**Kitlerin çalışma protokolleri**

**TAS çalışma adımları:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Çalışma adımları:

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 300 μl alındı, numuneden 18 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 660nm yapıldı ardından reaktif 2’den 45 μl karıştırıldı ve inkübatörde 5 dakika bekletilip ikinci okuma 660nm yapıldı.

Reagent 1 Buffer Solution

Acetate Buffer 0.4 mol/L pH5.8

Reagent 2 Prochromogen Solution

ABTS 30 mmol/L

**TOS çalışma adımları:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Çalışma adımları:

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 300 μl alındı, numuneden 45 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 530nm yapıldı ardından reaktif 2’den 15 μl karıştırıldı ve inkübatörde 5 dakika bekletilip ikinci okuma 530nm yapıldı.

Reagent 1 Buffer Solution

H2SO4 25mM pH1.75

Reagent 2 Substrate Solution

H2SO4

Ferrous ion

O-dianisidine 25mM pH1.75

5 mM

10nM

**SOD çalışma adımları:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 150 μl alındı, numuneden 4 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 505nm yapıldı ardından reaktif 2’den 20 μl karıştırıldı ve inkübatörde 3 dakika bekletilip ikinci okuma 505nm yapıldı.

R1. Mixed Substrate

R2. Xanthine Oxidase

**Gpx çalışma adımları:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 250 μl alındı, numuneden 5 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 60 saniye sonra ilk okuma 340nm yapıldı ardından reaktif 2’den 10 μl karıştırıldı ve inkübatörde 2 dakika bekletilip ikinci okuma 340nm yapıldı.

R1.Buffer

R2.Cumene Hydroperoxide

**Catalase:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 150 μl alındı, numuneden 8.5 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 505nm yapıldı ardından reaktif 2’den 125 μl karıştırıldı ve inkübasyonda 5 dakika bekletilip ikinci okuma 505nm yapıldı.

R1. Buffered Substrate Solution

R2. Stopper and Chromogen Solution

**MDA:**

1- Serum veya plazmadan( veya homojenizattan) 250 uL alınır.

2- Üzerine R1'den 250 uL konulur.

3- Onunda üzerine R3'ten 50 uL konulur. Vortexlenir.

4- 15 dk oda ısısında bekletilir.

5- Sonra bu tüp 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir.

6- Santrifüjden sonra tüpte iki kısım vardır.

7- Üstte sıvı kısım( supernatan), altta ise prespitat kısım oluşur.

8- Supernatan kısmından pipetle yavaşça 250 Ul alınır, bir cam tüpe aktarılır.

9- Bunun üzerine 250 Ul R2 ilave edilir.1 dk vortexlenir.

10- Etüv 80 dereceye ayarlanır. Tüpler Burada 60 dk inkübasyona bırakılır.

11- 60 dk sonunda tüpler buzlu soğuk suya alınır ve soğutulur.

12- Spektrofotometre cihazıyla her tüp spektro küvetine boşaltılarak absorbansı ölçülür.( Tüplerde oluşan renk pembemsi-sarıdır.)

13- Absorbans 532 nm'de ölçülür.

14- Sarı az miktarda, pembe ise çok miktarı gösterir. Çok yüksekse eflatun bile olabilir.

15- Standart olarak 1-1-3-3 tetra etoksi propan şişesinden 10m.mol'lük standart hazırlanır.

16- Sonuçlar bu kalibratöre göre değerlendirilir.

R1: TCA=Tri clor Asetic Asit

R2: TBA = Tiyo barbutirik asit

R3: Nacı

**IgA:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 150 μl alındı, numuneden 2 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 5 dk sonra ilk okuma 605nm yapıldı ardından reaktif 2’den 38 μl karıştırıldı ve inkübasyonda 5 dakika bekletilip ikinci okuma 605nm yapıldı.

R1. Buffer pH 7.5, PEG > 2% ,stabilizers and preservatives.

R2. IgA antibody >2 % stabilizers and preservatives.

**IgM:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 150 μl alındı, numuneden 2 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 5 dk sonra ilk okuma 340nm yapıldı ardından reaktif 2’den 38 μl karıştırıldı ve inkübasyonda 5 dakika bekletilip ikinci okuma 340nm yapıldı.

R1. Buffer pH 7.50, PEG ≥ 2%, stabilizers and preservatives.

R2. IgM antibody ≥ 2%, stabilizers and preservatives

**HDL:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 150 μl alındı, numuneden 2 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 5 dk sonra ilk okuma 570nm yapıldı ardından reaktif 2’den 50 μl karıştırıldı ve inkübasyonda 5 dakika bekletilip ikinci okuma 570nm yapıldı.

R1:

Good’s buffer, pH 7.0 100 mmol/l

Cholesterol oxidase >0.8 KU/l

Cholesterol esterase >1.0 KU/l

Catalase >500 KU/l

HDCBS 0.5 mmol/l

R2:

Peroxidase 30 KU/l

4-Aminoantipyrine 4 mmol/l

**LDL:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 150 μl alındı, numuneden 2 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 5 dk sonra ilk okuma 570nm yapıldı ardından reaktif 2’den 50 μl karıştırıldı ve inkübasyonda 5 dakika bekletilip ikinci okuma 570nm yapıldı.

R1:

Good’s tampon, pH 7,0 50 mmol/l

Kolesterol oksidaz 500 U/l

Kolesterol esteraz 600 U/l

Katalaz 600 kU/l

Askorbat oksidaz 3 kU/l

TOOS 2 mmol/l

R2:

Peroksidaz 4 kU/l

4-Aminoantipirin 4 mmol/l

**Trigliserid:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 300 μl alındı, numuneden 3 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 505nm yapıldı ardından 5 dk sonra ikinci okuma 505nm yapıldı.

R1:

Pipes 45 mmol/L

magnesium chloride 5 mmol/L

4-chlorophenol 6 mmol/L

lipase > 100 U/mL

glycerol kinase >1.5 U/mL

glycerol-3-phosphate oxidase > 4 U/mL

peroxidase > 0.8 U/mL,

4-aminoantipyrine 0.75 mmol/L

ATP 0.9 mmol/L

pH 7.0

**Albumin:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 300 μl alındı, numuneden 3 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 605nm yapıldı ardından 5 dk sonra ikinci okuma 605nm yapıldı.

R1:

Succinate buffer, pH 4. 1 75 mmol/l

Brij 35 7 ml/l

Detergents and stabilizers

**Total Protein:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 200 μl alındı, numuneden 4 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 546nm yapıldı ardından 5 dk sonra ikinci okuma 546nm yapıldı.

R1:

Sodium hydroxide 550 mmol/l

potassium sodium tartrate 23.4 mmol/l

potassium iodide 13 mmol/I

copper sulfate 20.6 mmol/l

**Glukoz:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 250 μl alındı, numuneden 4 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 546nm yapıldı ardından 5 dk sonra ikinci okuma 546nm yapıldı.

R1:

Phosphate buffer, pH 7.5 0,5 mol/l

Phenol 7,5 mmol/l

GOD 12000 U/l

POD 660 U/l

4-amino-antipyrine 0,40 mmol/l

**Total Kolesterol:**

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 250 μl alındı, numuneden 3 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 540nm yapıldı ardından 5 dk sonra ikinci okuma 540nm yapıldı.

R1:

Pipes buffer, pH 6.9 Phenol 90 mmol/l

Cholesterol oxidase 26 mmol/l

Cholesterol esterase 200 U/l

Peroxidase 1250 U/l

4-Aminoantipyrine 0,4 mmol/l

**Chicken Immunoglobulin G Elisa Assay Procedure:**

1-Prepare all reagents,standard solutıons and samples as instructed.Bring all reagents to room temperature before use.The assay is performed at room temperature.

2-Add 50 ul standard to standard well.(Dont add antibody to standard well because the standard solutions contains biotinylated antibody).

3-Add 40 ul sample to sample wells and then 10 ul anti-IgG antibody to sample wells, then add 50 ul streptavidin-HRP to sample wells and standard wells.(Not blank control well).

4-Cover the plate with a sealer. Incubate 60 minutes at 37 ºc.

5-Remove the sealer and wash the plate 5 times with wash buffer.

6-Add 50 ul substrate solution A to each well and then add 50 ul substrate solution B to each well.

7-Incubate plate covered with a sealer for 10 minutes at 37º C in the dark.

8-Add 50 ul stop solution to each well, the blue color will change into yellow immediately.

9-Determine the optical density(OD) of each well immediately using a microplate reader set to 450 nm within 10 minutes after adding the stop solution.

Components:

1-Standard Solutıon(128ug/ml)

2-Pre-coated ELISA Plate

3-Standard Diluent

4-Streptavidin-HRP

5-Stop Solutıon

6-Substrate Solutıon A

7-Substrate Solutıon B

8-Wash Buffer Concentrate(25x)

9-Biotinylated Chıcken IgG Antibody

10-User Instruction

11-Plate Sealer

12-Zipper bag

**Nitrik Oksit Test Protokolü:**

1-Blank tube: Take 200 ml of distilled water to 1.5 ml ep tubes.

2-Standart tube: Take 200 ml of 40umol/L sodıum nitirite solution to 1.5 ml ep tubes.

3- Sample tubes: Take 200 ml of sample to 1.5 ml ep tubes

4- Add 1.6 ml of reagent 1 and fully with a vortex mixer.

5-Add 0.8 ml of reagent 2 and mix fully with a vortex mixer.

6-Stand for 15 min at room temperature, centrifyge at 3100g for 10 min.

7-Take 1.6 ml off supernatant to corresponding tubes for chromogenic reaction.

8- Add 0.8 ml of chromogenic reagent to each tube, mix fully and stand at room temperature for 20 min.

9-Set the spectrophotometer to zero with distile water and measure the OD values of each tube at 550 nm with 1 cm path cuvette.

|  |
| --- |
| Reagents: |
| Reagent1: Sulphate Solution |
| Reagent 2: Alkali Reagent |
| Reagent 3: Chromogenic Agent A |
| Reagent 4: Choromogenic Agent B |
| Choromogenic Reagent: Reagent 3 + Reagent 4 + Reagent 5 (3:3:2) |
| Reagent 5: Acid Solutıon |
| Reagent 6: 2mmol/L Sodıum Nitrite Standard |

N.O Calculatıon: ΔA1/ΔA2 x c

ΔA1: OD sample-OD blank

ΔA2: OD standard-OD blank

c: concentratıon of sodium nitrite(40umol/L)

STANDARD: 0,045(OD)

BLANK: 0,020 (OD)