

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПЛЕКСА PAI-1 ACTIBIND

TC16075, PAI-1 Actibind ELISA

Каталог. № : TC16075

Методика от 04-2012

Количество : 96

Производитель: **Technoclone,**
(Австрия)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

ОПИСАНИЕ ПРОДУКТА

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор может быть использован для количественного определения уровня активного PAI-1 у пациентов с тромбозными патологиями (тромбоз глубоких вен, острый инфаркт миокарда), злокачественными образованиями или сепсисом.

СОСТАВ НАБОРА

- ELISA стрипы (12): по 8 ячеек каждый, покрытых tPA иммобилизованным через моноклональные анти-tPA покрывающие антитела; в пакете из алюминиевой фольги с осушителем.
- Буфер для промывок, концентрат, (PBS; pH 7.3); содержит детергент; 0.01% мертиолат; 1 флакон, 80 мл.
- Буфер для инкубации (PBS; pH 7.3); содержит белковый стабилизатор; 0.01% тимерозал и зеленый краситель; 1 флакон, 90 мл, готов к использованию.
- Стандарты (калибраторы), пронумерованные; лиофилизированные; по 1 флакону каждого. Концентрации зависят от лота; см. на этикетках флаконов.
- Контрольные плазмы низкого и высокого уровней, для контроля исполнения анализа; по 1 флакону каждой. Концентрация зависит от лота; см. на этикетках флаконов.
- Конъюгат моноклональных анти-PAI-1-POX; окрашен в голубой цвет; 1 флакон, 0.3 мл
- Хромоген TMB, 1 флакон, 12 мл (тетраметилбензидин), готов к использованию.
- Стоп-раствор, 1 флакон, 12 мл, содержит 0.45 моль/л серную кислоту, готов к использованию.
- Адгезивная пленка: для закрывания ELISA стрипов (2).

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ (не поставляемые)

- Дистиллированная вода
- Стеклянные или пластиковые пробирки для разведения стандартов и образцов
- Мерный цилиндр на 1000 мл
- Калиброванные микропипетки объемами (10, 100 и 1000 мкл).
- Пипетки переменного объема (1000 мкл)
- Многоканальные пипетки или диспенсеры (100 и 200 мкл)
- Устройство для автоматического промывания микропланшет микропланшет или многоканальные пипетки.
- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм и длиной волны сравнения, если возможно, 620 нм.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- ✓ Все препараты крови человека или образцы плазмы, а также материалы, содержащие их компоненты, должны быть признаны потенциально инфекционно опасными материалами. С ними необходимо работать с соблюдением соответствующих мер предосторожности и строго соблюдать установленные правила безопасности. Правила их утилизации должны быть такими же, как и правила утилизации принятыми для аналогичных отходов в больнице.
- ✓ Индивидуальные плазмы, использованные для приготовления калибраторов и контрольных плазм, с были признаны отрицательными по HBsAg, антителам к HIV и HCV (см. указания на этикетках флаконов и/или набора).
- ✓ Стоп-раствор (серная кислота) может вызвать раздражение кожи. Если кислота попадет в глаза, немедленно промойте водой и проконсультируйтесь с врачом!

- ✓ Реагенты иногда содержат консерванты (мертиолат). Опасайтесь проглатывания! Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками!

СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ

Срок годности, указанный на наборе, относится к не вскрытым реагентам и компонентам набора, при условии хранения при + 2...8 °C.

Стабильность компонентов после вскрытия указана в таблице:

Материал/реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Калибраторы, контрольные плазмы	После растворения	-20 °C	6 месяцев
ELISA стрипы	После вскрытия	2 ... 8 °C с адгезивной пленкой в пластиковом пакете с осушителем	Срок годности
Концентрат промывочного буфера	После вскрытия	2 ... 8 °C	6 месяцев
Промывочный буфер	1+11.5 разведение концентрата	2 ... 8 °C	3 недели
Инкубационный буфер	После вскрытия	2 ... 8 °C	2 месяца
Конъюгат	После вскрытия	2 ... 8 °C	6 месяцев
	Рабочий раствор	Комнатная температура	60 минут
Хромоген	После вскрытия	2 ... 8 °C	Срок годности

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Материал: плазма

Настоятельно рекомендуется использовать коммерчески доступные пробирки для сбора образцов, содержащие стабилизаторы тромбоцитов, например STAD (Greiner). 90% PAI-1 антигена содержится в тромбоцитах, следовательно, очень важно быть уверенным, что в процессе сбора крови тромбоциты получили повреждения, которые приводят к повышению уровня антигена в плазме. Могут быть использованы цитратная или ЭДТА плазмы. Центрифугируйте 15 минут при не менее чем 2500 g (DIN 58905). Образцы плазмы можно хранить 3 часа при комнатной температуре; если анализ не будет проведен в этот период, образцы требуется заморозить сразу же после центрифугирования. Образцы стабильны при -20°C в течение 6 месяцев.

Не могут быть использованы образцы сыворотки, так как в них наблюдается высокий уровень PAI-1, который имеет тромбоцитарное происхождение. Могут быть использованы Супернатанты клеточных культур и экстракты опухолей, однако данный метод был оптимизирован для образцов плазмы, следовательно, для других образцов должны быть использованы другие соответствующие коэффициенты разведения.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Все реагенты должны достичь комнатной температуры перед использованием.
- Приготовление промывочного буфера: Разведите 1 часть (по объему) концентрата промывочного буфера 11.5 частями дистиллированной воды (1+11.5). Тщательно перемешайте! (Разведенный концентрат промывочного буфера = промывочный буфер). Возможно образование кристаллов, которые растворятся при нагревании до 37°C в течение 10 минут.
- Растворение калибраторов и контрольных плазм: Калибраторы и контроли растворяют в **200 мкл дистиллированной воды**. Перемешивать в течение 10 секунд в период 15 минут после растворения (на вортексе). Растворенные компоненты прозрачные или слегка мутные.
- Приготовление **рабочего раствора конъюгата** (1+50): Разведите 1 часть (по объему) конъюгата 50 частями (по объему) инкубационного буфера.

Для 8 лунок: Смешайте 20 мкл конъюгата и 1000 мкл инкубационного буфера.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Промывка (см. описание 1,3,4)	Промывочный буфер	5 x 200 мкл
Инкубация с образцами (см. описание 1, 2)	Разведенные калибраторы, контрольные плазмы, образцы	25 мкл
	Рабочий раствор конъюгата	75 мкл
	Закрывать стрипы пленкой и инкубировать при 37°C	45 минут
Промывка (см. описание 1,3,4)	Промывочный буфер	5 x 200 мкл
Реакция с субстратом (см. описание 1,2)	Внести раствор субстрата в лунки, закрыть стрипы пленкой	100 мкл
	Инкубировать при комнатной температуре (20 – 25°C)	15 минут
Остановка (см. описание 1,2)	Внести стоп-раствор в лунки.	100 мкл
Измерение (см. описание 5)	ELISA-ридер, 450 нм	Встряхнуть 10 секунд, измерить в течение 10 минут

Замечания:

- Не смешивайте реагенты из наборов различных лотов
- Точность анализа, кроме всего прочего, значительно зависит от следующих факторов:
 - Тщательного перемешивания всех разводимых компонентов
 - Анализируйте калибраторы, контроли и образцы в дублях.
 - Инкубации должны проводиться при указанной температуре
 - Строгое соблюдение порядка пипетирования и указанных периодов времени
 - Время инкубации с образцами, реакции с конъюгатом и субстратом начинается сразу после внесения последнего образца. Время инкубаций не должно варьировать более чем $\pm 10\%$.
 - Во время инкубации с образцами и реакции с конъюгатом, время пипетирования разведенных калибраторов / образцов / контрольных плазм/или раствора конъюгата не должно превышать 60 секунд на ELISA стрип (8 лунок).
 - Во время реакции с субстратом и остановки реакции, время пипетирования субстрата и/или стоп-раствора не должно превышать 10 секунд на ELISA стрип. Короткого времени пипетирования можно достичь при использовании многоканальных пипеток или диспенсеров.
- Подписывайте/номеруйте стрипы несмываемыми водой маркерами, чтобы избежать ошибок во время тестирования.
- После последней промывки жидкость из лунок должна быть тщательно отобрана (с использованием вакуумного насоса), стрипы перевернуты и помещены на фильтровальную бумагу; остатки жидкости удаляют, аккуратно постукивая перевернутыми стрипами по бумаге.
- Измерьте разницу ОП при длинах волн 450 и 620 нм и/или разницу при 450 и 690 нм, это повышает точность теста.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Если в образцах концентрация превышает концентрацию максимальной точки калибровочной кривой, то образец должен быть проанализирован еще раз в большем разведении, так как возможен хук-эффект при высоких концентрациях.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Постройте калибровочную кривую:

Ось X: концентрация активного PAI-1 Ед/мл

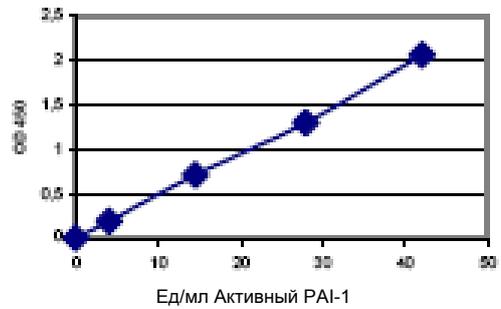
Ось Y: экстинкция

Нарисуйте график в линейных координатах, используя линейное приближение или построение от точки к точке.

Оценка калибровочной кривой:

- Коэффициент экстинкции самого высокого стандарта должен быть между 1.0 и 2.5.
- Достоверность теста может быть проверена на основании подсчета контрольных значений.

Пример калибровочной кривой:



Измерение концентраций в образцах

- Считайте концентрации из калибровочной кривой.
- Если в образцах коэффициент экстинкции превышает коэффициент экстинкции максимальной точки калибровочной кривой, то образец должен быть разведен инкубационным буфером (1:2 или 1:4). Полученная для разведенного образца концентрация должна быть умножена на коэффициент разведения 2 или 4.

КОНТРОЛЬНЫЙ ДИАПАЗОН

Диапазон нормальных значений составляет 1-7 Ед/мл. Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно установить свой собственный диапазон нормальных значений. Уровень активного PAI-1 выше 20 Ед/мл может указывать на снижение фибринолитической способности, и, таким образом, усилению склонности к тромбозам. Измерения должны быть проведены для снижения риска тромбоза у пациентов с повышенным уровнем PAI-1 в плазме. Набор PAI-1 Actibind® ELISA измеряет только свободную, активную форму PAI-1 и на результаты теста не влияют остальные формы PAI-1 или других ингибиторов активаторов плазминогена.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Для калибровки были использованы материалы международных стандартов ВОЗ для ингибитора активатора плазминогена (PAI-1).



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com