



Набор ИФА для определения ИНСУЛИНА в крысиной сыворотке или плазме

Каталог. № : EIA-2048
К-во анализов : 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 04-2006

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предоставляет метод для количественного определения инсулина в сыворотке или плазме крысы.

2. ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Набор Rat Insulin ELISA – твердофазовый двухстадийный иммуоферментный анализ. Он основан на прямой «сэндвич»-методике, в которой два моноклональных антитела направлены против отдельных антигенных детерминант на молекуле инсулина. В течение инкубации инсулин в образце вступает в реакцию с конъюгированными пероксидазой антителами к инсулину и со связанными с микротитрационными лунками антителами к инсулину. Простой этап промывки удаляет несвязанное, меченное ферментом антитело. Связанный конъюгат обнаруживается путем взаимодействия с 3,3', 5,5'-тетраметилбензидином. Реакция останавливается добавлением кислоты, чтобы образовалась колориметрическая конечная точка, которая считывается спектрофотометрически.

3. ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не для применения на человеческих образцах.
- Не для внутреннего или внешнего применения на людях или животных.
- Содержимому настоящего набора и его остаткам нельзя позволять контактировать со жвачными животными или свиньями.
- Стоп-раствор настоящего набора содержит 0.5 M H₂SO₄. Следуйте обычным предосторожностями при обработке опасных химических веществ.

4. ЗАБОР И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотка

Соберите кровь венепункцией, позвольте свернуться и отделите сыворотку центрифугированием. Образцы могут храниться при 2 - 8°C до 24 часов. В течение более длительных периодов храните образцы при -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания.

Плазма

Соберите кровь венепункцией в пробирки, содержащие гепарин или ЭДТА в качестве антикоагулянта, и отделите плазменную фракцию. Образцы могут храниться при 2 - 8°C до 24 часов.

В течение более длительных периодов храните образцы при -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания.

Подготовка образцов

Обычно никакого разбавления не требуется, однако, образцы содержащие > 5.5 мкг/л должны быть разбавлены нулевым стандартом 1/10 о/о.

Примечание! Буферы содержащие азид натрия (NaN₃) не могут использоваться для разбавления образцов.

5. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- 25 мкл микропипетка с одноразовыми наконечниками
- Планшет-ридер ИФА для считывания планшетов с использованием 450 нм фильтра
- Промывочное устройство для микротитрационных планшетов
- Пипетки на 50 и 200 мкл
- Пробирка для (10-100 мл) для подготовки конъюгата
- Редистиллированная вода
- 1000 мл/10 л колба колба
- Аппарат для встряхивания планшета (рекомендуемая скорость - 700-900 оборотов в минуту, орбитальное движение).

6. РЕАГЕНТЫ, НАБОР 1 X 96

Каждый набор Rat Insulin ELISA содержит реагенты на 96 лунок, достаточных для 42 образцов в дублях и одной калибровочной кривой. Для большего ряда анализов используйте объединенные реагенты из упаковок с одинаковыми номерами партий. Дата истечения срока годности всего набора указана на внешней этикетке. Рекомендуемая температура хранения - +2 - 8°C.

Покрытый планшет (мышинный моноклональный анти-инсулин) 8-луночных стрипов	1 планшет	96 лунок	Готовый к использованию
Неиспользованные микропланшетные лунки герметично упакуйте мешочек липкой пленкой и используйте в течение 2 месяцев.			
Стандарты (инсулин крысы) 0.15; 0.4, 1.0; 3.0 и 5.5 мкг/л	5 флаконов	1.0 мл	Готовый к использованию
Нулевой стандарт Помечен желтым цветом	1 флакон	5 мл	Готовый к использованию
Ферментный конъюгат 11 X (мышинный моноклональный анти-инсулин, конъюгированный пероксидазой, 4.4 мкг/л)	1 флакон	600 мкл	Подготовка, см. ниже
Буфер ферментного конъюгата Помечен синим цветом	1 флакон	6 мл	Готовый к использованию

Промывочный буфер 21 x	1 bottle	40 мл	Для приготовления промывочного буфера разбавить 1:20 800 мл редистиллированной водой.
Субстрат ТМВ	1 флакон	22 мл	Готовый к использованию
Примечание! Чувствителен к свету!			
Стоп-раствор	1 флакон	7 мл	Готовый к использованию
0.5 M H ₂ SO ₄			

6.1 Подготовка ферментного конъюгата

Приготовить необходимый объем ферментного конъюгата путем смешивания 50 мкл ферментного конъюгата 11x 500 мкл буфера ферментного конъюгата (1 + 10) для каждого стрипа или как указано в таблице ниже.

Количество стрипов	Ферментный конъюгат	Буфер ферментного конъюгата
4 стрипы	200 мкл	2 мл
6 стрипов	300 мкл	3 мл
12 стрипов (1 планшет)	600 мкл	6 мл

Хранение после разбавления: 2 - 8°C в течение 2 месяцев.

6.2 Подготовка промывочного буфера

Приготовить необходимый объем промывочного буфера путем разбавления промывочного буфера 21x в редистиллированной воде (1 + 20) как указано в таблице ниже. Соответственно перемешать.

Количество планшетов/стрипов	Промывочный буфер 21x	Редистиллированная вода
4 стрипы	12 мл	240 мл
6 стрипов	20 мл	400 мл
1 планшет	35 мл	700 мл
2 планшета	70 мл	1400 мл
3 планшета	110 мл	2200 мл
5 планшетов	180 мл	3600 мл
10 планшетов	350 мл	7000 мл

Хранение после разбавления: 2 - 8°C в течение 24 недель.

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Проводить каждое определение в дубле для стандартов и неизвестных значений. Для каждой процедуры анализа приготовить калибровочную кривую. Все реагенты и образцы перед использованием должны быть приведены к комнатной температуре.

Добавить к анти-инсулиновым лункам	Стандарты	Неизвестные
1. Стандарты	25 мкл	--
2. Неизвестные	--	25 мкл
3. Ферментный конъюгат	50 мкл	50 мкл
4. Инкубировать на шейкере в течение 2 часов при комнатной температуре.		
5. Промыть 6 раз автоматическим промывателем или аспирировать реакционным объемом. Добавить в каждую лунку по 350 мкл промывочного буфера. Полностью аспирировать. Повторить 5 раз. После конечной промывки перевернуть планшет и резко ударить о промокательную бумагу.		
6. Субстрат ТМВ	200 мкл	200 мкл
7. Инкубировать в течение 15 минут.		
8. Стоп-раствор.	50 мкл	50 мкл
9. Разместить планшет на шейкере приблизительно на 5 сек., чтобы обеспечить смешивание субстрата и стоп-раствора.		
10. Измерить абсорбцию при 450 нм и оценить.		

8. ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Имеющиеся в продаже контроли и/или внутренние объединенные сыворотки с низкой, средней и высокой концентрацией инсулина должны использоваться ежедневно как неизвестные, а результаты проверяются каждый день.

Профессиональная лабораторная практика предусматривает фиксирование следующих данных для каждого анализа: номер партии набора; даты перерастворения компонентов набора; значения бланка, стандартов и контролей.

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Автоматизированное вычисление

Концентрация инсулина получается путем автоматизированной обработки данных абсорбции стандартов, кроме нулевого стандарта, против концентрации, использующей кубическую сплайн-регрессию.

9.2 Ручное вычисление

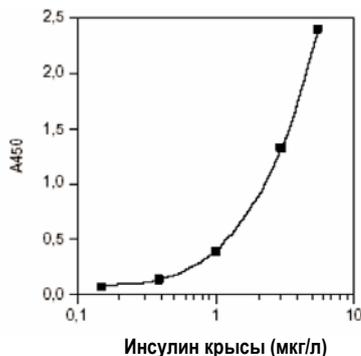
1. Вывести значения абсорбции, полученные для стандартов, кроме нулевого стандарта, против концентрации инсулина на логарифмической или линейно-логарифмической бумаге и постройте калибровочную кривую.
2. Считать из калибровочной кривой концентрацию неизвестных образцов.

Пример результатов

Средние лунки	Название	A ₄₅₀	Конц. мкг/л
1A-B	Стандарт 0	0.070/0.067	
1C-D	Стандарт 0.15 мкг/л	0.084/0.088	
1E-F	Стандарт 0.4 мкг/л	0.141/0.143	
1G-H	Стандарт 1.0 мкг/л	0.398/0.400	
2A-B	Стандарт 3.0 мкг/л	1.318/1.338	
2C-D	Стандарт 5.5 мкг/л	2.337/2.443	
2E-F	Неизвестное 1	0.760/0.802	1.79
2G-H	Неизвестное 2	1.032/1.039	2.35
3A-B	Неизвестное 3	1.878/1.889	4.29

Стандартная кривая

Типичная стандартная кривая указана ниже. Не использовать эту кривую для определения фактических результатов анализа.



Коэффициент преобразования
1 мкг соответствует 174 пмоль:

мкг/л	0.15	0.4	1	3	5.5
пмоль/л	26	70	174	523	960

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Ограничения проведения

Чрезвычайно липемические, иктерические или гемолизированные образцы не влияют на анализ.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Квалифицированная практика рекомендует, чтобы каждая лаборатория устанавливала свой собственный ожидаемый диапазон значений.

12. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

12.1 Предел чувствительности

Предел чувствительности - 0.07 мкг/л, рассчитан как два среднеквадратичных отклонения выше нулевого стандарта.

12.2 Восстановление

Восстановление после добавления - 97 %.

12.3 «Хук-эффект»

Образцы с концентрацией по крайней мере до 576 мкг/л могут быть измерены без ошибочно низких результатов.

12.4 Точность

Каждый образец был проанализирован в 4 репликатах в восьми различных процедурах.

Образец	Среднее значение мкг/л	Коэффициент вариации		Суммарно в анализе %
		В анализе %	Между анализами %	
1	0,613	3,3	2,0	3,9
2	1,181	3,4	1,2	3,6
3	3,321	3,1	2,2	3,8

13. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

С -пептид, человеческий	<0.05 %
Проинсулин, человеческий	71 %
Человеческий инсулин	120 %
Инсулин lispro (Humalog@Eli Lilly)	120 %
IgFI < 0.02 %	< 0.02
IgFII < 0.02 %	< 0.02
Инсулин миши	80 %
Инсулин овцы	157 %
Инсулин быка	64 %
Инсулин свиньи	463 %

ГАРАНТИЯ

Данные проведения, представленные в этой инструкции были получены использованием указанной процедуры. Любая замена или изменение процедуры, не рекомендуемая ДРГ может повлиять на результаты, в случае чего ДРГ отказывается от всех обусловленных гарантий, подразумеваемых или предусмотренных законодательством, включая подразумеваемую гарантию товарной пригодности и пригодности для использования. В этом случае ДРГ и ее уполномоченные дистрибьюторы не должны нести ответственность за косвенный или последующий ущерб.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com