабильность: 12 месяцев или же согласно этикетке.

Если флакон открыт, его нужно использовать в течении 14 дней или же приготовить аликвоты и хранить в замороженном виде. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

5. Концентрат Моющего Буфера. Необходимо приготовление.

Содержание: Одна бутылка, содержащая буфер с неионным детергентом и консервантом, не содержащим ртуть.

Объем: 50 мл/бут.

Хранение: при 2-8 °С

Стабильность: 12 месяцев или же согласно этикетке.

Приготовление: Разбавьте 1:10 в дистиллированной или деионизированной воде перед использованием. Если используется весь планшет, разбавьте 50 мкл концентрата моющего буфера в 450 мл воды.

6. Буфер анализа. Готов к использованию.

Содержание: один флакон, содержащий буфере на основе протеина с консервантом, не содержащим ртуть.

Объем: 15 мл/флакон

Хранение: при 2-8 °С

Стабильность: 12 месяцев или же согласно этикетке.

7. TMB субстрат. Готов к использованию.

Содержание: одна бутылка, содержащая тетраметилбензидин и перекиси водорода в буфере, содержащим DMSO или в буфере без DMF.

Объем: 16 мл/флакон

Хранение: при 2-8 °С

Стабильность: 12 месяцев или же согласно этикетке.

8. Стоп Раствор

Содержание: один флакон, содержащий 1 М Серной кислоты.

Объем: 6 мл/флакон

Хранение: при 2-8 °С

Стабильность: 12 месяцев или же согласно этикетке.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

Предварительная обработка образцов – не требуется.

Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре. Калибраторы, контроли и образцы нужно анализировать в дубликаты. После начала теста все этапы нужно выполнять без перерывов.

1. Подготовьте рабочий раствор DHT-HRP конъюгата и Моющего буфера.
2. Поставьте назад в холодильник неиспользованные лунки. Запечатйте пакет.
3. Пипетируйте 50 мкл каждого калибратора, контроля и образца в соответствующе меченые лунки в дубликаты.
4. Пипетируйте 100 мкл конъюгата рабочего субстрата в каждую лунку (рекомендуется использовать многоканальную пипетку)
5. Инкубируйте на планшетном встряхивателе (приблизительно 200 об/мин.) на протяжении 1 часа при комнатной температуре.
6. Промойте лунки три раза с помощью 300 мкл разбавленного рабочего буфера на лунку и постучите планшетом по абсорбирующей бумаге для того чтобы убедиться что он сухой. (рекомендуется использование промывателя).
7. Пипетируйте 150 мкл субстрата TMB в каждую лунку через равные интервалы времени.
8. Инкубируйте на планшетном шейкере на протяжении 10-15 минут при комнатной температуре (или пока калибратор А не будет иметь темно-синего цвета для желаемой ОП).

9. Пипетируйте 50 мкл стоп раствора в каждую лунку через интервалы времени как указано в этапе 7.
10. Считайте результаты на микропланшетном считывателе при 450 нм в течении 20 минут после добавления стоп-раствора.
 - Если ОП превышает верхнюю границу определения или если 450 нм – недоступен, можно воспользоваться 405 или 415 нм фильтром. Оптическая плотность будет ниже, тем не менее, это не будет влиять на результаты образцов пациентов/контролей.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Вычислите среднюю оптическую плотность каждого дубликата калибратора.
2. Нарисуйте калибровочную кривую на полулогарифмической бумаге: средние значения оптической плотности на оси Y а концентрации калибратора на оси X. Если используется иммуноферментное оборудование, 4-параметровая кривая должна использоваться.
3. Вычислите среднюю оптическую плотность для каждого неизвестного дубликата.
4. Считайте значения неизвестных прямо из калибровочной кривой.
5. Если значения образца превышают 2500пг/мл, разбавьте не больше чем 1:8. Полученный результат нужно умножить на фактор разбавления.

Калибратор	ОП1	ОП2	Средн. ОП	Значение (пг/мл)
A	2.320	2.279	2.300	0
B	1.976	1.928	1.952	25
C	1.058	1.077	1.068	100
D	0.359	0.354	0.357	500
E	0.222	0.205	0.214	1000
F	0.131	0.128	0.130	2500
Неизвестный	0.515	0.507	0.511	300

ТИПИЧНАЯ КАЛИБРОВОЧНАЯ КРИВАЯ

Только для примера. Не использовать для вычисления результатов (см. оригинал инструкции, стр. 8).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»

Ул. Чорновола, 97, в. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122

Тел/факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.ua

www.diameb.ua