

## НАБІР

# ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АПОЛІПОПРОТЕЇНУ В У ЗРАЗКАХ ПЛАЗМИ, СИРОВАТКИ, СМР І СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЛЮДИНИ

## EA7001-1, Human Apolipoprotein B ELISA

Каталог. № : EA7001-1  
Кількість : 96  
Виробник : AssayPro, (США)

Версія 3.9



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні збігатися.

### ВСТУП

Аполіпопротеїн В (АроВ) є домінуючим компонентом білка ЛПНЩ. Рівні АроВ, який секритується, безпосередньо корелюють з рівнями циркулюючого холестерину в крові.

### ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір AssayMax людського Аполіпопротеїну В ELISA призначений для виявлення Аполіпопротеїну В в плазмі, сироватці, СМР і супернатантах клітинних культур людини. Цей аналіз використовує кількісну методику імуноферментного аналізу типу сандвіч, яка вимірює АроВ менш, ніж за 4 години. Поліклональні антитіла, специфічні для АроВ, були попередньо нанесені на мікропланшет. АроВ в стандартах і зразках затиснутий іммобілізованим антитілом і специфічним біотинильованим поліклональним антитілом АроВ, який розпізнається кон'югатом стрептавідин-пероксидази. Всі незв'язані матеріали потім вимиваються і додається субстрат ферменту пероксидази. Розвиток кольору зупиняється, і вимірюється інтенсивність кольору.

### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Цей продукт призначений тільки для дослідницьких цілей і не призначений для використання в діагностичних процедурах.
- Підготувати все реагенти (робочий буфер для розведення, промивний буфер, стандарт, біотинильоване антитіло і SP-кон'югат) відповідно до інструкції, перед запуском тесту.
- Підготуйте всі зразки до проведення аналізу. Коефіцієнт розбавлення для зразків вказаний в цьому Протоколі. Тим не менш, користувач повинен самостійно визначити оптимальний коефіцієнт розведення.
- Осадити частинки у флаконі SP-кон'югату і у флаконі біотинильованих антитіл перед їх відкриттям і використанням.
- Стоп розчин є кислим розчином.
- Набір не слід використовувати після закінчення терміну придатності.

### РЕАГЕНТИ

- Мікропланшет Людського АроВ:** 96-луноковий полістироловий мікропланшет (12 стрипів по 8 лунок), покритий поліклональними антитілами до АроВ.
- Ущільнювальні стрічки:** Кожен комплект містить 3 нарізані, чутливі до тиску стрічки ущільнювачів, які можуть бути підігнані під формат індивідуального аналізу.
- Стандарт Людського АроВ:** АроВ в буферній білковій основі (0.325 мкг, ліофілізований, 2 флакона).
- Біотинильоване антитіло Людського АроВ (50x):** 50x біотинильовані поліклональні антитіла до АроВ (120 мкл).
- Концентрат Розчинника EIA (10x):** 10-ти кратний концентрат в буферній білковій основі (30 мл).
- Концентрат промивного буфера (20x):** 20x концентровані буферні поверхнево-активні речовини (30 мл, 2 пляшки).
- Кон'югат стрептавідин-пероксидази (SP-кон'югат):** 100x концентрат (80 мкл).
- Субстрат хромогену:** готовий до використання стабілізований пероксидазо хромогенний субстрат Тетраметилбензидину (8 мл).
- Стоп розчин:** 0.5 N соляної кислоти для зупинки реакції хромогенного субстрату (12 мл).

### УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

- Зберігайте компоненти набору при зазначених температурах після прибуття до закінчення терміну придатності.
- Зберігайте SP-кон'югат і біотинильоване антитіло при -20 °С.
- Зберігайте мікропланшет, концентрат розчинника (10x), миючий буфер, стоп розчин і субстрат хромогену при температурі 2-8 °С.
- Невикористані лунки мікропланшетів можуть бути повернуті в пакет з фольги з осушувачем і запечатані. Зберігати до 1 місяця у вакуумному ексікаторі.
- Розчинник (1x) зберігати до 1 місяця при 2-8 °С.
- Зберігайте Стандарт при -20 °С до і після розведення з Розчинником.

### ІНШІ НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ

- Мікропланшетний зчитувальний пристрій, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм.
- Піпетки (1-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл і багатоканальна).
- Деіонізована або дистильована вода класу реагенту.

### ЗАБІР, ПІДГОТОВКА ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКА

- Плазма:** Зібрати плазму, використовуючи 1/10 об'єму 0.1 М цитрату натрію в якості антикоагулянту. Центрифугувати зразки при 3000g протягом 10 хвилин. Зразки розбавити 1:20000 в Розчиннику EIA або в діапазоні 1:10000 - 1:40000 та аналізувати. Залежно від потреб, користувач повинен визначити правильні розведення. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °С або нижче протягом 3 місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання (ЕДТА або гепарин також можуть бути використані в якості антикоагулянту).
- Сироватка:** Зразки повинні бути зібрані в сепараторну пробірку для сироватки. Після утворення згустку, зразки центрифугувати при 3000g протягом 10 хвилин. Зразки розбавити 1:20000 в Розчиннику EIA або в діапазоні 1:10000 - 1:40000 та аналізувати. Залежно від потреб, користувач повинен визначити правильні розведення. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °С або нижче протягом 3 місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.
- СМР:** Зібрати спинномозкову рідину, використовуючи ємність для зразка. Центрифугувати зразки при 3000g протягом 10 хвилин. Розбавити зразки 1:5 в Розчиннику EIA та аналізувати. Нерозбавлені зразки можуть зберігатися при температурі -80 °С протягом 3 місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.
- Супернатанти клітинних культур:** Центрифугувати клітинну культуру при 3000g протягом 10 хвилин, щоб видалити сміття. Зібрати супернатант та аналізувати. Зразки зберігати при температурі -20 °С або нижче. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.
- Клітинний лізат:** Промити лунку з холодним PBS, а потім очистити лунку в трубку з 5 мл холодної PBS з 0.5 М ЕДТА. Центрифугувати суспензію при 1500 g протягом 10 хвилин при 4 °С і аспірувати супернатант. Повторно суспендувати осад у крижаному Лізуючому Буфері (10 мМ Тріс, рН 8.0, 130 мМ NaCl, 1% Тритон X-100, коктейль інгібітора протеази). На кожні 1 x 10<sup>6</sup> клітин додати приблизно 100 мкл крижаного Лізуючого Буфера. Інкубувати на льоду протягом 60 хвилин. Центрифугувати при 13000 x g протягом 30 хвилин при 4 °С і зібрати супернатант для аналізу.

**Див. Розведення Зразка для отримання подальшої інформації.**

Вказівки для розведення 1:100 або більше (Тільки для довідки, будь ласка, дотримуйтесь протоколу конкретного запропонованого розведення)			
1:100		1:10000	
A.	4 мкл зразка: 396 мкл буфера (100x) = 100-кратне розведення	A.	4 мкл зразка: 396 мкл буфера (100x)
Якщо припустити, що необхідний обсяг менше або дорівнює 400 мкл		B.	
		4 мкл A: 396 мкл буфера (100x) = 10000-кратне розведення	
		Якщо припустити, що необхідний обсяг менше або дорівнює 400 мкл	
1:1000		1:100000	
A.	4 мкл зразка: 396 мкл буфера (100x)	A.	4 мкл зразка: 396 мкл буфера (100x)
B.	24 мкл A: 216 мкл буфера (10x) = 1000-кратне розведення	B.	4 мкл A: 396 мкл буфера (100x)
Якщо припустити, що необхідний обсяг менше або дорівнює 240 мкл		C.	
		24 мкл B: 216 мкл буфера (10x) = 100000-кратне розведення	
		Якщо припустити, що необхідний обсяг менше або дорівнює 400 мкл	

## ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

- Свіжо розведені реагенти привести до кімнатної температури перед використанням.
- EIA концентрат для розведення (10x):** Якщо кристали утворилися в концентраті, акуратно перемішати, поки кристали повністю не розчиняться. Розвести концентрат для розведення EIA 1:10 очищеною водою. Зберігати до 1 місяця при 2-8 °C.
- Стандартна крива:** Відновити 0.325 мкг стандарту людського Аполіпопротеїну В з 1.3 мл Розчинника EIA для отримання стандартного розчину 0.25 мкг/мл. Залишити стандарт на 10 хвилин з легким порушуванням перед проведенням розведень. Підготувати подвійні або потрійні значення стандарту серійним розбавленням стандартного розчину (0.25 мкг/мл) 1:2 з EIA Розчинником для підготовки розведень 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0156, 0.0078, 0.0039 і мкг/мл. EIA Розчинник служить нульовим стандартом (0 мкг/мл). **Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °C і використаний протягом 2 днів.**

Стандарт	Розведення	АроВ, мкг/мл
P1	1 частина Стандарту (0.25 мкг/мл)	0.25
P2	1 частина P1 + 1 частина Розчинника EIA	0.125
P3	1 частина P2 + 1 частина Розчинника EIA	0.0625
P4	1 частина P3 + 1 частина Розчинника EIA	0.0313
P5	1 частина P4 + 1 частина Розчинника EIA	0.0156
P6	1 частина P5 + 1 частина Розчинника EIA	0.00781
P7	1 частина P6 + 1 частина Розчинника EIA	0.00391
P8	Розчинник EIA	0.0000

- Антитіла біотинильованого людського Аполіпопротеїну В (50x):** Коротко центрифугувати кон'югат антитіл так, щоб повністю зібрати реагент на дні пробірки, і розвести необхідну кількість кон'югату в 50 разів Розчинником EIA. Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °C.
- Концентрат буфера для промивок (20x):** Якщо кристали утворилися в концентраті, обережно перемішати до тих пір поки кристали повністю не розчиняться. Розвести концентрат промивного буфера 1:20 водою для аналізу.
- SP кон'югат (100x):** Коротко центрифугувати SP Кон'югат так, щоб повністю зібрати реагент на дні пробірки, і розвести необхідну кількість кон'югату в 100 разів Розчинником EIA. Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °C.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

- Приготуйте все реагенти, розведення стандарту і зразки, як описано в даній інструкції. Перед початком аналізу всі реагенти повинні досягти кімнатної температури. Тестування виконується при кімнатній температурі (20-25 °C).
- Дістаньте зайві стрипи з рамки-утримувача і негайно помістіть їх назад в оригінальний алюмінієвий пакет з осушувачем. Ретельно закрийте пакет для запобігання попадання вологи і зберігайте його у вакуумному ексикаторі.
- Внесіть по 50 мкл стандарту АроВ або зразків у відповідні лунки. Закрийте лунки адгезивною плівкою та інкубуйте 2 години. Встановіть таймер після внесення останнього зразка.
- Промийте лунки 5 разів, використовуючи по 200 мкл буфера для промивок на лунку на один цикл промивки. На кожному кроці перевертайте мікропланшет, зливайте рідину з лунок, потім постукайте 4-5 разів по фільтрувальному папері, для повного видалення залишків рідини з лунок. Якщо використовується машина, промийте 6 разів з 300 мкл Промивного Буфера, переверніть планшет, видалюючи вміст; постукайте 4-5 разів по фільтрувальному папері, для повного видалення залишків рідини з лунок.
- Внесіть по 50 мкл біотинильованих антитіл анти-Аполіпопротеїну В в усі лунки і інкубуйте протягом 1 години.
- Промийте мікропланшет як описано вище.
- Внесіть по 50 мкл кон'югату стрептавідин-пероксидази в усі лунки та інкубуйте 30 хвилин. Увімкніть мікропланшетний рідер і запустіть програму заздалегідь.
- Промийте мікропланшет як описано вище.
- Внесіть по 50 мкл хромогенного субстрату в усі лунки та інкубуйте 10 хвилин або до розвитку оптимального синього фарбування. Акуратно постукайте по краю мікропланшетів для ретельного перемішування і видаліть бульбашки повітря за допомогою наконечника для піпетки.
- Внесіть по 50 мкл стоп-розчину в усі лунки. Фарбування зміниться з блакитного на жовте.
- Зчитайте абсорбцію (ОП) за допомогою мікропланшетного рідера при довжині хвилі 450 нм **негайно**. Якщо корекція

довжини хвилі можлива, відняти показання при 570 нм від показань при 450 нм для корекції оптичних похибок. В іншому випадку зчитати пластини тільки при 450 нм. Зверніть увагу, що деякі нестійкі чорні частинки можуть бути сформовані в точках високих концентрацій після зупинки реакції протягом близько 10 хвилин, що призведе до зниження показань.

## РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

- Розрахуйте середнє значення поглинання (ОЦ) для кожного триплета стандартів і зразків.
- Для побудови калібрувальної кривої використовуйте напівлогарифмічний графічний папір, відкладаючи по осі ординат (Y) середнє значення ОЦ при 450 нм для кожного стандарту, а по осі абсцис (X) відповідні значення концентрацій стандартів. Оптимальна крива може бути отримана регресійним аналізом з використанням log-log або 4-параметричної логістичної апроксимації.
- Визначте концентрації в зразках з калібрувальної кривої і помножьте отримане значення на відповідний коефіцієнт розведення.

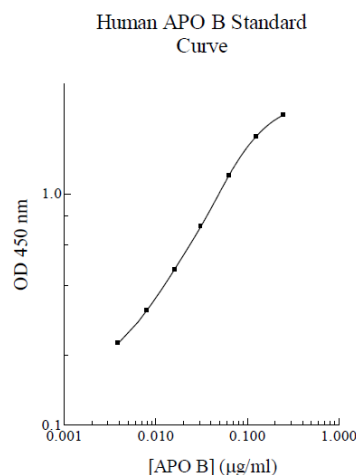
## ТИПОВІ ДАНІ

- Типові дані надаються тільки для прикладу. Індивідуальні значення, отримані лабораторією, можуть відрізнятися від значень, вказаних нижче. Варіації можуть бути викликані відмінностями техніки проведення аналізу.

Standard Point	µg/ml	OD	Average OD
P1	0.25	2.242 2.157	2.199
P2	0.125	1.776 1.772	1.774
P3	0.0625	1.201 1.195	1.198
P4	0.0313	0.721 0.722	0.721
P5	0.0156	0.490 0.453	0.471
P6	0.00781	0.309 0.315	0.312
P7	0.00391	0.229 0.221	0.225
P8	0.00000	0.121 0.122	0.121
Sample: Pool Normal, Sodium Citrate Plasma (20000x)		0.930 0.937	0.933

## КАЛІБРУВАЛЬНА КРИВА

- Наведена нижче калібрувальна крива дана тільки в демонстраційних цілях. Калібрувальна крива повинна бути включена в кожну постановку.



## РЕФЕРЕНСНЕ ЗНАЧЕННЯ

- Рівні нормальної плазми людини АроВ знаходяться в діапазоні від 0.66 до 1.33 мг/мл.
- Людська сироватка і плазма від здорових донорів були тестовані (n=30). В середньому рівень склав 1005 мкг/мл.

Sample	n	Average Value (µg/ml)
Human Pool Normal Plasma	15	924
Human Pool Normal Serum	15	1086

## РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Мінімальна обумовлена доза АроВ за підрахунками 2SD від середнього нульового стандарту становить 0.002 мкг/мл.
- Точність Intra-аналізу була визначена шляхом тестування повторів трьох зразків плазми в одному аналізі.
- Точність між аналізами була визначена шляхом тестування трьох зразків плазми в двадцяти аналізах.

Sample	Intra-Assay Precision			Inter-Assay Precision		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	20	20	20
CV (%)	4.9%	5.1%	5.2%	9.8%	8.9%	9.5%
Average CV (%)	5.0%			9.4%		

## ВІДНОВЛЕННЯ

Standard Added Value	0.01 – 0.1 µg/ml
Recovery %	88 – 111%
Average Recovery %	96%

## ЛІНІЙНІСТЬ

- Зразка плазми і сироватки крові були серійно розведені для перевірки на лінійність.

Average Percentage of Expected Value (%)		
Sample Dilution	Plasma	Serum
1:10000	90%	91%
1:20000	99%	98%
1:40000	102%	108%

## ПЕРЕХРЕСНА РЕАКТИВНІСТЬ

Види	Перехресна реактивність, %
Собаки (гонча)	Немає
Бичачий	Немає
Мавпи	< 5 %
Миші	Немає
Щура	Немає
Кролика	Немає
Свині	Немає
Протеїни	Перехресна реактивність, %
АроА-I	< 2%
АроС-I	< 10%

Не спостерігалось істотної перехресної реактивності з АроА-II, АроС-II та АроЕ.

## ПОШУК НЕСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Причини	Можливі дії
Низька точність	Використання прострочених компонентів	<ul style="list-style-type: none"> <li>Перевірити термін придатності перед використанням.</li> <li>Не міняти компоненти з різних лотів.</li> </ul>
	Неналажно проведена промивка	<ul style="list-style-type: none"> <li>Переконайтеся, що використовується відповідний промивний буфер.</li> <li>Переконайтеся, що всі лунки сухі після аспірації.</li> <li>Переконайтеся, що мікропланшетний промивач правильно дозує.</li> <li>Якщо промивання проводиться піпеткою, перевірте правильність техніки піпетування.</li> </ul>
	Розбрикування реагентів при завантаженні в лунки	<ul style="list-style-type: none"> <li>Піпетувати правильно, контрольовано і ретельно.</li> </ul>
	Не постійні обсяги, завантаженні в лунки	<ul style="list-style-type: none"> <li>Піпетувати правильно, контрольовано і ретельно.</li> <li>Перевірити калібрування піпетки.</li> <li>Перевірити піпетки щодо їх належного функціонування.</li> </ul>
	Погане перемішування реагентів при розведенні	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ретельно перемішати ліофілізовані компоненти після відновлення.</li> <li>Ретельно перемішати розведення.</li> </ul>
	Неправильно запечатаний мікропланшет	<ul style="list-style-type: none"> <li>Перевірити пакування мікропланшета щодо належної герметизації.</li> <li>Переконайтеся, що мікропланшетна упаковка не має проколів.</li> </ul>

Несподівано низька або висока інтенсивність сигналу	Мікропланшет залишився без нагляду між кроками	<ul style="list-style-type: none"> <li>Переконайтеся, що три осушувачі знаходяться всередині мікропланшета перед упаковкою.</li> <li>Кожен крок процедури повинен бути виконаний без затримок.</li> </ul>	
	Пропущений крок	<ul style="list-style-type: none"> <li>Переглянути процедуру щодо повного списку кроків.</li> </ul>	
	Кроки, що виконуються в неправильному порядку	<ul style="list-style-type: none"> <li>Переглянути процедуру щодо правильного порядку.</li> </ul>	
	Недостатню кількість реагентів додано в лунки	<ul style="list-style-type: none"> <li>Перевірте калібрування піпетки.</li> <li>Перевірити піпетки щодо їх належного функціонування.</li> </ul>	
	Крок промивки був пропущений	<ul style="list-style-type: none"> <li>Переглянути процедуру щодо всіх стадій промивки.</li> </ul>	
	Неправильний промивний буфер	<ul style="list-style-type: none"> <li>Переконайтеся, що відповідний промивний буфер використовується.</li> </ul>	
	Неправильна підготовка реагенту	<ul style="list-style-type: none"> <li>Переглянути розділ про підготовку реагентів для правильних розведень всіх реагентів.</li> </ul>	
Недостатні або задовгі періоди інкубації	Недостатні або задовгі періоди інкубації	<ul style="list-style-type: none"> <li>Переглянути процедуру щодо правильних часів інкубації.</li> </ul>	
	Неоптимальне розведення зразка	<ul style="list-style-type: none"> <li>Сендвіч ІФА: Якщо зразки генерують значення ОЩ вищі, ніж точка найвищого стандарту (P1), розвести зразки далі і повторити аналіз.</li> <li>Конкурентний ІФА: Якщо зразки генерують значення ОЩ нижчі, ніж точка найвищого стандарту (P1), розвести зразки далі і повторити аналіз.</li> <li>Користувач повинен визначити оптимальний коефіцієнт розбавлення для зразків.</li> </ul>	
		Забруднення реагентів	<ul style="list-style-type: none"> <li>Новий наконечник повинен бути використаний для кожного додавання різних зразків або реагентів під час процедури аналізу.</li> </ul>
		Вміст лунок випаровується	<ul style="list-style-type: none"> <li>Переконайтеся, що ущільнювальна плівка щільно встала на місце перед постановкою аналізу в інкубаторі або при кімнатній температурі.</li> </ul>
		Неправильне піпетування	<ul style="list-style-type: none"> <li>Проводити піпетування коректно.</li> <li>Перевірити калібрування піпетки.</li> <li>Перевірити піпетки щодо їх належного функціонування.</li> </ul>
Недостатня стандартна крива	Погане перемішування розведень реагентів	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ретельно перемішувати ліофілізовані компоненти після відновлення.</li> <li>Ретельно перемішайте розведення.</li> </ul>	



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)