

**ТЕСТОВИЙ НАБІР**  
**ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ**  
**ПЕНТРАКСИНУ 3 У ЗРАЗКАХ ПЛАЗМИ ТА**  
**СУПЕРНАТАНТІ КЛІТИННОЇ КУЛЬТУРИ**

**HK347, Human Pentraxin 3**

Кат. № : **HK347**

Методика від **02-2012**

Виробник : **НВТ (Нідерланди)**



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

**1. ПРИЗНАЧЕННЯ**

Набір human Pentraxin 3 ELISA повинен використовуватися для кількісного *in vitro* визначення *Пентраксину 3* людини у зразках плазми та супернатанті клітинної культури. Цей набір призначений тільки для лабораторних досліджень і не призначений для використання в діагностичних та терапевтичних процедурах. Аналіз повинні проводити кваліфіковані фахівці лабораторії.

**2. ВСТУП**

Пентраксини є суперсімейством реактивів гострої фази, для яких характерна пентамерна структура. С-реактивний білок (CRP) та Р-компонент амілоїду сироватки (SAP) - це добре охарактеризований короткі Пентраксини, які виробляються в печінці у відповідь на запальні медіатори. Пентраксин 3 (PTX3), також відомий як Ген 14, стимульований фактором некрозу пухлини (TSG-14), є прототипом довгого Пентраксину, з високим ступенем консервації від миші до людини.

PTX3 людини кодує 45 кДа секреторний глікопротеїн з 16-амінокислотним N-кінцевим розширенням і 202-амінокислотним C-кінцевим доменом Пентраксину. Білок виробляється локально і виділяється різними типами клітин, включаючи макрофаги, нейтрофіли, мезангіальні клітини мієлоїдного походження, сироватковий епітелій, клітини гладкої мускулатури, альвеолярний епітелій та гліальні клітини.

PTX3 індуктується у відповідь або на запальні цитокіни інтерлейкіну-1 β (IL-1 β) і на фактор некрозу пухлини α (TNFα) або на вибрані асоційовані молекулярні зразки (PAMP). PTX3 має подвійну роль у регуляції вродженої імунної відповіді. Через свій C-кінцевий домен Пентраксину, іммобілізований PTX3 зв'язує компонент комплементу C1q для індукції класичної активації комплементу. Однак рідка фаза PTX3 пригнічує класичну активацію комплементу. Крім того, PTX3 бере участь у кліренсі апоптичних клітин.

PTX3 підвищений у критично хворих пацієнтів з градієнтом від систематичного синдрому запального рефлексу до септичного шоку та при кількох інших захворюваннях, таких як інфаркт міокарда, ревматоїдний артрит, атеросклероз, судинний васкуліт та псоріаз.

Крім того, сироваткові рівні PTX3 при прееклампсії вищі в порівнянні з нормальною вагітністю.

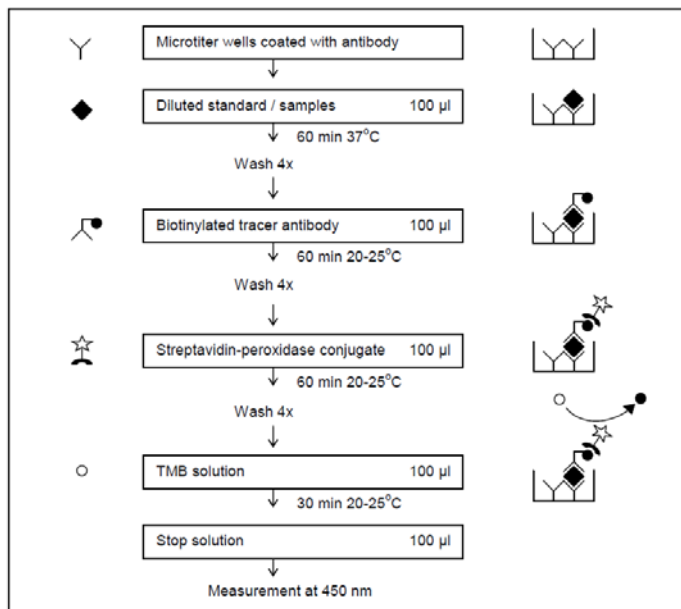
**3. ОСОБЛИВОСТІ НАБОРУ**

- Тривалість аналізу 3½ години.
- Мінімальна концентрація, яку можна виміряти, становить 78 пг/мл.
- Діапазон вимірюваної концентрації 78-5000 пг/мл.
- Робочий об'єм 100 мкл/лунку.

**Перехресна реактивність**

Перехресна реактивність з іншими видами або білками/пептидами не була перевірена.

**4. ОГЛЯД ПРОТОКОЛУ**



- Human Pentraxin 3 ELISA - це готовий до використання твердофазний ферментний імуносорбентний аналіз на основі сендвіч-методу з робочим часом 3½ години.
- Ефективний формат пластини з 12 одноразовими 8-лунковими смужками дозволяє вільно вибрати розмір партії для аналізу.
- Зразки та стандарти інкубуються в мікротитрувальних лунках, покритих антитілами, що розпізнають Пентраксин 3 людини.
- Біотинильоване мічене антитіло буде зв'язуватися з захопленням Пентраксином 3 людини.
- Кон'югат стрептавідин-пероксидаза зв'язується з біотинильованим міченим антитілом.
- Кон'югат стрептавідин-пероксидаза буде реагувати з субстратом, тетраметилбензидином (ТМБ).
- Реакція ферменту зупиняється шляхом додавання щавлевої кислоти.
- Поглинання при 450 нм вимірюють спектрофотометром. Стандартна крива отримується шляхом відкладання абсорбції (лінійний) проти відповідних концентрацій стандартів Пентраксину 3 людини (логарифмічний).
- Концентрацію зразків Пентраксину 3 людини, які вимірюються одночасно зі стандартами, можна визначити за стандартною кривою.

**5. СКЛАДОВІ НАБОРУ ТА ІНСТРУКЦІЇ ПО ЗБЕРІГАННЮ**

Компонент набору	Кількість	Колірний код
Буфер для промивки 20x	1 флакон (60 мл)	Сірий
Буфер для розведення 10x	1 флакон (30 мл)	Золотий
Стандарт	2 флакони, 0,5 мл ліофілізований	Жовтий
Трейсер, біотинильований	2 флакони, 1 мл ліофілізований	Зелений
Стрептавідин-пероксидаза	1 флакон, 1 мл ліофілізований	Синій
ТМБ субстрат	1 флакон (22 мл)	Коричневий
Стоп розчин	1 флакон (20 мл)	червоний
12 попередньо покритих мікротитрувальних смужок	2 планшети	
Сертифікат аналізу	1	
Інструкція	1	
Листок для запису інформації	2	

Таблиця 1

- Після отримання зберігайте окремі компоненти при температурі від 2 до 8 °С. Не заморожувати.
- Не використовуйте компоненти після закінчення терміну придатності, зазначеного на наклейці набору.
- Стандарт, трейсер і стрептавідин-пероксидаза стабільні в ліофілізованій формі до закінчення терміну придатності, зазначеного на наклейці набору, при зберіганні при 2-8 °С.
- Точна концентрація стандарту вказана на етикетці флакону та Сертифікаті Аналізу.
- Після відновлення стандарт стабільний протягом 12 годин. Для довшої стабільності ми рекомендуємо зберігати аліквоти при температурі -20 °С. При збереженні при -20 °С стандарт буде стабільним протягом 1 місяця.

- Після відтворення, трейсер і стрептавідин-пероксидаза стабільні протягом 1 місяця при зберіганні при 2-8 °С.
- Після отримання пакет з фольги з пластиною повинен бути запечатаний. Будь-які невідповідності до вищезазначених умов можуть впливати на ефективність пластини в аналізі.
- Повернути невикористані смужки в пакет з фольги, який містить осушувач та закрити по всьому краю пакета. Якість гарантована протягом 1 місяця при зберіганні при 2-8 °С.

#### Необхідні, але не надані матеріали

- Калібровані мікропіпетки та одноразові наконечники.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Планшетний вошер: автоматичний або ручний.  
У разі використання планшетного вошера буфера для промивки, який постачається в наборі, недостатньо. Додатковий промивний буфер можна замовити окремо. Зверніться до свого місцевого дистриб'ютора.
- Поліпропіленові пробірки.
- Калібрований зчитувач пластин, здатний вимірювати поглинання при 450 нм.
- Адгезивні плівки можна замовити окремо. Зверніться до свого місцевого дистриб'ютора.

#### 6. ПОПЕРЕДЖЕННЯ І ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

- Тільки для використання в дослідницьких цілях, а не для діагностичного чи терапевтичного застосування.
- Цей набір повинен використовуватися тільки кваліфікованим лабораторним персоналом.
- Ніколи не додавайте азид натрію як консервант до будь-якого з компонентів.
- Не використовуйте компоненти набору після закінчення терміну придатності.
- Не змішуйте реактиви з різних наборів та партій. Реагенти були стандартизовані як одне ціле для даної партії. Використовуйте тільки ті реагенти, що поставляються виробником.
- Аналіз було оптимізовано для зазначеного стандартного діапазону. Не змінюйте стандартний діапазон.
- Обережно відкривайте флакони: флакони під вакуумом.
- Не вживайте ніяких компонентів набору.
- Реагенти набору містять 2-хлорацетамід в якості консерванту. 2-хлорацетамід є шкідливим при контакт з шкірою та токсичний при ковтанні. У разі нещасного випадку або якщо ви почуваетесь погано, зверніться до лікаря негайно.
- ТМБ субстрат чутливий до світла, тримайте подалі від яскравого світла. Розчин повинен бути безбарвним до використання.
- Стоп-розчин містить щавлеву кислоту і може викликати подразнення або опіки дихальної системи, шкіри та очей. Прямого контакту із шкірою та очима слід суворо уникати. Якщо виникає контакт, негайно прополоскати водою з великою кількістю води та звернутись за медичними порадами.
- Часи інкубації, температура інкубації та об'єми піпетування, крім тих, що вказані, можуть дати помилкові результати.
- Не використовуйте мікролунки повторно і не виливайте реагенти назад в пляшки.
- Поводитись з біологічними зразками як з потенційно небезпечними та такими, що здатні передавати хвороби.
- Гемолітичні, гіперліпемічні, термічно оброблені або забруднені зразки можуть давати помилкові результати.
- Використовуйте поліпропіленові пробірки для підготовки стандарту та зразків. Не використовувати полістирольні пробірки або пластини для зразків.

#### 7. ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

##### Збір та обробка

##### Плазма

Будь ласка, майте на увазі, що Пентраксин 3 людини виділяється з нейтрофілів у сироватку в процесі згортання крові. Це може призвести до хибно позитивних результатів. Тому рекомендується використовувати "обережну плазму", яку можна отримати наступним чином.

Зберігайте свіжозібрану кров на льоду. Протягом 20 хвилин після взяття крові відокремити плазму шляхом центрифугування (1500хг при 4 °С протягом 15 хв). Відділіть плазму і перемістіть у нову поліпропіленову пробірку. Будьте обережні, щоб не порушувати лейкоцитарну плівку. Повторно центрифугуйте перенесену плазму, щоб уникнути будь-якого забруднення білими кров'яними клітинами (1500хг при 4 °С протягом 15 хвилин).

Найбільш надійні результати отримуються, якщо використовується плазма EDTA.

#### Зберігання

Зберігайте зразки нижче -20 °С, переважно при -70 °С в пропіленових пробірках. Зберігання при температурі -20 °С може вплинути на відновлення Пентраксину 3 людини. Використовуйте зразки протягом 24 годин після відтавання. Уникайте кількох циклів заморожування-розморожування, які можуть спричинити втрату активності Пентраксину 3 людини і дати помилкові результати.

Не використовуйте гемолізовані, гіперліпемічні, термічно оброблені або забруднені зразки.

Перед виконанням аналізу зразки повинні бути доведені до кімнатної температури (18-25 °С) і обережно змішані. Перед початком процедури аналізу необхідно підготувати всі зразки (контролі та тестові зразки). Уникайте спінювання.

#### Процедури розведення

##### Зразки плазми

Пентраксин 3 людини можна точно виміряти, якщо зразки плазми розбавляють щонайменше 4 рази з наданим буферним розчином у поліпропіленових пробірках.

Зверніть увагу, що найбільш надійні результати отримуються з плазмою EDTA.

#### Зауваження щодо рекомендованого розведення зразка

Вказане розведення для зразків - це мінімальне розведення, і його слід використовувати як керівний принцип. Відновлення Пентраксину 3 людини з нерозбавленого зразка не становить 100% і може відрізнятися від зразка до зразка. Під час випробування менш розбавлених зразків доцільно проводити експерименти з відновлення, щоб визначити вплив матриці на виявлення Пентраксину 3 людини.

Не використовуйте полістирольні пробірки або пластини для зразків для підготовки або розведення зразків.

#### 8. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Перед використанням дозвольте всім реагентам досягти кімнатної температури (20-25 °С). Повернути у відповідні умови зберігання відразу після використання.

#### Промивний буфер

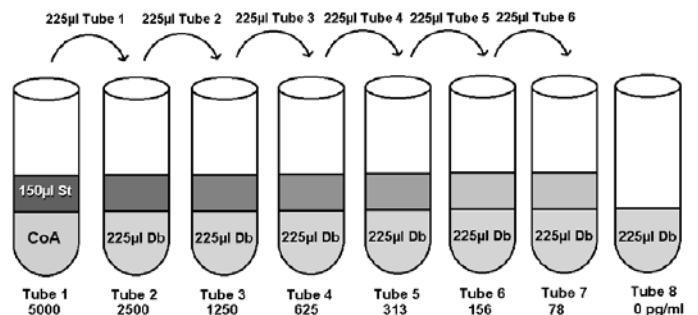
Підготувати промивний буфер змішуванням 40 мл 20-кратного концентрованого промивного буферу з 760 мл дистильованої або деіонізованої води, що достатньо для 2 x 96 тестів. У випадку, якщо потрібен менший об'єм, підготуйте бажаний об'єм промивного буфера, розбавляючи 1 частину 20-кратного промивного буфера з 19 частинами дистильованої або деіонізованої води. Концентрований промивний буфер може містити кристали. Якщо кристали не зникають при кімнатній температурі протягом 1 години, концентрований промивний буфер можна нагріти до 37 °С.

#### Буфер для розведення

Підготувати буфер для розведення, змішавши 10 мл 10-кратного буферу для розведення з 90 мл дистильованої або деіонізованої води, що достатньо для 2 x 96 тестів. У випадку необхідності меншого об'єму готують бажаний об'єм буферу для розведення, розбавляючи 1 частину 10-кратного буферу розведення з 9 частинами дистильованої або деіонізованої води. Концентрований буфер для розведення може містити кристали. У випадку, якщо кристали не зникають при кімнатній температурі протягом 1 години, концентрований буфер для розведення можна нагріти до 37 °С. Не трясати розчин.

#### Стандартний розчин

Стандарт відновлюють шляхом піпетування 0,5 мл дистильованої або деіонізованої води. Після відновлення стандарт стабільний протягом 12 годин. Для довшої стабільності ми рекомендуємо зберігати аликвоти при температурі -20 °С. Підготувати кожен стандарт Пентраксину 3 людини у поліпропіленових пробірках шляхом серійного розбавлення відновленого стандарту з буфером для розведення, як показано на малюнку 1\*.



Малюнок 1

### Трейсерний розчин

Трейсер відновлюють шляхом піпетування 1 мл дистильованої або деіонізованої води. Розбавте відновлений 1 мл трейсера з 11 мл буферного розчину, що достатньо для 1 x 96 тестів. У випадку, якщо потрібно менше об'єму, підготуйте бажаний об'єм трейсера, розбавляючи 1 частину відновленого трейсера з 11 частинами буферу для розведення.

### Розчин стрептавідин-пероксидази

Стрептавідин-пероксидазу відновлюють піпетуванням 1 мл дистильованої або деіонізованої води. Розбавте відновлену 1мл стрептавідин-пероксидазу з 23 мл буфера для розведення, що достатньо для 2x96 тестів. У випадку, коли потрібен менший об'єм, готують необхідний об'єм розчину стрептавідин-пероксидази, розбавляючи 1 частину відновленої стрептавідин-пероксидази з 23 частинами буферу для розведення.

### 9. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед використанням довести всі реагенти до кімнатної температури (20-25 °C).

1. Визначити кількість необхідних тестових лунок, помістити необхідні смужки в рамку та заповнити лист збору даних. Повернути невикористані смужки на зберігання; зберігати при температурі від 2 до 8 °C.
2. Внести по 100 мкл у двох примірниках стандарту, зразків або контролів в відповідні лунки. Не торкатись боків або дна лунок.
3. Накрити лоток і постукати по ньому, щоб видалити будь-які повітряні бульбашки. Будьте обережні, щоб не забризкати кришку.
4. Інкубувати смужки або пластину протягом 1 години при 37 °C.
5. Промити пластини 4 рази промивним буфером використовуючи планшетний вошер або наступним чином\*:
  - a. Обережно зняти кришку, уникаючи розбризкування.
  - b. Видалити вміст пластини перевертанням та витрушуванням вмісту над раковиною, тримати перевернутою інверсією та просушити на товстий шар серветок.
  - c. Додати 200 мкл буферу для промивання в кожен лунку, зачекати 20 секунд, видалити вміст пластини як описано в 5b.
  - d. Повторити процедуру промивання 5b/5c тричі.
  - e. Видалити вміст пластини і обережно потрусити на товстий шар серветок.
6. Додати 100 мкл розбавленого трейсера в кожен лунку, використовуючи той самий порядок, який застосовано в кроці 2. Не торкатись боків або дна лунок.
7. Накрити лоток та інкубувати його протягом 1 години при кімнатній температурі.
8. Повторити процедуру промивання, описану в кроці 5.
9. В кожен лунку внести по 100 мкл розведеної стрептавідин-пероксидази, використовуючи той самий спосіб піпетування, який застосовано в кроці 2. Не торкатись боків або дна лунок.
10. Закрити лоток та інкубувати лоток протягом 1 години при кімнатній температурі.
11. Повторити процедуру промивки, описану в кроці 5.
12. В кожен лунку внести 100 мкл субстрату ТМБ, використовуючи той самий порядок внесення, який застосовується в кроці 2. Не торкатись боків або дна лунок.
13. Накрити лоток та інкубувати його протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Уникати впливу на смужки прямого сонячного світла. Рекомендується покривати пластину алюмінієвою фольгою.
14. Зупинити реакцію, додаючи 100 мкл стоп-розчину з тією ж послідовністю та термінами, які використовуються в кроці 12. Ретельно перемішати розчини в лунках, обережно повертаючи пластину. Обережно постукати по пластині, щоб уникнути будь-яких повітряних бульбашок, що потрапили в лунки.
15. Зчитати планшет протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину при 450 нм за допомогою рідера, дотримуючись інструкцій, наданих виробником приладу.

\*) У випадку використання планшетного вошера, зверніть увагу: використання планшетного вошера може призвести до завищення значень фону і зниження чутливості. Ми радимо перевірити планшетний вошер з ручною процедурою. Переконайтеся, що планшетний вошер використовується як вказано для ручного методу. Додатковий промивний буфер можна замовити окремо. Зверніться до свого місцевого дистриб'ютора.

### 10. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

- Обчислити середню абсорбцію для кожного набору дублікатів стандартів, контролю та зразків.
- Якщо окремі значення абсорбції відрізняються більше ніж на 15% від відповідного середнього значення, результат вважається недійсним, і зразок має бути повторно перевірений.

- Середнє поглинання нульового стандарту повинно бути менше 0,3.
- Побудувати стандартну криву, використовуючи комп'ютерне програмне забезпечення. Середнє поглинання для кожної концентрації стандарту відкладається на вертикальній (Y) осі проти відповідної концентрації на горизонтальній (X) осі (логірифічна шкала).
- Якщо зразки були розбавлені, концентрація, прочитана зі стандартної кривої, повинна бути помножена на коефіцієнт розведення.
- Зразки, які дають середню абсорбцію вище абсорбції для найвищої стандартної концентрації, не входять в діапазон аналізу. Ці зразки повинні бути аналізовані повторно при більш високому розведенні.

### 11. ТЕХНІЧНІ ПОРАДИ

- Користувач повинен бути підготовлений і знайомий з ІФА та процедурою випробувань.
- Якщо ви не знайомі з технікою ІФА, рекомендується виконати пробний аналіз до тестування зразків. Проводити аналіз зі стандартною кривою тільки згідно з інструкціями.
- Неправильна або недостатня промивка на будь-якій стадії процедури призведе або до хибно позитивних, або хибно негативних результатів. Повністю видалити вміст лунок перед внесенням промивного буфера, заповнювати промивним буфером, як зазначено для кожного циклу і не дозволяти лункам залишатися непокритими або сухими протягом тривалого періоду.
- Оскільки певні умови можуть відрізнятися від аналізу до аналізу, стандартна крива повинна бути побудована для кожного аналізу. Зразки слід перевіряти зі стандартної кривої, підготовленої на тій же пластині.
- Не змішувати реагенти з різних партій або з іншими реагентами і смужками. Залишки не слід змішувати з вмістом щойно відкритого флакону.
- Кожен раз, коли набір використовується, свіжі розведення стандарту, зразка, індикатора, стрептавідин-пероксидази і буферів повинні бути приготовлені.
- Ковпачки та флакони не є взаємозамінними. Ковпачками закривати тільки відповідні флакони.
- Щоб уникнути перехресного забруднення, міняти наконечники для додавання реагентів для кожного стандарту, між додаванням зразків, а також між додаванням реагенту. Крім того, використовуйте окремі резервуари для кожного реагенту.
- Утилізація відходів повинна проводитися відповідно до правил лабораторії.

### 12. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Сертифікат контролю якості, що поставляється з набором, є специфічним для партії і використовується для перевірки результатів, отриманих вашою лабораторією. Значення поглинань, зазначених в Сертифікаті контролю якості, будуть використовуватися тільки в якості орієнтира. Результати, отримані Вашою лабораторією, можуть відрізнятися. Цей тест призначений для усунення інтерференцій від розчинних рецепторів, зв'язуючих білків, і інших чинників, присутніх в біологічних зразках. До тих пір, поки всі фактори не будуть протестовані імуноферментним аналізом Hycult Biotech, можливості інтерференції не можуть бути виключені. Для оптимальної роботи даного набору рекомендується дотримуватись належної лабораторної практики.

### 13. УСУНЕННЯ ПРОБЛЕМ

Гарантійні претензії та скарги щодо недоліків необхідно пред'являти до закінчення терміну придатності продукту. Письмову скаргу, яка містить номер партії товару і експериментальні дані, відправити на електронну адресу support@hycultbiotech.com.

Пропозиції, наведені нижче в таблиці 2, можуть бути використані тільки в якості орієнтира в разі несподіваних результатів аналізу.

Низька абсорбція	Висока абсорбція	Слабк і копії	Всі лунки позитивні	Всі лунки негативні	Можлива причина
.	.	.	.	.	Матеріали набору або реагенти забруднені або закінчився їх термін придатності
.	.	.	.	.	Використовуються неправильні реагенти
.	.	.	.	.	Ліофілізовані реагенти не відновлені як слід
.	.	.	.	.	Некоректні розведення або помилки піпетування
.	.	.	.	.	Невідповідні пластикові матеріали використовувалися для підготовки стандарту //або зразків

.	.				Помилковий час інкубації або температура
		.			Особливо в разі інкубації при 37 °С: пластини не інкубували рівномірно
.					Аналіз проводився раніше, ніж реагенти були приведені до кімнатної температури
.	.	.	.	.	Не дотримувалася процедура тестування
				.	Пропущений реагент або крок
		.			Погане перемішування зразків
	.		.		Низька якість води
	.	.			Смужки залишилися незволоженими занадто довго під час/після промивання
	.	.	.		Погана промивка
	.	.			Перехресне забруднення від інших зразків або позитивного контролю
		.	.		ТМВ розчин непрозорий або безбарвний
.	.				Невірний фільтр в зчитувальному пристрої мікропланшетів
	.	.			Повітряні бульбашки
		.			Неточне запечаткування планшета після використання
.					Неправильні умови зберігання
.					Лампа в зчитувальному пристрої не функціонує оптимально



**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)