

НАБІР

ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ТРАНСФЕРИНУ В ЗРАЗКАХ ПЛАЗМИ І СИРОВАТКИ ЛЮДИНИ

ET2105-1, Human Transferrin ELISA

Каталог. № : ET2105-1

Версія 5.3R

Кількість : 96

Виробник : AssayPro, (США)



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

ВСТУП

Трансферин є білком плазми, який переносить залізо через кров в печінку, селезінку і кістковий мозок.

ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір AssayMax людського Трансферину ELISA (імуоферментний аналіз) призначений для виявлення людського Трансферину в зразках плазми і сироватки. Цей аналіз використовує кількісний метод конкурентного імуоферментного аналізу, який вимірює людський трансферин менш ніж за 2 години. Поліклональні антитіла, специфічні до людського трансферину, було попередньо нанесено на 96-лунковий мікропланшет зі знімними смужками. Трансферин в стандартах і зразках конкурує з біотинильованим трансфериним, затиснутим між іммобілізованим антитілом і кон'югатом стрептавідин-пероксидази. Весь незв'язаний матеріал вимивається і додається ферментний субстрат пероксидази. Розвиток кольору зупиняється, і інтенсивність кольору вимірюється.

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, стандарти, 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 Трансферину:** 96-лунковий полістироловий мікропланшет (12 стрипів по 8 лунок), покритий поліклональними антитілами до Трансферину.
- Ущільнювальні стрічки:** Кожен комплект містить 3 нарізані, чутливі до тиску стрічки ущільнювачів, які можуть бути підігнані під формат індивідуального аналізу.
- Стандарт Людського Трансферину:** Трансферин в буферній білкової основі (75 мкг, ліофілізований).
- Біотинильований Трансферин людини:** 1 флакон, ліофілізований.
- Концентрат розчинника MIX (10x):** 10x концентрована буферна білкова основа (30 мл).
- Концентрат промивного буфера (20x):** 20x концентровані буферні поверхнево-активні речовини (30 мл).
- 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

- Після отримання зберігати компоненти набору при рекомендованих температурах аж до закінчення терміну придатності.
- Зберігайте SP-кон'югат при -20 °C.

- Зберігайте мікропланшет, концентрат розріджувача (10x), миючий буфер, стоп розчин, і субстрат хромогену при температурі 2-8 °C.
- Невикористані лунки мікропланшетів можуть бути повернуті в пакет з фольги з осушувачем і запечатані. Зберігати до 1 місяця у вакуумному ексикаторі.
- Розріджувач (1x) зберігати до 1 місяця при 2-8 °C.
- Зберігати стандарт та Біотинильований Протеїн при 2-8 °C перед відновленням з розріджувачем і при -20 °C після відновлення з розріджувачем.

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 M цитрату натрію в якості антикоагулянту. Центрифугувати зразки при 3000g протягом 10 хвилин. Розвести зразки 1:2000 в Розчиннику MIX та аналізувати. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °C або нижче протягом 3-х місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання (ЕДТА або гепарин також може бути використаний як антикоагулянт).
- Сироватка:** Зразки повинні бути зібрані в сепараторну пробірку для сироватки. Після утворення згустку, зразки центрифугувати при 3000g протягом 10 хвилин. Зразки розбавити 1:2000 в Розчиннику MIX та аналізувати. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °C або нижче протягом 3 місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.

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 А: 396 мкл буфера (100x) = 10000-кратне розведення Якщо припустити, що необхідний обсяг менше або дорівнює 400 мкл
1:1000	1:1000000
A. 4 мкл зразка: 396 мкл буфера (100x)	A. 4 мкл зразка: 396 мкл буфера (100x)
B. 24 мкл А: 216 мкл буфера (10x) = 1000-кратне розведення	B. 4 мкл А: 396 мкл буфера (100x)
Якщо припустити, що необхідний обсяг менше або дорівнює 240 мкл	C. 24 мкл В: 216 мкл буфера (10x) = 1000000-кратне розведення Якщо припустити, що необхідний обсяг менше або дорівнює 240 мкл

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

- Свіжорозведені реагенти привести до кімнатної температури перед використанням.
- MIX концентрат для розведення (10x):** Якщо кристали утворилися в концентраті, акуратно перемішати, поки кристали повністю не розчиняться. Розвести концентрат для розведення ІФА 1:10 очищеною водою. Зберігати до 1 місяця при 2-8 °C.
- Стандартна крива:** Відновити 75 мкг стандарту людського Трансферину з 3 мл розріджувача MIX для отримання стандартного розчину 25 мкг/мл. Дозволити стандарту відстоятися протягом 10 хвилин, злегка помішуючи, перед розведеннями. Підготувати точки стандарту в двох або трьох повторях послідовним розведенням стандартного розчину (25 мкг/мл) 1:4 з рівним об'ємом MIX розріджувача для отримання розчинів 6.25, 1.563, 0.391 і 0.098 мкг/мл. Розріджувач MIX служить в якості нульового стандарту (0 мкг/мл). Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °C і використаний протягом 30 днів.

Стандарт	Розведення	Трансферин, нг/мл
P1	1 частина Стандарту (25 мкг/мл)	25.00
P2	1 частина P1 + 3 частини Розчинника MIX	6.250
P3	1 частина P2 + 3 частини Розчинника MIX	1.563
P4	1 частина P3 + 3 частини Розчинника MIX	0.391
P5	1 частина P4 + 3 частини Розчинника MIX	0.098

P6	Розчинник MIX	0.000
----	---------------	-------

- **Біотинильований Трансферин людини (6x):** Розчинити біотинильований трансферин людини з 4 мл MIX розріджувача з отриманням 6-кратного вихідного розчину. Залишити на 10 хвилин з обережним перемішуванням до проведення розведень. Вихідний розчин повинен бути додатково розбавлений 1:6 з MIX розріджувачем. Будь-який розчин, що залишився, слід заморозити при -20 °C і використати протягом 30 днів.
- **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 дистильованою або деіонізованою водою.
- **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 MIX буфером для розведення. Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °C.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

- Приготуйте все реагенти, робочі 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 смужки 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 ексікаторі.
- Внесіть по 25 мкл стандарту Трансферину людини або зразків у відповідні лунки, і відразу ж додайте 25 мкл біотинильованого людського трансферину в кожну лунку (у верхню частину стандарту або зразка), постукайте по пластині для обережного перемішування. Закрийте лунки адгезивною плівкою та інкубуйте 1 годину. 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, видаляючи вміст; постукайте 4-5 разів по фільтрувальному папері, для повного видалення залишків рідини з лунок.
- 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 мікропланшета 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 тих, які були отримані при 450 нм, щоб виправити оптичні недосконалості. В іншому випадку, зчитати результати тільки при 450 нм. Будь ласка, зверніть увагу, що деякі нестабільні чорні частки можуть бути сформовані в точках з низькою концентрацією після зупинки реакції протягом приблизно 10 хвилин, що призведе до зниження показань.

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

- Розрахуйте середнє значення поглинання (ОЩ) для кожного триплета стандартів і зразків.
- Для побудови калібрувальної кривої використовуйте напівлогарифмічний графічний папір, відкладаючи по осі ординат (Y) середнє значення ОЩ 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.

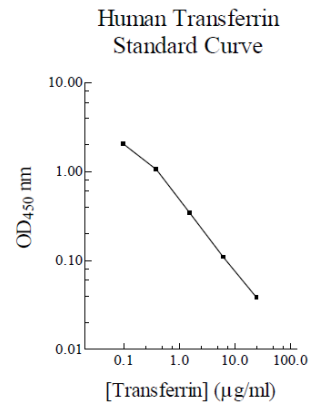
ТИПОВІ ДАНІ

- Типові дані надаються тільки для довідки. Окремі лабораторні дані можуть відрізнятися від вказаних значень. Варіації між лабораторіями можуть бути викликані відмінностями в техніці проведення.

Standard Point	µg/ml	OD	Average OD
P1	25.00	0.042 0.046	0.044
P2	6.250	0.110 0.115	0.113
P3	1.563	0.371 0.369	0.370
P4	0.391	1.095 1.095	1.095
P5	0.098	1.865 1.821	1.843
P6	0.000	2.148 2.144	2.146
Sample: Pool Normal, Sodium Citrate Plasma (2000x)		0.391 0.381	0.386

КАЛІБРУВАЛЬНА КРИВА

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



РЕФЕРЕНСНЕ ЗНАЧЕННЯ

- Нормальний рівень трансферину в плазмі людини варіюється від 2 до 4 мг/мл.
- Зразки сироватки і плазми людини від здорових дорослих були аналізовані (n = 40). В середньому, рівень трансферину становить 3.09 мг/мл.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Мінімально обумовлена концентрація Трансферину складає 0.07 мкг/мл.
- Коефіцієнт варіації всередині був визначений тестуванням в дублях трьох зразків плазми в одному аналізі.
- Точність між аналізами було визначено 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 (%)	4.2%	4.0%	4.5%	7.8%	8.6%	8.7%
Average CV (%)	4.2%			8.4%		

ВІДНОВЛЕННЯ

Standard Added Value	0.3 – 10 µg/ml
Recovery %	88 – 111%
Average Recovery %	96%

ЛІНІЙНІСТЬ

- Зразки плазми і сироватки були послідовно розбавлені для перевірки лінійності.

Sample Dilution	Average Percentage of Expected Value (%)	
	Plasma	Serum
1:1000	101%	93%
1:2000	99%	97%
1:4000	104%	106%

ПЕРЕХРЕСНА РЕАКТИВНІСТЬ

Види	Перехресна реактивність, %
Собаки (гонча)	Немає
Бичачий	Немає
Мавпи	< 5 %
Миші	Немає
Щура	Немає
Свині	50 %
Людини	100%

ПОШУК НЕСПРАВНОСТЕЙ ТА ЇХ УСУНЕННЯ

Проблема	Причини	Можливі дії
Низька точність	Використання прострочених компонентів	<ul style="list-style-type: none"> Перевірити термін придатності перед використанням. Не міняти компоненти з різних лотів.
	Неналажно проведена промивка	<ul style="list-style-type: none"> Переконайтеся, що використовується відповідний промивний буфер. Переконайтеся, що всі лунки сухі після аспірації. Переконайтеся, що мікропланшетний промивач правильно дозує. Якщо промивання проводиться піпеткою, перевірте правильність техніки піпетування.
	Розбризкування реагентів при завантаженні в лунки	<ul style="list-style-type: none"> Піпетувати правильно, контрольовано і ретельно.
	Не постійні обсяги, завантажені в лунки	<ul style="list-style-type: none"> Піпетувати правильно, контрольовано і ретельно. Перевірити калібрування піпетки. Перевірити піпетки щодо їх належного функціонування.
	Погане перемішування реагентів при розведенні	<ul style="list-style-type: none"> Ретельно перемішати ліофілізовані компоненти після відновлення. Ретельно перемішати розведення.
	Неправильно запечатаний мікропланшет	<ul style="list-style-type: none"> Перевірити пакування мікропланшета щодо належної герметизації. Переконайтеся, що мікропланшетна упаковка не має проколів. Переконайтеся, що три осушувачі знаходяться всередині мікропланшета перед упаковкою.
Несподівано низька або висока інтенсивність сигналу	Мікропланшет залишився без нагляду між кроками	<ul style="list-style-type: none"> Кожен крок процедури повинен бути виконаний без затримок.
	Пропущений крок	<ul style="list-style-type: none"> Переглянути процедуру щодо повного списку кроків.
	Кроки, що виконуються в неправильному порядку	<ul style="list-style-type: none"> Переглянути процедуру щодо правильного порядку.
	Недостатню кількість реагентів додано в лунки	<ul style="list-style-type: none"> Перевірте калібрування піпетки. Перевірити піпетки щодо їх належного функціонування.
	Крок промивки був пропущений	<ul style="list-style-type: none"> Переглянути процедуру щодо всіх стадій промивки.
	Неправильний промивний буфер	<ul style="list-style-type: none"> Переконайтеся, що відповідний промивний буфер використовується.
	Неправильна підготовка реагенту	<ul style="list-style-type: none"> Переглянути розділ про підготовку реагентів для правильних розведень всіх реагентів.
Недостатні або задовгі періоди інкубації	<ul style="list-style-type: none"> Переглянути процедуру щодо правильних часів інкубації. 	
Недосконала стандартна крива	Неоптимальне розведення зразка	<ul style="list-style-type: none"> Сендвіч ІФА: Якщо зразки генерують значення ОЩ вищі, ніж точка найвищого стандарту (P1), розвести зразки далі і повторити аналіз. Конкурентний ІФА: Якщо зразки генерують значення ОЩ нижчі, ніж точка найвищого стандарту (P1), розвести зразки далі і повторити аналіз. Користувач повинен визначити оптимальний коефіцієнт розбавлення для зразків.
	Забруднення реагентів	<ul style="list-style-type: none"> Новий наконечник повинен бути використаний для кожного додавання

		різних зразків або реагентів під час процедури аналізу.
	Вміст лунок випаровується	<ul style="list-style-type: none"> Переконайтеся, що ущільнювальна плівка щільно встала на місце перед постановкою аналізу в інкубаторі або при кімнатній температурі.
	Неправильне піпетування	<ul style="list-style-type: none"> Проводити піпетування коректно. Перевірити калібрування піпетки. Перевірити піпетки щодо їх належного функціонування.
	Погане перемішування розведень реагентів	<ul style="list-style-type: none"> Ретельно перемішувати ліофілізовані компоненти після відновлення. Ретельно перемішайте розведення.



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
www.diameb.com