

PROGESTERON BEPALING

De OvuCheck Plasma EIA Kit is gebaseerd op de competitieve binding tussen het vrije progesteron in het sample en het gebonden (met Alkalisch Fosfatase) progesteron in het conjugaat reagens. Beide progesterons gaan een competitie aan met antistoffen tegen progesteron die gecoat zijn in de welletjes. Na de incubatie periode van 30 minuten kunnen alle storende NIET gebonden componenten uitgewassen worden.

Door toevoeging van substraat (para-Nitrophenylfosfaat = pNPP), zal de reactie gaan starten. Onder invloed van Alkalisch fosfatase, gebonden aan progesteron, zal pNPP omgezet worden in para-nitrophenol, wat een gele kleur heeft. De hoogte van de concentratie in het plasma van de patiënt is dus omgekeerd evenredig met de kleurintensiteit (extinctie)

1. Substraat uit de diepvries halen indien voorradig
2. Microtiterplaat uit de verpakking halen, **onderkant niet aanraken**, (moet schoon blijven)
3. 4 welletjes zijn er nodig voor standaard serum, 2 welletjes voor elk monster (in duplo), de overige welletjes die niet gebruikt worden moeten afgedekt worden met de bijgeleverde dekseltjes.

A	O	Standaard 1,0
B	O	Standaard 2,5
C	O	Standaard 5,0
D	O	Standaard 10,0
E	O	Monster 1
F	O	Monster 1
G	O	Monster 2
H	O	Monster 2
4. Pipetteer na omzwenken 10 µl van elke vloeistof in de welletjes volgens bovenstaand schema.
5. Pipetteer 200 µl conjugaat in elk welletje.
6. Afdekken met een schoon papiertje en ongeveer 30 minuten (kookwekker) laten staan.
7. Indien geen substraat voorradig was, **dit nu maken**: In 8 ml substraat + 1 tablet oplossen in een schone reageerbuis. (tablet **NIET** met de vingers aanraken!!)
8. Welletjes legen en 3 x onder een zachte waterstraal uitspoelen, dan droogslaan op een tissue (beslist **niet** uitdrogen).
9. Voeg 200 µl substraat toe.
10. Opnieuw afdekken.
11. DAS Stripreader aan zetten.
12. Na 15 minuten (stopwatch) controleren hoe hoog de kleurintensiteit van well A is met behulp van de Stripreader.
13. Bij een waarde tussen de 1,3 en de 1,4 van welletje A, 100 µl Stopping Buffer in alle welletjes doen.
14. Dan alle welletjes meten met de Stripreader. Telkens 1 keer doorschuiven en iedere keer op read/enter drukken (2x).
15. De Stripreader maakt zelf een standaardlijn waarop de gemeten patiënten samples op afgelezen worden. De Stripreader geeft dus direct een uitslag bij de gemeten patiënten.
16. Het nieuw gemaakte substraat uitverdelen over 4 reageerbuisjes en invriezen met datum en lotnummer erop.

Theorie van de bepaling:



Progesteron zoals het in het sample aanwezig is

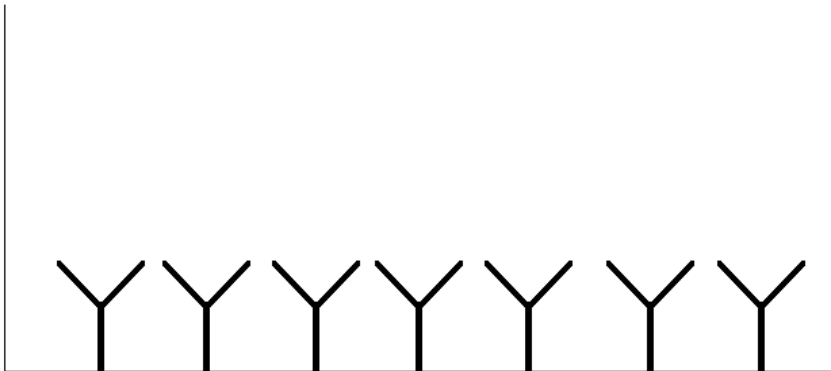


Antistof tegen Progesteron gecoat aan de well

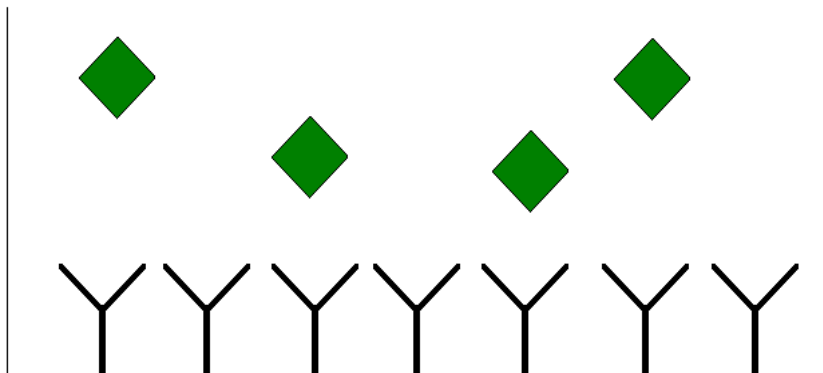


Progesteron met daaraan gekoppeld Alkalisch Fosfatase zoals dat aanwezig is in het substraat

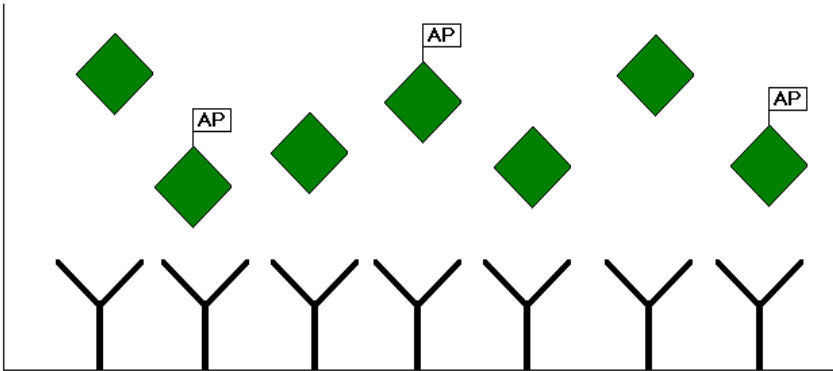
1^e De nog ongebruikte welletjes:



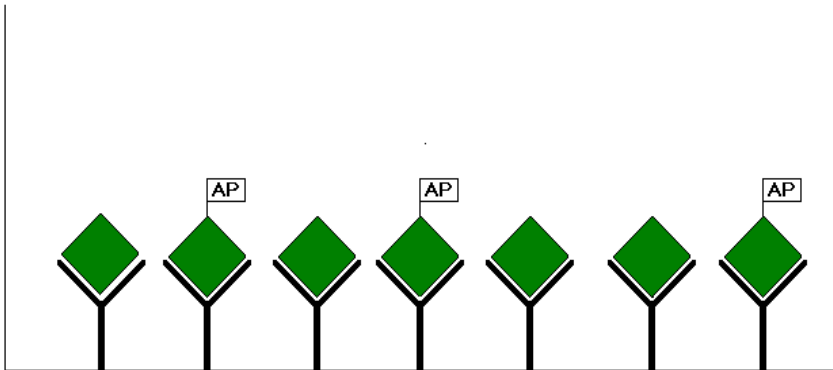
2^e Toevoegen van 10 µl sample:



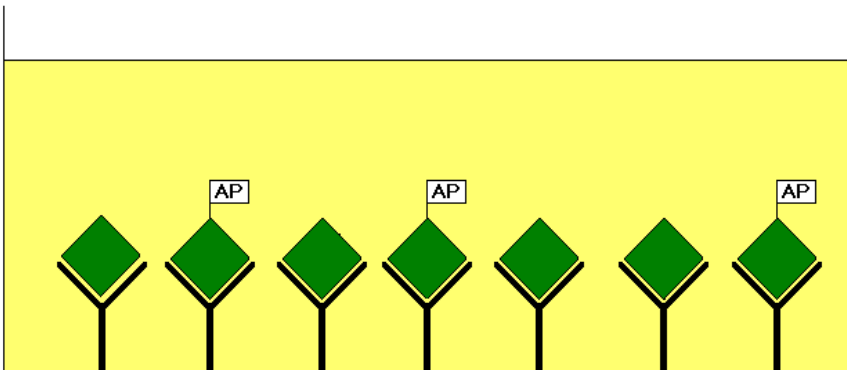
3^e Toevoeging van 200 μ l Conjugaat



4^e Na de incubatie tijd:



5^e Na wassen en toevoeging van Substraat:



De kleurintensiteit is omgekeerd evenredig met de concentratie progesteron in het sample

DAS STRIP READER

1. DAS Stripreader **aanzetten** met de aan/uit knop aan de achterzijde van het apparaat.
2. Druk op **F1** [ANALYSIS]
3. Het toestel warmt nu op gedurende ca 15 minuten. Op het beeldscherm verschijnt: [WARM-UP 14:50]
4. Plaats de strip in het apparaat met de laagste standaard (0,5) naar links
5. Druk op **F2** [OD only]
6. Er verschijnt: [PRIM FILTER 405]. Druk nu op **ENTER**.
7. Er verschijnt [SEC. FILTER: NO] Druk nu op **ENTER**.
8. Druk nu op **F1** [run] en de strip wordt gelezen en vervolgens geprint.