

НАБІР

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРА Х У ЗРАЗКАХ ПЛАЗМИ І СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЛЮДИНИ

EF1010-1, Human Factor X (FX) ELISA

Каталог. №: **EF1010-1**

Версія 3.5

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

Фактор Х (FX) - це профермент серинової протеази плазми, причетний до каскаду згортання крові. FX очищається від плазми як дволанцюговий білок, що складається з важкого ланцюга 45 кДа та легкого ланцюга 17 кДа. Важкий ланцюг FX розщеплюється під час коагуляції кількома різними протеазами, включаючи комплекс внутрішньої Хази, фермент, що активує FX, з отрути гадюки Рассела (RVV) та трипсину, а також зовнішній шлях (фактор тканини/фактор VIIa), щоб отримати активний фермент FXa. FXa як активатор протромбіну займає центральне положення, що зв'язує два шляхи згортання крові (1-4).

Принцип аналізу

Набір AssayMax ELISA Human Factor X (FX) призначений для виявлення людського фактора Х в плазмі і супернатантах клітинних культур людини. Цей аналіз використовує кількісну методику **імуноферментного аналізу типу сендвіч**, яка вимірює FX менш, ніж за 4 години. Моноклональні антитіла, специфічні до FX, були попередньо нанесені на мікропланшет. FX в стандартах і зразках затиснутий іммобілізованим антитілом і специфічним біотинильованим поліклональним антитілом FX, 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.
- Набір не слід використовувати після закінчення терміну придатності.
- Стоп розчин є кислим розчином.

Реагенти

- **Мікропланшет з нанесеним FX:** 96-лунковий полістироловий мікропланшет (12 стрипів по 8 лунок), покритий моноклональними антитілами до FX людини.
- **Герметизуючі стрічки:** Кожен набір містить 3 попередньо нарізані, чутливі до тиску герметизуючі стрічки, які можуть бути підігнані під формат індивідуального аналізу.
- **Стандарт FX:** Плазмовий FX людини в буферній білковій основі (1.2 мкг, ліофілізований).
- **Біотинильоване антитіло FX людини (100x):** 100x біотинильовані поліклональні антитіла до FX (80 мкл).
- **Кон'югат стрептавідин-пероксидази (SP-кон'югат):** 100x концентрат (90 мкл).
- **Концентрат Розчинника MIX (10x):** 10-ти кратний концентрат в буферній білковій основі (30 мл).
- **Концентрат промивного буфера (20x):** 20x концентровані буферні поверхнево-активні речовини (30 мл).
- **Субстрат хромогену:** готовий до використання стабілізований пероксидазо хромогенний субстрат Тетрамилбензидину (8 мл).
- **Стоп розчин:** 0.5 N соляної кислоти для зупинки реакції хромогенного субстрату (12 мл).

Умови зберігання

- Зберігати набір при температурі 2-8 °C або -20 °C після отримання до закінчення терміну придатності.
- Відкритий Розчинник MIX може зберігатися протягом 1 місяця при температурі 2-8 °C. Зберігайте відновлені реагенти при -20 °C або нижче.

- Відкриті невикористовувані смужки можна повернути у пакет з осушувачем. Можуть зберігатися до 1 місяця у вакуумному ексікаторі.

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 3.8 цитрату натрію в якості антикоагулянту. Центрифугувати зразки при 2000g протягом 10 хвилин. Зразки можуть вимагати розведення 1:800 у Розчиннику MIX. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °C або нижче протягом 3 місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання (ЕДТА або гепарин також можуть бути використані в якості антикоагулянту).
- **Супернатанти клітинних культур:** Центрифугувати клітинну культуру при 2000g протягом 10 хвилин, щоб видалити сміття. Зразки зберігати при температурі -20 °C або нижче. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.

Підготовка реагентів

- Свіжо розведені реагенти привести до кімнатної температури перед використанням. Якщо кристали утворилися в концентраті, акуратно перемішати, поки кристали повністю не розчиняться.
- **MIX концентрат для розведення (10x):** Розвести концентрат для розведення MIX 1:10 очищеною водою. Зберігати до 1 місяця при 2-8 °C.
- **Стандартна крива:** Відновити 1.2 мкг стандарту FX людини з 3 мл Розчинника MIX для отримання стандартного розчину 400 нг/мл. Залишити стандарт на 10 хвилин з легким потрушуванням перед проведенням розведень. Підготувати потрібні значення стандарту серійним розбавленням стандартного розчину (400 нг/мл) 1:4 з MIX Розчинником для отримання 100 нг/мл. Послідовно розвести удвічі з рівним об'ємом Розчинника MIX для отримання 50, 25, 12.5, 6.25, 3.25 та 1.563 нг/мл. MIX Розчинник служить нульовим стандартом (0 нг/мл). Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °C.

Стандарт	Розведення	FX, нг/мл
P1	1 частина стокового розчину (400 нг/мл) + 3 частини MIX Розчинника	100.000
P2	1 частина P1 + 1 частина Розчинника MIX	50.000
P3	1 частина P2 + 1 частина Розчинника MIX	25.000
P4	1 частина P3 + 1 частина Розчинника MIX	12.500
P5	1 частина P4 + 1 частина Розчинника MIX	6.250
P6	1 частина P5 + 1 частина Розчинника MIX	3.125
P7	1 частина P6 + 1 частина Розчинника MIX	1.563
P8	Розчинник MIX	0.000

- **Антитіла біотинильованого FX людини (100x):** Недовго центрифугувати антитіла і розвести необхідну кількість антитіл 1:100 Розчинником MIX. Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °C.
- **Концентрат буфера для промивок (20x):** Розвести концентрат промивного буфера 1:20 водою для аналізу.
- **SP кон'югат (100x):** Недовго центрифугувати SP Кон'югат і розвести необхідну кількість кон'югату 1:100 Розчинником MIX. 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.
- 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 ексікаторі.
- Внесіть по 50 мкл стандарту або зразків у відповідні лунки. Закрийте лунки 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, заливайте рідину з лунок, потім постукайте 4-5 разів по фільтрувальному папері, для повного видалення залишків рідини з лунок.



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

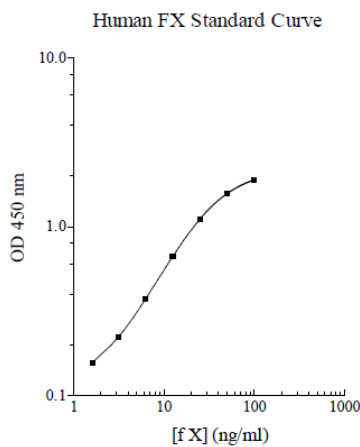
- Внесіть по 50 мкл біотинильованих антитіл FX в усі лунки і інкубуйте протягом 1 години.
- Промийте мікропланшет 5 разів, використовуючи по 200 мкл буфера для промивок.
- Внесіть по 50 мкл кон'югату стрептавідин-пероксидази в усі лунки та інкубуйте 30 хвилин. Увімкніть мікропланшетний рідер і запустіть програму заздалегідь.
- Промийте мікропланшет 5 разів, використовуючи по 200 мкл буфера для промивок.
- 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**. 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 (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.

Стандартна крива

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



Точність, чутливість та специфічність

- Мінімальна виявлена доза людського FX, як правило, становить < 1 нг/мл.
- Коефіцієнти варіації внутрішнього аналізу та між аналізами склали 4.8% та 7.1% відповідно.

Лінійність

Розведення зразка	Середній відсоток очікуваного значення	
	Плазма	
1:800	102%	
1:1600	97%	
1:3200	100%	

Відновлення

Додане значення стандарту	5 - 50 нг/мл
Відновлення %	82-117%
Середнє відновлення %	99.5%

Перехресна реактивність

Не спостерігалось істотної перехресної реактивності.