

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИМІРУ РІВНЯ ТТГ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ

RTC007R, Rat Thyroid Stimulating Hormone ELISA

Каталог. №: **RTC007R**

Методика від **07-07-2015**

Кількість : **96**

Версія **001.A**

Виробник : **BioVendor (Німеччина-Чехія)**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадатим.

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

BioVendor Щурячий ТТГ ІФА – це імуноферментний набір для кількісного виміру рівня ТТГ в сироватці крові щурів. Тільки для дослідницьких цілей. Не для використання в діагностичних процедурах.

2. ЗБЕРІГАННЯ, ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

При зберіганні при температурі від 2 °С до 8 °С всі реагенти стабільні до закінчення терміну придатності або 30 днів після відкриття. Стоп розчин стабільний до 2 місяців після відкриття, або до закінчення терміну придатності. Промивний розчин стабільний протягом 3 місяців після розведення або до закінчення терміну придатності. Калібратори зберігайте в холодильнику, вони будуть стабільні при 2-8 °С протягом 7 днів після відновлення або до закінчення терміну придатності. Для більш тривалого зберігання заморозити при -20 °С. Захищати подільний мікропланшет від вологи. Зберігати разом з осушувачем і ретельно упакований в пластиковий мішок. Захищати розчин ТМВ-субстрату від світла.

3. ВСТУП (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

4. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Тестовий набір є твердофазним імуноферментним аналізом (ІФА) у форматі мікропланшета, призначений для кількісного визначення ТТГ у сироватці щурів. Мікропланшет покритий моноклональним антитілом, специфічним до ТТГ. Калібратори і зразки піпетуються в мікропланшети, покриті антитілами. Потім додаються поліклональні антитіла, мічені пероксидазою хрому. Під час 18-20 годин інкубації при 4 °С формуються сандвіч-комплекси, що складаються з двох антитіл і ТТГ щурів. Нерактивні компоненти видаляються під час стадії промивки. Хромогенний субстрат, ТМВ (3,3', 5,5'-тетра-метил-бензидин), додають в усі лунки. Під час 30-хвилинної інкубації субстрат перетворюється на кольоровий кінцевий продукт (синій) фіксованим ферментом. Ферментативну реакцію зупиняють додаванням соляної кислоти в якості стоп-розчину (зміна від синього до жовтого). Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації щурячого ТТГ, присутнього у зразку. Оптичну щільність кольорового розчину вимірюють за допомогою мікропланшетного рідера при 450 нм. Рекоменується біхроматичне вимірювання з референсним фільтром 600-690 нм.

5. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Тільки для професійного використання
- Перед початком аналізу уважно прочитайте інструкцію. Використовуйте дійсну версію, що входить до набору. Впевніться, що все зрозуміло.
- Не змішуйте реагенти різних лотів. Не використовуйте прострочені реагенти.
- Планшет складається зі смужок, які відламуються. Невикористані лунки повинні зберігатися при 2-8 °С в герметичній упаковці з фольги і використовуватись з тримачем.
- Уникайте контакту зі стоп-розчином. Це може викликати подразнення шкіри і опіки.
- Піпетування проб і реагентів проводити якнайшвидше і в тій же послідовності для кожного кроку.
- Проводити заміну піпеток між зразками та реагентами, щоб уникнути перенесення забруднення.
- Використовуйте тільки резервуари для одиночних реагентів. Це особливо відноситься до резервуарів з субстратами. Використання резервуара для дозування розчину субстрату,

який раніше був використаний для розчину кон'югату, може привести до забарвлення розчину. Не вливайте реагенти назад у флакон, оскільки може відбуватися забруднення.

- Змішуйте вміст мікропланшета повністю, щоб забезпечити належні результати тестування. Не використовуйте мікролунки повторно.
- Не дозволяйте лункам висихати під час аналізу; додавайте реагенти негайно після завершення стадії промивки.
- Аналітичні реагенти містять Тімеросал проти росту мікробів. У разі контакту зі шкірою або очима, негайно промийте водою.
- Всі реагенти повинні бути при кімнатній температурі (21-26 °С) перед використанням. Температура буде впливати на показання абсорбції аналізу. Тим не менш, значення для зразків пацієнтів не будуть порушені.
- ТМВ субстрат має подразнюючу дію на шкіру і слизову оболонку. У разі контакту зі шкірою або очима, ретельно промийте водою. Будь ласка, зверніть увагу, що різкі зміни температури можуть призвести до спонтанного розпаду перекису.

6. ТЕХНІЧНІ ПОРАДИ

- Всі реагенти і зразки повинні бути кімнатної температури перед використанням. Всі реагенти повинні бути перемішані без утворення піни.
- Після того, як тест був запущений, всі кроки повинні бути завершені без перерв.
- Використовуйте нові пластикові піпетки для кожного стандарту і зразка для того, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Абсорбція є функцією часу інкубації і температури. Перед початком аналізу, рекомендується підготувати всі реагенти, зняти кришки, встановити лунки закріплені в тримачі, і т.д. Це забезпечить рівномірний розподіл часу для кожного етапу піпетування без перерви.
- Як правило, ферментна реакція лінійно пропорційна часу і температурі.
- Для внутрішнього контролю якості ми рекомендуємо використовувати **Контрольний набір кодований RTC900R. Для отримання більш детальної інформації, будь ласка, зв'яжіться з BioVendor.**

7. РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. **Мікротитрувальний планшет**, 12 x 8 смужок (смужки, що відламуються) з 96 лунками, готовими до використання; Лунки покриті моноклональним антитілом ТТГ.
2. **Основний Калібратор Щурячого ТТГ**, 1 флакон, 80 нг, ліофілізований, в буферній матриці, що містить високо очищений ТТГ щурів, **Щодо відновлення див. "Підготовка реагентів"**.
3. **Мічені ферментом анти щурячий антитіла ТТГ**, 1 флакон, 22 мл, червоний, готовий до використання; містить поліклональні анти ТТГ антитіла (козячі), мічені пероксидазою хрому, в буферному розчині з консервантом.
4. **Розчин субстрату ТМВ**, 1 флакон, 22 мл кожен, готові до використання; містить тетраметилбензидин (ТМБ) і перекис водню в забуференій матриці.
5. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 7 мл, готовий до використання; містить 2 М розчину соляної кислоти.
6. **Концентрат промивного буфера**, 1 флакон, 50 мл (10X концентрований); см "Підготовка реагентів".
7. **Калібратор ТТГ щура/розчинник зразків**, 1 флакон, 6 мл, готовий до використання.
8. **Плівка для накривання**

8. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Центрифуга
- Мікропланшетний рідер для кінцевого вимірювання при 450 нм
- Вортексний міксер
- Калібровані мікропіпетки змінної точності (25 мкл, 50 мкл, 100 мкл, 200 мкл і 1000 мкл)
- Пробірки для підготовки стандартних розведень
- Абсорбуючий папір
- Дистильована або деіонізована вода
- Таймер
- Напівлогарифмічний папір або програмне забезпечення для обробки даних

9. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Всі реагенти повинні бути доведені до кімнатної температури перед використанням.

Калібратори:

Відновити ліофілізований Щурячий ТТГ Основний Калібратор з **1 мл дистильованої води** за 30 хвилин перед використанням (кінцева концентрація 80 нг/мл). Провести серію розведень з Калібратором/

Розчинником для зразків, щоб отримати калібратори 80, 40, 20, 10, 5 і 2,5 нг/мл.

Розчин для промивки:

Розвести 50 мл 10X концентрованого промивного розчину з 450 мл деіонізованої води до кінцевого об'єму 500 мл.
Розведений промивний розчин стабільний протягом принаймні 3 місяців при кімнатній температурі.

10. ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Для визначення ТТГ шура сироватка є кращою матрицею зразка. Процедура вимагає 25 мкл матриці на лунку. Зразки можуть зберігатися в холодильнику при температурі 2-8 °C протягом одного тижня або до 2 місяців замороженими при -20 °C. Щоб уникнути повторного відтавання і заморожування зразки слід аліквотувати. Зразки з очікуваною концентрацією ТТГ шура вище, ніж найвищий калібратор (80 нг/мл) необхідно розвести з нульовим калібратором перед дослідженням. Додаткове розбавлення необхідно враховувати при розрахунку результатів.

11. ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

Кожен прогін повинен включати стандартну криву.

1. Підготуйте достатню кількість смужок для розміщення калібраторів і зразків в дублікатах.
2. Підготовка калібраторів. Помітити п'ять пробірок: F (40 нг/мл), E (20 нг/мл), D (10 нг/мл), C (5 нг/мл) і B (2,5 нг/мл). Внесіть **0,1 мл** Калібратора/Розчинника для зразків у всі пробірки. Внесіть 0,1 мл відновленого Основного Калібратора шурячого ТТГ в пробірку F (40 нг/мл), і ретельно перемішайте. Повторіть цей процес послідовно, щоб завершити серію розбавлень в 2 рази. Відновлений Шурячий ТТГ калібратор буде служити в якості найвищого калібратора G (80 нг/мл). Використовуйте Шурячий ТТГ Калібратор/Розчинник для зразків в якості нульового калібратора A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	A	E	P2	P..								
b	A	E	P2	P..								
c	B	F	P3									
d	B	F	P3									
e	C	G	P4									
f	C	G	P4									
g	D	P1	P5									
h	D	P1	P5									

3. Внесіть **25 мкл** кожного калібратора, контролю та зразка в підготовлені лунки.
4. Додайте **200 мкл Анти-Шурячих ТТГ Антитіл, Мічених Ферментом**, у всі лунки.
5. Інкубуйте протягом **18-20 годин при 4 °C**.
6. Видаліть вміст лунок і промийте **4 рази з 300 мкл буферного промивного розчину**. Видаліть стільки промивного розчину, як це можливо, ретельно постукуючи планшетом.
7. Додайте **200 мкл ТМВ/розчину субстрату** в усі лунки.
8. Витримайте протягом **30 хвилин** у темряві.
9. Додайте **50 мкл Стоп-Розчину** в кожен лунку і ретельно перемішайте.
10. Зчитайте оптичну щільність при 450 нм. Рекомендується біхроматичне вимірювання з референсною довжиною хвилі 600-690 нм.

Отримане забарвлення стабільне протягом принаймні 15 хвилин. Зчитати оптичні щільності протягом цього часу.

12. РОЗРАХУНКИ

1. Розрахувати середні значення абсорбції для кожного набору калібраторів, контролів та зразків.
2. При використанні напівлогарифмічного міліметрового паперу, побудувати стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію, отриману від кожного стандарту, проти його концентрації зі значенням оптичної щільності на вертикальній (Y) осі і концентрації на горизонтальній (X) осі.
3. Використовуючи середнє значення абсорбції для кожного зразка, визначити відповідну концентрацію з калібрувальної кривої.
4. Автоматичний метод: Рекомендується використання Комп'ютерних програм, що використовують кубічний сплайн, 4 PL (4 параметри логістики) або logit-log.
5. Концентрація зразків може бути визначена безпосередньо з цієї

калібрувальної кривої. Зразки з концентрацією вище, ніж у самого високого калібратора? повинні бути додатково розбавлені. При розрахунку концентрацій необхідно враховувати цей фактор розбавлення.

Приклад типової калібрувальної кривої

Наступні дані призначені тільки для ілюстрації і не повинні бути використані для обчислення результатів аналізу.

Standard	Absorbance Units
Calibrator A (0 ng/ml)	0.075
Calibrator B (2.5 ng/ml)	0.191
Calibrator C (5 ng/ml)	0.283
Calibrator D (10 ng/ml)	0.514
Calibrator E (20 ng/ml)	0.983
Calibrator F (40 ng/ml)	1.935
Calibrator G (80 ng/ml)	3.657

13. ОБМЕЖЕННЯ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу виконується з повним розумінням інструкції і з дотриманням належної лабораторної практики. Будь-яке неправильне поводження зі зразками або модифікація даного тесту може вплинути на результати.

13.1 Вплив ліків

Досі не відомі речовини (наркотики), що впливають на вимірювання ТТГ в сироватці крові шура або миші. Ліпемічні і гемолізовані зразки можуть викликати помилкові результати.

14. ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Чутливість

Найнижчий аналітичний рівень ТТГ, який визначається і відрізняється від нульового калібратора становить 0,1 нг/мл при довірчій межі 2SD.

14.2 Специфічність

Наступні матеріали були оцінені на перехресну реактивність при 10 нг/мл. Відсоток вказує на перехресну реактивність при 50% зміщення в порівнянні з ТТГ.

Steroid	% Cross reaction
Rat LH	n.d.
Rat FSH	n.d.

14.3 Відтворюваність

14.3.1 В аналізі (n = 20)

Варіація всередині аналізу була визначена 20 повторними вимірюваннями 6 зразків сироватки протягом одного прогону. Дані відтворюваності в аналізі показані нижче:

Середнє (нг/мл)	12.38	26.04	40.55	1.28	2.51	6.77
SD	0.37	0.97	1.52	0.16	0.22	0.40
CV (%)	3.0%	3.7%	3.8%	12.4%	8.8%	5.9%

14.3.2 між аналізами (n = 9)

Між тестова (між-аналізами) варіація 3 зразків сироватки визначалась в 9 різних аналізах.

Середнє (нг/мл)	9.47	20.92	34.28
SD	0.79	1.34	1.82
CV (%)	8.3	6.4	5.3

14.4 Відновлення

З використанням Матриці калібратора три насичених розчини були приготовлені (A = 560 нг/мл, B = 280 нг/мл і C = 140 нг/мл). 50 мкл аліквоту кожного розчину ввели в 950 мкл трьох різних сироваток, при співвідношенні від 1 до 19, в результаті чого сироваткова матриця насичених зразків залишається майже недоторканою. Всі зразки потім були аналізовані за допомогою даного набору. Для розрахунку очікуваних значень 95% значень ненасичених зразків були додані до 5% концентрацій насичених розчинів.

Сироватка	Насичений розчин	Отримане	Очікуване	От/Оч (%)
4	-	0.9	-	-
	A	25.8	28.9	89
	B	11.9	14.9	80
	C	6.3	7.9	80

5	-	0.9	-	-
	A	27.3	28.9	94
	B	12.1	14.9	81
	C	6.4	7.9	81
6	-	1.0	-	-
	A	23.9	29.0	82
	B	11.1	15.0	74
	C	6.2	8.0	78

14.5 Лінійність

3 зразки сироватки аналізували в нерозбавленому та розбавленому вигляді з матрицею калібратора.

Сироватка	Розведення	Отримане	Очікуване	От/Оч (%)
1	--	24.39	-	-
	1:2	13.46	12.20	110.3
	1:4	6.41	6.10	105.1
	1:8	3.34	3.05	109.5
2	--	14.86	-	-
	1:2	8.48	7.43	114.1
	1:4	3.90	3.72	104.8
	1:8	2.12	1.86	114.0
3	--	35.68	-	-
	1:2	19.35	17.84	108.5
	1:4	9.64	8.92	108.1
	1:8	4.90	4.46	109.9

15. ОЧІКУВАНІ НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

Для того щоб визначити нормальний діапазон ТТГ сироватки у щурів, зразки самців і самок щурів були зібрані та проаналізовані з використанням набору BioVendor Щурячий ТТГ ELISA. Наступні діапазони розраховані з результатами цього дослідження.

Rat	Sex	N	Range (ng/ml)
Wistar	Female	49	0.85 – 3.23
Sprague-Dawley	Female	6	0.85 – 2.38
Sprague-Dawley	Male	6	2.44 – 9.14

Рекомендується в кожній лабораторії встановлювати свої діапазони нормальних значень, так як рівень ТТГ може варіюватися залежно від методів обробки та відбору проб.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Черновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com