

## НАБІР

# ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЛІПОПРОТЕЇНУ Lp(a) У ЗРАЗКАХ ПЛАЗМИ, СИРОВАТКИ, СЕЧІ, МОЛОКА, СМР І СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЛЮДИНИ

## EL3001-1, Human Lipoprotein(a) ELISA

Каталог. № : EL3001-1  
Кількість : 96  
Виробник : AssayPro, (США)

Версія 2.4



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

### ВСТУП

(Див. оригінал інструкції).

### ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

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

### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- 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.
- Цей набір призначений для використання в дослідницьких цілях.
- Набір не слід використовувати після закінчення терміну придатності.

### РЕАГЕНТИ

- Мікропланшет Людського Lp(a):** 96-луноковий полістироловий мікропланшет (12 стрипів по 8 лунок), покритий поліклональними антитілами до Lp(a).
- Ущільнювальні стрічки:** Кожен комплект містить 3 нарізані, чутливі до тиску стрічки ущільнювачів, які можуть бути підігнані під формат індивідуального аналізу.
- Стандарт Людського Lp(a):** Lp(a) в буферній білковій основі (90 нг, ліофілізований).
- Біотинильоване антитіло Людського Lp(a) (50X):** 50X концентровані біотинильовані поліклональні антитіла до Lp(a) (140 мкл).
- Концентрат розчинника EIA (10X):** 10X концентрована буферна білкова основа (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 стандарт, SP-кон'югат і біотинильоване антитіло 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 ексікаторі.
- Розріджувач (1X) зберігати до 1 місяця при 2-8 °C.
- Зберігати Стандарт при 2-8 °C перед розведенням з Розчинником і при -20 °C після розведення.

### 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. Зразки розбавити 1:8000 в Розчиннику EIA та аналізувати. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °C або нижче протягом 3 місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання (EDTA 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 1:8000 в Розчиннику EIA та аналізувати. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °C або нижче протягом 3 місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.
- Клітинна культура:** Центрифугувати клітинну культуру при 3000g протягом 10 хвилин, щоб видалити сміття. Зібрати супернатант та аналізувати. Зразки зберігати при температурі -20 °C або нижче. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.
- Сеча:** Зібрати сечу за допомогою ємності для сечі. Центрифугувати зразки при 800g протягом 10 хвилин. Розвести зразки 1:4 в Розчиннику EIA та аналізувати. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °C або нижче протягом 3-х місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.
- Молоко:** Взяти зразки молока з використанням пробірки. Центрифугувати зразки при 800g протягом 10 хвилин. Розвести зразки 1:4000 в Розчиннику EIA та аналізувати. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °C або нижче протягом 3-х місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.
- СМР:** Зібрати спинномозкову рідину, використовуючи ємність для зразка. Центрифугувати зразки при 3000g протягом 10 хвилин. Розбавити зразки 1:8 в Розчиннику EIA та аналізувати. Нерозбавлені зразки можуть зберігатися при температурі -80 °C 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 A: 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 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) = 1000000-кратне розведення
		Якщо припустити, що необхідний обсяг менше або дорівнює 240 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 °С.

- **Стандартна крива:** Відновити 90 нг стандарту людського Lp(a) з 1.8 мл розріджувача EIA для отримання стандартного розчину 50 нг/мл. Перед розведенням залишити стандарт на 10 хвилин. Підготувати подвійні або потрійні значення стандарту серійним розбавленням стандартного розчину (50 нг/мл) 1:2 з EIA Розчинником для підготовки розведень 25, 12.5, 6.25, 3.125 і 1.563 нг/мл. EIA Розчинник служить нульовим стандартом (0 нг/мл). Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °С і використаний протягом 15 днів.

Стандарт	Розведення	Lp(a), нг/мл
P1	1 частина Стандарту (50 нг/мл)	50.00
P2	1 частина P1 + 1 частина Розчинника EIA	25.00
P3	1 частина P2 + 1 частина Розчинника EIA	12.50
P4	1 частина P3 + 1 частина Розчинника EIA	6.250
P5	1 частина P4 + 1 частина Розчинника EIA	3.125
P6	1 частина P5 + 1 частина Розчинника EIA	1.563
P7	Розчинник EIA	0.000

- **Антитіла біотинильованого людського Lp(a) (50X):** Коротко центрифугувати кон'югат антитіл і розвести необхідну кількість кон'югату в 50 разів Розчинником EIA. Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °С.
- **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 і розвести необхідну кількість кон'югату в 100 разів Розчинником EIA. Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °С.

#### 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 °С).
- 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 Lp(a) 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 Lp(a) 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.
- Виміряти оптичну щільність на мікропланшетному рідері при довжині хвилі 450 нм **негайно**. Якщо доступно є корекція довжини хвилі, можна відняти показання при 570 нм від отриманих при 450 нм, щоб виправити оптичні недосконалості. В іншому випадку, зчитати результати тільки при 450 нм. Будь ласка, зверніть увагу, що деякі нестійкі чорні частинки можуть бути отримані в точках високої концентрації після зупинки реакції протягом приблизно 10 хвилин, що знизить можливість зчитування результатів.

#### РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

- Розрахуйте середнє значення поглинання (ОЩ) для кожного дублікату або третього екземпляра стандартів і зразків.

- Для отримання стандартної кривої, побудувати графік з використанням стандартних концентрацій на осі x і відповідного середнього значення поглинання при 450 нм на осі ординат. Найбільш підходяща лінія може бути визначена з використанням регресійного аналізу log-log або 4-параметрової логістичної кривої.
- Визначити невідомої концентрації зразка зі стандартної кривої і помножити значення на коефіцієнт розведення.

#### ТИПОВІ ДАНІ

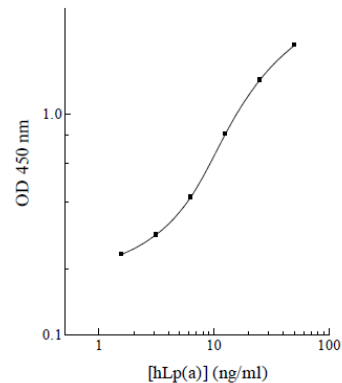
- Типові дані надаються тільки для прикладу. Індивідуальні значення, отримані лабораторією, можуть відрізнятися від значень, вказаних нижче. Варіації можуть бути викликані відмінностями техніки проведення аналізу.

Standard Point	ng/ml	OD	Average OD
P1	50.00	2.119	2.051
		1.983	
P2	25.00	1.442	1.426
		1.410	
P3	12.50	0.792	0.778
		0.764	
P4	6.250	0.480	0.466
		0.452	
P5	3.125	0.297	0.284
		0.271	
P6	1.563	0.236	0.231
		0.225	
P7	0.000	0.190	0.188
		0.187	
Sample: Pool Normal, Sodium Citrate Plasma (8000x)		0.709	0.716
		0.724	

#### КАЛІБРУВАЛЬНА КРИВА

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

Human Lp(a) Standard Curve



#### РЕФЕРЕНСНЕ ЗНАЧЕННЯ

- Рівні Lp(a) нормальної людської плазми знаходяться в діапазоні 60-180 мкг/мл.
- Людська сироватка і плазма від здорових донорів були тестовані (n=40). В середньому рівень склав 98 нг/мл.

Sample	n	Average Value (µg/ml)
Human Pool Normal Plasma	10	95
Human Normal Plasma	20	89
Human Pool Normal Serum	10	110

#### РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Мінімальна обумовлена доза Lp(a) за підрахунками 2SD від середнього нульового стандарту становить 0.8 нг/мл.
- Точність Intra-аналізу була визначена шляхом тестування трьох 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 (%)	4.1%	4.3%	4.5%	10.0%	9.9%	9.8%
Average CV (%)	4.3%			9.9%		

## ВІДНОВЛЕННЯ

- Відновлення визначалось насиченням двох зразків плазми з різними концентраціями Lp(a).

Sample	Unspiked Sample (ng/ml)	Spike (ng/ml)	Expected	Observed	Recovery (%)
1	7.5	2.0	9.5	9.3	98%
		7.5	15.0	13.7	91%
		15.0	22.5	23.0	102%
2	15.8	2.0	17.8	19.1	107%
		7.5	23.3	24.7	106%
		15.0	30.8	32.4	105%
<b>Average Recovery (%)</b>					<b>101%</b>

## ЛІНІЙНІСТЬ

- Зразки сироватки та плазми були серійно розведені для проведення тесту на лінійність.

Sample Dilution	Average Percentage of Expected Value (%)	
	Plasma	Serum
1:4000	104%	95%
1:8000	98%	99%
1:16000	101%	106%

## ПЕРЕХРЕСНА РЕАКТИВНІСТЬ

Види	Перехресна реактивність, %
Собаки (гонча)	Немає
Бичачий	Немає
Мавпи	< 10 %
Миші	Немає
Щура	Немає
Кролика	Немає
Свині	Немає
Людини	100%
<b>Протеїни</b>	<b>Перехресна реактивність, %</b>
Аро В	10%

- Не спостерігалось істотної перехресної реактивності з АроА-I, АроА-II, АроС-I, АроС-III або АроЕ людини.

## ПОШУК НЕСПРАВНОСТЕЙ ТА ЇХ УСУНЕННЯ

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, завантажені 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>
Несподівано низька або висока інтенсивність сигналу	Мікропланшет залишився без нагляду між кроками	<ul style="list-style-type: none"> <li>Перевірити пакування мікропланшета щодо належної герметизації.</li> <li>Переконайтеся, що мікропланшетна упаковка не має проколів.</li> <li>Переконайтеся, що три осушувачі знаходяться всередині мікропланшета перед упаковкою.</li> </ul>
	Пропущений крок	<ul style="list-style-type: none"> <li>Кожен крок процедури повинен бути виконаний без затримок.</li> </ul>

Недостатня кількість реагентів додано в лунки	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	<ul style="list-style-type: none"> <li>Переглянути процедуру щодо правильних часів інкубації.</li> </ul>
Недоконана стандартна крива	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>
	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)