

Verwendungszweck

Der CellTrend IgA(Rind)-ELISA ermöglicht eine quantitative Bestimmung von bovinem IgA in komplexen Proben. Durch das immunologische Nachweisverfahren kann bovines IgA auch in Gegenwart anderer Proteine, z. B. IgA anderer Spezies, spezifisch nachgewiesen werden.

Anwendungsmöglichkeiten sind z. B. die Bestimmung von IgA in Rinderproben wie Serum, Milch und Kolostrum.

Testprinzip

Die IgA-Bestimmung wird als direkter Sandwich-ELISA durchgeführt. Die Mikrotiterplatte ist mit einem anti-IgA(bovin)-Antikörper beschichtet, an den sich während der ersten Inkubation bovines IgA bindet. Anschließend wird das IgA durch einen Peroxidase-markierten zweiten Antikörper detektiert. Durch eine Farbreaktion wird die Menge an gebundenem Antikörper bestimmt. Die Farbintensität bei 450 nm ist direkt proportional der IgA-Konzentration in der Probe.

Wichtige Hinweise

Testkit bei 2-8 °C lagern.

Nur für Forschungszwecke.

Nur zur in vitro-Bestimmung.

Die Reagenzien nach dem Verfalldatum nicht mehr benutzen. Das Verfalldatum ist auf der Verpackung angegeben.

Vor Gebrauch diese Gebrauchsinformation sorgfältig durchlesen.

Nur Reagenzien einer Charge verwenden.

Die Reagenzien enthalten Konservierungsmittel, daher Berührung mit der Haut oder Schleimhaut vermeiden.

Die Stopplösung enthält Schwefelsäure. Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen. Bei Kontakt mit den

Augen sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

Zusätzlich erforderliche Chemikalien und Geräte

Destilliertes oder deionisiertes Wasser
Meßzylinder
Mikropipetten (Mehrkanalpipette, Multipette)
Wirbelmischer (Vortex)
Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm Wellenlänge

Vorbereitung der Reagenzien und Proben

- Vor Testbeginn alle Komponenten auf Raumtemperatur bringen, evtl. auskristallisierte Salze der Pufferkonzentrate in Lösung bringen.

- Die Kavitäten der Mikrotiter-Module können durch Abbrechen genau dem Bedarf angepaßt werden. Nicht benutzte Module sind zusammen mit dem Trockenbeutel in der wiederverschließbaren Originalverpackung stets gut verschlossen bei 2-8 °C zu lagern.

- Das Waschpuffer-Konzentrat ist vor Gebrauch mit destilliertem Wasser **1:10** zu verdünnen (z. B. 40 ml + 360 ml Wasser). Die gebrauchsfertige Waschlösung ist bei 2-8 °C mindestens 30 Tage haltbar.

- Aus dem Standardkonzentrat wird durch eine 1:2-Verdünnungsreihe mit Verdünnungspuffer (z. B. 250 µl + 250 µl Puffer) die Standardkurve erhalten:

	Herstellung	Konz. ng/ml
Standard 7	Standard-Konz. unverdünnt	1000,000
Standard 6	Std. 7 1:2 verd.	500,000
Standard 5	Std. 6 1:2 verd.	250,000
Standard 4	Std. 5 1:2 verd.	125,000
Standard 3	Std. 4 1:2 verd.	62,500
Standard 2	Std. 3 1:2 verd.	31,250
Standard 1	Std. 2 1:2 verd.	15,625

- Die Proteinproben mit Verdünnungspuffer verdünnen. Der Verdünnungsfaktor richtet sich nach dem vermuteten IgA(Rind)-Gehalt und sollte so gewählt werden, dass ein Messwert innerhalb der Standardkurve erzielt wird. Bei unbekanntem Proben hat sich eine 1:100-Verdünnung (z. B. 5 µl Probe + 495 µl Puffer) bewährt. Um Matrixeffekte auszuschließen, sollten die Proben mindestens 1:50 verdünnt werden.

Testdurchführung

Wir empfehlen, alle Werte in Doppelbestimmungen durchzuführen.

1. Je 100 µl der Standardreihe, Probenverdünnungen oder Verdünnungspuffer (Negativkontrolle/Blank) in die jeweiligen Wells pipettieren.
2. Bei Raumtemperatur (18-26 °C) 1 Stunde mit Schütteln* inkubieren, die Wells dabei mit der Klebefolie abdecken.
3. Die Kavitäten durch Ausschlagen entleeren und 3 mal mit je 300 µl Waschpuffer waschen, Pufferreste durch Ausschlagen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
4. Jeweils 100 µl Peroxidasekonjugat in die Kavitäten pipettieren.
5. Bei Raumtemperatur 1 Stunde mit Schütteln* inkubieren, die Wells dabei mit der Klebefolie abdecken.
6. Waschen wie bei 3. beschrieben.
7. Jeweils 100 µl TMB-Substratlösung in die Kavitäten pipettieren.
8. Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur 10 Minuten im Dunkeln inkubieren.
9. 100 µl Stopplösung in jedes Well pipettieren.
10. Messung der optischen Dichte im Photometer bei 450 nm (möglichst Messung mit einer Referenzwellenlänge von 620-690 nm). Die Färbung der Lösung ist mindestens 30 Minuten stabil. In dieser Zeit sollte gemessen werden.

*: Wenn kein MTP-Schüttler zur Verfügung steht, kann auch jeweils 2 Stunden ohne Schütteln inkubiert werden.

Auswertung

Zur Auswertung des Tests ist eine Computer-ELISA-Software zur Kurvenanpassung der Standardpunkte hilfreich. Empfohlen wird eine 4-Parameter-Anpassung bei halb-logarithmischer Darstellung (lineare Auftragung von optischer Dichte (y-Achse) und logarithmischer Auftragung der Konzentration (x-Achse)). Daneben ist auch eine manuelle Auswertung auf semi-logarithmischem Papier möglich. Die IgA-Konzentrationen werden aus der Standardkurve abgelesen.

Die aus der Standardkurve errechneten Konzentrationen müssen mit dem Verdünnungsfaktor der Probenverdünnung multipliziert werden. Liegen die Meßwerte außerhalb der Standardkurve, kann in einer nachfolgenden Bestimmung mit einer veränderten Probenverdünnung (z. B. 10fach höherer Verdünnungsfaktor bei Meßwerten oberhalb von Standard 7) ein geeigneter Meßwert erzielt werden.

Bestandteile der Testpackung:

Packungsgröße/Bestellnummer	1x96 Best.
Mikrotiter-Module, Antikörper-beschichtet	12 x 8
Waschpuffer, 10fach konz. ◆	50 ml
Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig ◆	100 ml
Standardkonzentrat ◆	2 ml
Anti-IgA-Ak, Peroxidasekonjugat, gebrauchsfertig	12 ml
TMB-Substrat, gebrauchsfertig	12 ml
Stopplösung, gebrauchsfertig (0,5 M Schwefelsäure)	12 ml

◆ : enthält Thiomersal

Kurzanleitung:

A. Vorbereitung

1. Reagenzien auf Raumtemperatur bringen
2. Waschpuffer 1:10 verdünnen
3. Standardreihe aus Standard-Konzentrat in 1:2-Schritten mit Verdünnungspuffer verdünnen
4. Proben mit Verdünnungspuffer verdünnen

B. Durchführung

1. Je 100 µl verdünnte Probe/Standards/Verdünnungspuffer pipettieren
2. 1 h bei Raumtemperatur mit Schütteln inkubieren
3. 3 mal mit je 300 µl Waschpuffer waschen
4. Je 100 µl Peroxidase-Konjugat zugeben
5. 1 h bei Raumtemperatur mit Schütteln inkubieren
6. 3 mal mit je 300 µl Waschpuffer waschen
7. 100 µl Substratlösung pipettieren
8. 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
9. 100 µl Stopplösung zugeben
10. Absorption bei 450 nm messen

Weitere Produkte:

ELISA zur quantitativen Bestimmung von Rinderserumalbumin, Bestell-Nr.: 50300

ELISA zur quantitativen Bestimmung von IgG(bovine), Bestell-Nr.: 51200

Bestimmung von IgA (bovine) in Kundenproben Dienstleistung im CellTrend-Labor (auf Anfrage)

Version 01-01/2008

Gebrauchsinformation

ELISA zur quantitativen Bestimmung von bovinem IgA

Bestell-Nr.: 61400



CellTrend GmbH

Im Biotechnologiepark
D-14943 Luckenwalde
Tel.: 03371 / 681 290
FAX: 03371 / 681 312
Email: info@CellTrend.de