

Сертификат контроля качества		1	
Инструкция		1	
Листок для записи информации		2	

Таблица 1/1 НК329-02

Компонент набора	№ позиции	Количество	Цветовой код
Буфер для промывки 40x	WB01	1 флакон (20 мл)	Серый
Буфер для разведения 10x	DB83	1 флакон (20 мл)	Золотистый
Буфер для разведения образца 10x	PD56	1 флакон (15 мл)	Золотистый
Стандарт		2 флакона, 0.5 мл лиофилизированный	Желтый
Индикатор, биотинилированный		2 флакона, 1 мл лиофилизированный	Зеленый
Стрептавидин-пероксидаза	CON01	1 флакон, 1 мл лиофилизированный	Синий
TMB субстрат	TMB050/TMB100	1 флакон (22 мл)	Коричневый
Стоп раствор	STOP110	1 флакон (20 мл)	Красный
12 предварительно покрытых микротитровальных полосок		2 планшета	
Сертификат контроля качества		1	
Инструкция		1	
Листок для записи информации		2	

- После получения, хранить отдельные компоненты при температуре 2 - 8 °С. Не замораживать.
- Не использовать компоненты по истечении срока годности, указанного на этикетке.
- Стандарт, индикатор и стрептавидин-пероксидаза являются стабильными в лиофилизированной форме до истечения срока годности, указанного на этикетке, при хранении при 2 - 8 °С.
- Точная концентрация стандарта указана на этикетке флакона и в свидетельстве о контроле качества.
- После разведения стандарт, индикатор и стрептавидин-пероксидаза стабильны в течение 1 месяца, если хранить при температуре 2 - 8 °С.
- После получения пакет из фольги для пластины герметически запечатать. Любые нарушения вышеупомянутых условий могут влиять на производительность пластины при анализе.
- Неиспользованные полоски немедленно поместить в упаковку, содержащую осушитель, и запечатать. Качество гарантируется до истечения срока годности, если хранить при температуре 2 - 8 °С.

Необходимые, но не поставляемые материалы

- Калиброванные микропипетки и одноразовые наконечники.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Моечное устройство для планшета: автоматическое или ручное.
- Полипропиленовые емкости.
- Калиброванный ELISA ридер, способный измерять оптическую плотность при 450 нм.
- Адгезивные пленки могут быть заказаны отдельно. Пожалуйста, свяжитесь с вашим местным дистрибьютором.

6. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для использования в исследовательских целях, а не для диагностического или терапевтического использования.
- Этот набор должен использоваться только квалифицированным персоналом лаборатории.
- Ни при каких обстоятельствах не добавлять азид натрия в качестве консерванта в любой из компонентов.
- Не использовать компоненты набора по истечении срока годности.
- Не смешивать реагенты из разных наборов и партий. Реагенты были стандартизированы в качестве единого целого для данной партии. Используйте только реагенты, поставляемые производителем.
- Анализ был оптимизирован для указанного стандартного диапазона. Не изменяйте Стандартный диапазон.
- Открывать флаконы осторожно: флаконы запечатаны под вакуумом.
- Не глотать никакой из компонентов набора.

- Реагенты содержат 2-хлорацетамид в качестве консерванта. 2-хлорацетамид вреден при попадании на кожу и токсичен при проглатывании. При несчастном случае или если вы почувствовали недомогание, немедленно обратитесь к врачу.
- TMB субстрат является светочувствительным, избегать попадания яркого света. Раствор должен быть бесцветным до использования.
- Стоп раствор содержит 2% щавелевой кислоты и может вызвать раздражение или ожог дыхательной системы, кожи и глаз. Избегать прямого контакта с кожей и глазами. Если контакт происходит, немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу.
- Время инкубации, температура инкубации и пипетируемые объемы, отличные от указанных, могут давать ошибочные результаты.
- Не использовать повторно лунки или не помещать реагенты обратно в бутылки.
- Обращаться со всеми биологическими образцами как с потенциально опасными и способными передавать заболевания.
- Гемолизированные, гиперлипемические или загрязненные образцы могут давать ошибочные результаты.
- Использовать полипропиленовые емкости для приготовления стандарта и образцов. Не использовать полистироловые пробирки или пластины образцов.
- Стандарт является веществом человеческого происхождения. Он был проверен на различные вирусы и найден отрицательным. Поскольку ни один тестовый метод не может дать полной гарантии того, что инфекционные агенты отсутствуют, обращаться с этим реагентом следует как с любой потенциально инфекционной человеческой сывороткой или кровью. Обращайтесь со всеми материалами, находящимися в контакте с этим реагентом, в соответствии с указаниями по профилактике передачи инфекции.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор и хранение

Плазма

Имейте в виду, что человеческий лактоферрин высвобождается из нейтрофилов в сыворотку в процессе коагуляции крови. Это может привести к ложно положительным результатам. Исходя из этого, рекомендуется использование "осторожной плазмы", которая может быть получена как указано ниже.

Хранить свежесобраные образцы крови на льду. Если используется плазма, отделить плазму от крови в течение 20 минут после забора крови центрифугированием (1500xg при 4 °C в течение 15 минут). Будьте осторожны не потревожить белые кровяные тельца. Центрифугировать повторно перемещенную плазму во избежание загрязнения белыми кровяными тельцами: 1500xg при 4 °C в течение 15 минут.

Самые надежные результаты получаются, если используется ЭДТА плазма.

Хранение

Хранить образцы при температуре ниже -20 °C, предпочтительно при -70 °C в полипропиленовых пробирках. Хранение при температуре -20 °C может повлиять на восстановленный человеческий LL-37. Использовать образцы в течение 24 часов после размораживания. Избегать нескольких циклов замораживания-оттаивания, что может привести к потере активности человеческого LL-37 и дать ошибочные результаты.

Не использовать гемолизированные, гиперлипемические, нагретые или загрязненные образцы.

Перед выполнением анализа, образцы должны быть доведены до комнатной температуры (18 - 25 °C) и осторожно перемешаны. Подготовить всех образцы (контроль и тестовые образцы) до начала тестовой процедуры. Избегайте вспенивания.

Процедура разведения

Лактоферрин является высоко впитываемым Ig, другими протеинами и пластиком. Образцы могут быть измерены точно, если они разведены перед использованием поставляемым буфером для разведения в полипропиленовых пробирках.

Образцы плазмы

Человеческий Лактоферрин может быть измерен точно, если образцы плазмы разводятся, по крайней мере, 4x перед использованием поставляемым буфером для разведения образцов в полипропиленовых пробирках. Инкубировать 1 час при комнатной температуре перед пипетированием.

Самые надежные результаты получаются, если используется гепариновая плазма.

Образцы мочи

Человеческий Лактоферрин может быть измерен точно, если образцы мочи разводят, по крайней мере, 20-кратно перед использованием поставляемого буфера для разведения в полипропиленовых пробирках. Инкубировать 1 час при комнатной температуре перед пипетированием.

Образцы кала

Человеческий Лактоферрин может быть измерен точно, если образцы кала разводят, по крайней мере, 100-1000 кратно перед использованием поставляемым буфером для разведения в полипропиленовых пробирках. Инкубировать 1 час при комнатной температуре перед пипетированием.

Грудное молоко

Человеческий Лактоферрин может быть измерен точно, если образцы грудного молока разводят, по крайней мере, 10000 кратно перед использованием поставляемым буфером для разведения в полипропиленовых пробирках. Инкубировать 1 час при комнатной температуре перед пипетированием.

Замечание относительно рекомендуемого разведения образца

Рекомендуемое разбавление для образцов следует использовать в качестве ориентира. Восстановление человеческого LL-37 из неразбавленного образца не является 100% и может изменяться от образца к образцу. При тестировании менее разбавленных образцов желательнее проводить эксперименты по восстановлению для определения влияния матрицы на обнаружение человеческого LL-37. Не использовать полистироловые пробирки или пластины образцов для приготовления или разбавления образцов.

Руководство по разбавлению образцов

См. таблицу ниже с рекомендациями по разбавлению образцов. Объемы основаны на общем минимальном объеме в 230 мкл разбавленного образца, что является достаточным для одного тестирования образца методом ИФА в дублях. Для разбавления образцов рекомендуется использовать минимум 10 мкл образца.

Таблица 2

	Разбавление	Предварительное разбавление	Требуемое кол-во образца или предварительного разведения	Требуемое кол-во буфера для разведения
1.	10x	Не требуется	25 мкл (образец)	225 мкл
2.	20x	Не требуется	15 мкл (образец)	285 мкл
3.	50x	Не требуется	10 мкл (образец)	490 мкл
4.	100x	Не требуется	10 мкл (образец)	990 мкл
5.	500x	Рекоменд.: 10x	10 мкл(предварительно разбавленный)	490 мкл
6.	1000x	Рекоменд.: 10x	10 мкл(предварительно разбавленный)	990 мкл
7.	2000x	Рекоменд.: 20x	10 мкл(предварительно разбавленный)	990 мкл
8.	5000x	Рекоменд.: 50x	10 мкл(предварительно разбавленный)	990 мкл

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Привести все реагенты к комнатной температуре (20 - 25 °C) перед использованием. Вернуть в надлежащие условия для хранения сразу же после использования.

Промывочный буфер

Подготовьте промывочный буфер путем смешивания 20 мл 40x промывочного буфера с 780 мл дистиллированной или деионизированной воды, что достаточно для 2 x 96 тестов. Там, где требуется меньший объем, подготовьте необходимый объем буфера для промывки путем разбавления 1 части 40x промывочного буфера с 39 частями дистиллированной или деионизированной воды.

Буфер для разведения

Подготовить буфер для разведения путем смешивания 20 мл 10-кратного буфера разбавления со 180 мл дистиллированной или деионизированной воды, которого будет достаточно для 2 x 96 тестов. Там, где требуется меньший объем, подготовьте необходимый объем буфера для разведения путем разбавления 1 части 10x буфером для разбавления с 9 частями дистиллированной или деионизированной воды. Концентрированный буфер разбавления может содержать кристаллы. В случае, если кристаллы не исчезают при комнатной температуре в течение 1 часа, концентрированный буфер для разбавления можно нагреть до 37 ° C. Не трясти раствор.

Буфер для разведения образцов

Подготовить буфер для разведения образцов путем смешивания 15 мл 10-кратного буфера разбавления образцов со 135 мл

дистиллированной или деионизированной воды, которого будет достаточно для 2 x 96 тестов. Там, где требуется меньший объем, подготовьте необходимый объем буфера для разведения путем разбавления 1 части 10x буфером для разбавления с 9 частями дистиллированной или деионизированной воды. Концентрированный буфер разбавления может содержать кристаллы. В случае, если кристаллы не исчезают при комнатной температуре в течение 1 часа, концентрированный буфер для разбавления можно нагреть до 37 ° C. Не трясти раствор.

Стандартный раствор

Стандарт восстанавливается путем инъекции 0.5 мл дистиллированной или деионизированной воды. Приготовить каждый человеческий лактоферрин стандарт в полипропиленовых пробирках путем серийного разведения восстановленного стандарта буфером для разведения, как показано на рисунке 1*. Инкубировать 1 час при комнатной температуре перед пипетированием.

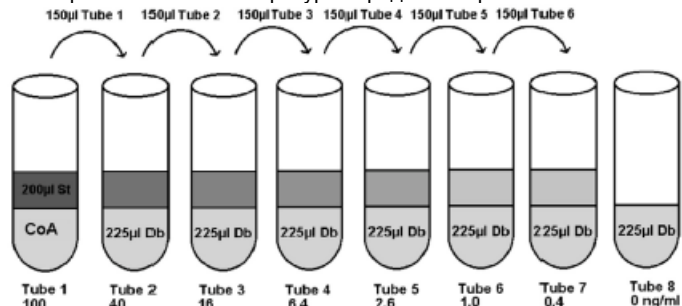


Рисунок 1

*) CoA: сертификат контроля качества, Rec. St.: Восстановленный стандарт, Db: Буфер для разведения образцов

Раствор индикатора

Индикатор восстанавливают пипетированием 1 мл дистиллированной или деионизированной воды. Развести 1 мл восстановленного индикатора с 11 мл буфера для промывки/разведения, что достаточно для 1 x 96 тестов. В случае, если меньший объем необходим, получить желаемый объем индикатора разбавлением 1 части восстановленного индикатора с 11 частями буфера для промывки/разведения.

Раствор стрептавидин-пероксидазы

Стрептавидин-пероксидазу восстанавливают пипетированием 1 мл дистиллированной или деионизированной воды. Развести 1 мл восстановленной стрептавидин-пероксидазы с 23 мл буфера для промывки/разведения, что достаточно для 2 x 96 тестов. В случае, если меньший объем необходим, получить желаемый объем индикатора разбавлением 1 части восстановленной стрептавидин-пероксидазы с 23 частями буфера для разведения.

9. ПРОТОКОЛ ИФА

Привести все реагенты к комнатной температуре (20 - 25 °C) перед использованием.

1. Определить необходимое количество тестируемых лунок, поместить необходимые микролуночные полоски в поставляемую рамку, и заполнить лист сбора данных. Вернуть неиспользованные полоски в пакет для хранения с осушителем, запечатать и хранить при 2 - 8 °C.
2. Развести образцы и стандарты в буфере для разведения образцов и инкубировать 1 час при комнатной температуре.
3. Переместить 100 мкл в двух экземплярах стандарта, образцов, или контролей в соответствующие лунки. Не прикасайтесь к боковой или нижней части лунки.
4. Накрыть адгезивной пленкой. Постучать по лотку для устранения любых воздушных пузырей. Избегать разбрызгивания жидкости на крышку.
5. Инкубировать полоски или пластину в течение 1 часа при 37 °C.
6. Промыть пластины 4 раза с промывочным раствором с использованием промывочного устройства или следующим образом:
 - a. Осторожно снимите герметик пластины, избегая разбрызгивания.
 - b. Освободить пластину путем ее переворачивания и встряхивания содержимого над раковиной, держать перевернутой и высушить сухим толстым слоем ткани.
 - c. Добавить 200 мкл промывочного буфера в каждую лунку, подождать 20 секунд, освободить пластину как описано в пункте 6b.
 - d. Повторите процедуру промывки 6b/6с три раза.
 - e. Очистить пластину и аккуратно высушить сухим толстым слоем ткани.

7. Добавить 100 мкл разведенного индикатора в каждую лунку с использованием того же порядка пипетирования как это применяется в шаге 3. Не прикасайтесь к боковой или нижней части лунок.
8. Накройте лоток адгезивной пленкой. Инкубируйте лоток в течение 1 часа при комнатной температуре.
9. Повторите процедуру промывания, описанную в шаге 5.
10. Добавить 100 мкл разведенной стрептавидин-пероксидазы в каждую лунку, используя тот же порядок пипетирования, применяемый в шаге 2. Не прикасайтесь к боковой или нижней части лунки.
11. Накройте лоток адгезивной пленкой. Инкубируйте лоток в течение 1 часа при комнатной температуре.
12. Повторите процедуру промывания, описанную в шаге 6.
13. Добавить 100 мкл ТМВ субстрата в каждую лунку, используя тот же порядок пипетирования, что и в шаге 3. Не прикасайтесь к боковой или нижней части лунки.
14. Накройте лоток новой адгезивной пленкой, инкубировать лоток в течение 30 минут при комнатной температуре. Не подвергать полоски действию прямых солнечных лучей. Покрытие пластин с алюминиевой фольгой рекомендуется.
15. Остановить реакцию добавлением 100 мкл стоп-раствора в той же последовательности и интервалами, используемыми в шаге 13. Тщательно смешать растворы в лунках, осторожно вращая пластину. Аккуратно постучать по лотку, чтобы устранить любые воздушные пузырьки в лунках.
16. Считать результаты в течение 30 минут после добавления стоп-раствора при 450 нм с использованием считывающего устройства, следуя инструкциям изготовителя прибора.

10. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитать среднюю абсорбцию для каждого набора повторяющихся стандартов, контроля и образцов.
- Если отдельные значения абсорбции отличаются более чем на 15% от соответствующего среднего значения, то результат считается сомнительным и образец должен быть протестирован повторно.
- Средняя оптическая плотность нулевого стандарта должна быть менее 0,3.
- Построить стандартную кривую с использованием компьютерной программы. Средняя оптическая плотность концентрации каждого стандарта откладывается на вертикальной (Y) оси против соответствующей концентрации на горизонтальной (X) оси (логарифмическая шкала). Пример стандартной кривой см. в сертификате контроля качества, включенного в комплект. Если стандарт находится вне диапазона, результат тестирования образцов не является надежным. Испытание должно быть повторено.
- Если образцы были разбавлены, концентрация, считываемая со стандартной кривой, должна быть умножена на коэффициент разбавления.
- Образцы, которые дают среднюю оптическую плотность выше абсорбции для самых высоких стандартов концентрации, находятся вне диапазона анализа. Эти образцы должны быть повторно протестированы с высшим разведением.

11. ТЕХНИЧЕСКИЕ СОВЕТЫ

- Пользователь должен быть подготовлен и знаком с ИФА и процедурой испытаний.
- Если вы не знакомы с техникой ИФА, рекомендуется выполнить пробный анализ до тестирования образцов. Выполнить анализ со стандартной кривой только следуя инструкциям.
- Неправильная или недостаточная промывка на любой стадии процедуры приведет либо к ложным положительным, либо ложным отрицательным результатам. Полностью освободить лунки перед внесением промывочного буфера, заполнить промывочным буфером, как указано для каждого цикла и не позволять лункам оставаться непокрытыми или сухими в течение длительного периода.
- Поскольку определенные условия могут отличаться от анализа к анализу, стандартная кривая должна быть построена для каждого анализа. Если стандарт вне диапазона, результат тестирования образцов не является надежным. Испытание должно быть повторено.
- Не смешивать реагенты из разных партий или с другими реагентами и полосками. Остатки не следует смешивать с содержимым только что открытой ампулы.
- Каждый раз, когда набор используется, свежие разведения стандарта, образца, индикатора, стрептавидин-пероксидазы и буферов должны быть приготовлены.
- Крышки и флаконы не являются взаимозаменяемыми. Крышками закрывать только соответствующие флаконы.
- Во избежание перекрестного загрязнения, менять наконечники для добавления реагентов для каждого стандарта, между

добавлением образцов, а также между добавлением реагента. Кроме того, используйте отдельные резервуары для каждого реагента.

- Утилизация отходов должна проводиться в соответствии с правилами лаборатории.

12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Сертификат контроля качества, поставляемый с набором, является специфичным для партии и используется для проверки результатов, полученных вашей лабораторией. Значения поглощений, указанных в Сертификате контроля качества, будут использоваться только в качестве ориентира. Результаты, полученные Вашей лабораторией, могут отличаться.

Этот тест предназначен для устранения помех от растворимых рецепторов, связывающих белков, и других факторов, присутствующих в биологических образцах. До тех пор, пока все факторы не будут протестированы Hycult Biotech иммуноферментным анализом, возможности интерференции не могут быть исключены.

Для оптимальной работы данного комплекта рекомендуется работать согласно надлежащей лабораторной практике.

13. УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Гарантийные претензии и жалобы в отношении недостатков необходимо предъявлять до истечения срока годности продукта. Письменную жалобу, содержащую номер партии продукта и экспериментальные данные, отправить на электронный адрес support@hycultbiotech.com.

Предложения, приведенные ниже в таблице 3, могут быть использованы только в качестве ориентира в случае неожиданных результатов анализа.

Таблица 3

Низкая абсорбция	Высокая абсорбция	Слабые копии	Все лунки положительные	Все лунки отрицательные	Возможная причина
•	•		•	•	Материалы набора или реагенты загрязнены или закончился их срок годности
•					Используются неправильные реагенты
•		•	•		Лиофилизованные реагенты не восстановлены как следует
•	•	•	•	•	Некорректные разведения или ошибки пипетирования
•		•			Неподходящие пластиковые материалы использовались для подготовки стандарта и/или образцов
•	•				Неверные время инкубации или температура
		•			Особенно в случае инкубации при 37 °C: пластины не инкубировались равномерно
•					Анализ проводился раньше, чем реагенты были приведены к комнатной температуре
•	•	•	•	•	Не соблюдалась процедура тестирования
				•	Пропущен реагент или шаг
		•			Плохое перемешивание образцов
	•		•		Низкое качество воды
	•	•			Полоски оставались неуравновешенными слишком долго во время/после промывки
	•	•	•		Плохая промывка
	•	•			Перекрестное загрязнение от других образцов или положительного контроля
		•	•		ТМВ раствор непрозрачный или бесцветный
•	•				Неверный фильтр в считывающем устройстве микропланшета
	•	•			Воздушные пузырьки
					Неточное запечатывание

		•			планшета после использования
•					Неправильные условия хранения
•					Лампа в считывающем устройстве не функционирует оптимально



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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