



## 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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 (NaN<sub>3</sub>) 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
- 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.

<b>Покрытый планшет</b> (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.			
<b>Стандарты</b> (инсулин крысы) 0.15; 0.4, 1.0; 3.0 и 5.5 мкг/л	5 флаконов	1.0 мл	Готовый к использованию
<b>Нулевой стандарт</b> Помечен желтым цветом	1 флакон	5 мл	Готовый к использованию
<b>Ферментный конъюгат 11 X</b> (мышинный моноклональный анти-инсулин, конъюгированный пероксидазой, 4.4 мкг/л)	1 флакон	600 мкл	Подготовка, см. ниже
<b>Буфер ферментного конъюгата</b> Помечен синим цветом	1 флакон	6 мл	Готовый к использованию

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

### 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

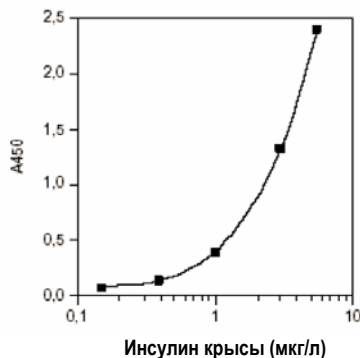
1. Вывести значения абсорбции, полученные для стандартов, кроме нулевого стандарта, против концентрации инсулина на логарифмической или линейно-логарифмической бумаге и постройте калибровочную кривую.
2. Считать из калибровочной кривой концентрацию неизвестных образцов.

### Пример результатов

Средние лунки	Название	A <sub>450</sub>	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 &lt;0.05 %

Проинсулин, человеческий 71 %

Человеческий инсулин 120 %

Инсулин lispro (Humalog@Eli Lilly) 120 %

IgFI &lt; 0.02 %

IgFII &lt; 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](mailto:info@diameb.com)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)