

НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИМІРУ ЛЮДСЬКОГО АДИПОНЕКТИНУ

RD195023100, Human Adiponectin ELISA

Каталог. №: RD195023100

Методика від 15-09-2014

Кількість : 96

Версія 001.A

Виробник : BioVendor (Німеччина-Чехія)



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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір ІФА RD195023100 людський Адипонектин являє собою імуноферментний аналіз типу «сандвіч» для кількісного виміру людського Адипонектину.

» Особливості

- **Європейський Союз:** для використання в in-Vitro діагностиці
- **Решта світу:** тільки для дослідницьких цілей!
- Загальний час аналізу менше 3 годин
- За допомогою набору можна визначити Адипонектин в сироватці та плазмі (ЕДТА, цитрат, гепарин)
- Формат аналізу складається з 96 лунок
- Контролі якості на основі людської сироватки
- Стандарт на основі рекомбінантного білка
- Компоненти набору, що постачаються, готові до використання, концентровані або ліофілізовані

2. ЗБЕРІГАННЯ, ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

Зберігайте весь набір при 2-8 °С. У цих умовах набір стабільний до закінчення терміну придатності (див. етикетку на коробці).

Дані щодо стабільності відкритих реагентів наведені в Розділі 9.

3. ВСТУП (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

4. ПРИНЦИП ТЕСТУ

В даному аналізі стандарти, контролі якості та зразки інкубують в мікропланшетних лунках, попередньо покритих рекомбінантним людським Адипонектином і поліклональним анти-людським антитілом Адипонектину, кон'югованого з пероксидазою хрому. Після промивання HRP кон'югат, зв'язаний з адипонектином, нанесеним в лунки, реагує з розчином субстрату. Реакцію зупиняють додаванням кислого розчину і вимірюється оптична щільність отриманого продукту жовтого кольору. Оптична щільність обернено пропорційна концентрації Адипонектину. Стандартна крива будується відкладанням величин оптичної щільності проти концентрацій стандартів, і концентрації невідомих зразків визначають з використанням цієї стандартної кривої.

5. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- **Тільки для професійного використання**
- Використовуйте рукавички та лабораторні халати при роботі з імунодіагностичними матеріалами
- Не пити, не їсти і не курити в тих зонах, де знаходяться імунодіагностичні матеріали
- Цей набір містить компоненти людського походження. Ці матеріали були знайдені такими, що не мають реакції на HBsAg, антитіла ВГС і ВІЛ 1/2 антигену. Тим не менше, ці матеріали повинні розглядатися як потенційно інфіковані, тому, що жоден тест не може гарантувати повну відсутність інфекційних агентів
- Цей набір містить компоненти тваринного походження. Ці матеріали повинні бути оброблені як потенційно інфіковані
- Уникайте контакту з кислим стоп-розчином і розчином субстрату, що містять перекис водню і Тетраметилбензидин (ТМВ). Одягайте рукавички і захист для очей та захисний одяг при роботі з цими реагентами. Стоп і/або Розчин субстрату можуть викликати шкірні подразнення/подразнення очей. У разі контакту зі стоп-розчином і розчином субстрату промити ретельно шкіру/очі водою та звернутись за медичною допомогою, коли це необхідно
- Матеріали не повинні піпетуватись ротом

6. ТЕХНІЧНІ ПОРАДИ

- Реагенти з різних серій не слід змішувати
- Використовувати ретельно вимитий скляний посуд
- Використовувати деіонізовану (дистильовану) воду, що зберігається в чистих ємностях
- Уникати забруднення серед зразків і реагентів. Для цього одноразові наконечники повинні використовуватися для кожного зразка і реагенту
- Розчин субстрату повинен залишатися безбарвним, поки він не доданий в планшет. Тримайте розчин субстрату в захищеному від світла місці
- Стоп-розчин повинен залишатися безбарвним, поки він не доданий в планшет. Колір, розвинений в лунках, зміниться з синього на жовтий відразу після додавання стоп розчину. Лунки зеленого кольору вказують на те, що Стоп-розчин не перемішався з розчином субстрату належним чином
- Утилізацію витратних матеріалів і невикористаного матеріалу проводити відповідно до чинних державних нормативних вимог

7. РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ

Склад набору	Стан	Кількість
Мікروتитраційні смужки, вкриті Антитілами	готові до використання	96 лунок
Розчин Кон'югату	готовий до використання	7 мл
Набір Стандартів	концентровані	7 x 0.22 мл
Контроль якості ВИСОКИЙ	готовий до використання	0.4 мл
Контроль якості НИЗЬКИЙ	готовий до використання	0.4 мл
Буфер для розведення	готовий до використання	2 x 13 мл
Розчин для промивання Конц. (10x)	концентрований	100 мл
Розчин субстрату	готовий до використання	2 x 13 мл
Стоп розчин	готовий до використання	9 мл
Лист технічних даних + сертифікат аналізу	----	1 шт.

8. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Деіонізована (дистильована) вода
- Пробірки для розведення зразків
- Скляний посуд (мірний циліндр і пляшка) для Розчину для промивання (Буферу для розведення)
- Точні піпетки на 10-1000 мкл з одноразовими наконечниками
- Багатоканальна піпетка на 50-200 мкл з одноразовими наконечниками
- Абсорбуючий матеріал (наприклад, паперові рушники) для промокання планшету після миття
- Вортекс
- Орбітальний шейкер на 300 об/хв
- Мікропланшетний вошер (опційно). [Ручна промивка можлива, але не є бажаною.]
- Мікропланшетний рідер з фільтром 450±10 нм, переважно з контрольною довжиною хвилі 630 нм (як альтернатива ще один з інтервалу 550-650 нм)
- Програмне забезпечення для аналізу даних (опційно)

9. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

- » **Всі реагенти повинні бути доведені до кімнатної температури перед використанням**
- » **Завжди готуйте тільки відповідну кількість реагентів для тесту**
- » **Не використовуйте компоненти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці**

- **Аналітичні реагенти, що постачаються, і готові до застосування:**

Мікротитрувальні смужки з попереднім покриттям

Стабільність і зберігання:

Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет з осушувачем і запечатайте ретельно. Смужки залишаються стабільними 3 місяці при зберіганні при температурі 2-8 °С в захищеному від вологи місці.

Розчин кон'югату

Буфер для розведення

Розчин субстрату

Стоп Розчин

Стабільність і зберігання:

Відкриті реагенти стабільні 3 місяці при зберіганні при температурі 2-8 °С.

Контролі якості ВИСОКИЙ, НИЗЬКИЙ

Зверніться до сертифіката аналізу за даними щодо концентрації Контролю якості!!!

Контролі готові до використання, не розводити їх. (контролі

постачаються розведеними 30x).

Стабільність і зберігання:

Відкриті Контролі стабільні 3 місяці при зберіганні при температурі 2-8 °C.

Не зберігайте відновлені Контролі Якості.

Примітка:

Концентрація речовини в Контролях Якості не повинна ніяким чином асоціюватися з нормальною та/або патологічною концентраціями в сироватці або іншій рідині організму. Контролі Якості використовуються тільки для контролю, що комплект працює відповідно до PDS і CoA і що ІФА проводили належним чином.

• Аналітичні реагенти, що поставляються концентрованими:

Стандарти Людського Адипонектину

Розбавити концентровані стандарти 3x буфером для розведення перед використанням в ІФА, наприклад: 50 мкл стандарту + 100 мкл буфера для розведення для дублікатів. **Добре перемішати** (без піноутворення).

Стабільність та зберігання:

Відкриті Стандарти є стабільними 3 місяці при зберіганні при температурі 2-8 °C.

Не зберігати розведені розчини Стандарту.

Концентрат Розчину для промивання (10x)

Розвести Концентрат Промивного розчину (10x) в десять разів з дистильованою водою, щоб підготувати робочий розчин 1x. Приклад: 100 мл Концентрату Промивного розчину (10x) + 900 мл дистильованої води для використання всіх 96-лунок.

Стабільність і зберігання:

Розведений Промивний розчин стабільний 1 місяць при зберіганні при температурі 2-8 °C. Відкритий Концентрат Розчину для промивання (10x) є стабільним 3 місяці при зберіганні при температурі 2-8 °C.

10. ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Набір призначений для визначення людського Адипонектину в сироватці та плазмі (EDTA, цитрат, гепарин).

Зразки повинні бути проаналізовані відразу після збору або мають зберігатись при температурі -20 °C. Ретельно перемішати розморожені зразки безпосередньо перед аналізом і уникати повторних циклів заморожування/відтавання, які можуть викликати помилкові результати. Уникайте використання гемолізованих або ліпемічних зразків.

Розвести зразки 30x з Буфером для розведення безпосередньо перед виконанням аналізу, наприклад 10 мкл зразка + 290 мкл Буфера для розведення для одиночного аналізу, або 100 мкл зразка + 200 мкл Буфера для розведення для аналізу в дублях.

Добре перемішати (без піноутворення). Vortex рекомендується.

Стабільність і зберігання:

Зразки слід зберігати при -20 °C, або при температурі -70 °C для тривалого зберігання. Уникати циклів повторного заморожування/розморожування.

Не зберігайте розбавлені зразки.

Див. Розділ 13 щодо даних про стабільність зразків сироватки і плазми при зберіганні при температурі 2-8 °C, ефект заморожування/відтавання і впливу матриці зразка (сироватка/плазма) на концентрацію людського Адипонектину.

Примітка: Рекомендується використовувати прецизійну піпетку і ретельну техніку проведення аналізу, щоб виконати розбавлення, для отримання точних результатів.

11. ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

1. Внести **50 мкл** розведених Стандартів, Контролей якості, Буфера для розведення (= Бланк) і зразків, бажано в дублях, у відповідні лунки. Див. *Малюнок 1* для прикладу робочого листа.
2. Додати **50 мкл** Розчину Кон'югату в кожен лунку.
3. Інкубувати при **КТ** протягом **2 годин**, струшуючи при 300 об/хв.
4. Вимити лунки 3 рази Розчином для промивання (0.35 мл на лунку). Після останньої промивки, інвертувати і постукувати планшетом по паперовому рушнику.
5. Додати **200 мкл** Розчину субстрату в кожен лунку. Не піддавати планшет дії прямих сонячних променів. Рекомендується накрити пластину алюмінієвою фольгою.
6. Інкубувати протягом **10-15 хвилин** при кімнатній температурі. Інкубаційний період може бути продовжений [20 хвилин], якщо температура реакції нижче ніж 20 °C. Не струшуйте пластину під

час інкубації.

7. Зупинити розвиток кольору додаванням **50 мкл** Стоп-розчину.
8. Визначити оптичну щільність кожної лунки на планшетному рідері з довжиною хвилі 450 нм, бажано з еталонною довжиною хвилі, встановленою на 630 нм (прийнятний діапазон: 550-650 нм). Відняти покази при 630 нм (550-650 нм) від показів при довжині хвилі 450 нм. **Оптична щільність повинна бути зчитана протягом 5 хвилин після кроку 12.**

Примітка: Якщо деякі зразки і стандарт/и мають оптичної щільності вище верхньої межі вашого зчитувача, виконати друге зчитування на довжині хвилі 405 нм. **Нова стандартна крива, побудована за допомогою значень, виміряних при 405 нм, використовується для визначення концентрації Адипонектину стандартів і зразків зі значеннями, що «зашкалюють».** Покази на довжині хвилі 405 нм не повинні замінювати покази для зразків, які були "в діапазоні" при 450 нм.

Примітка 2: Ручне промивання: Аспірувати лунки і піпетувати 0.35 мл Розчину для промивання в кожен лунку. Аспірувати лунки і повторити двічі. Після останньої промивки, інвертувати і постукувати планшетом об паперовий рушник. Переконайтеся, що промивний розчин був видалений повністю.

	Смушка 1+2	Смушка 3+4	Смушка 5+6	Смушка 7+8	Смушка 9+10	Смушка 11+12
A	Стандарт 10	QC Високий	Зразок7	Зразок 15	Зразок 23	Зразок 31
B	Стандарт 5	QC Низький	Зразок8	Зразок 16	Зразок 24	Зразок 32
C	Стандарт 2	Зразок 1	Зразок 9	Зразок 17	Зразок 25	Зразок 33
D	Стандарт 1	Зразок 2	Зразок 10	Зразок 18	Зразок 26	Зразок 34
E	Стандарт 0.5	Зразок 3	Зразок 11	Зразок 19	Зразок 27	Зразок 35
F	Стандарт 0.2	Зразок 4	Зразок 12	Зразок 20	Зразок 28	Зразок 36
G	Стандарт 0.1	Зразок 5	Зразок 13	Зразок 21	Зразок 29	Зразок 37
H	Бланк	Зразок 6	Зразок 14	Зразок 22	Зразок 30	Зразок 38

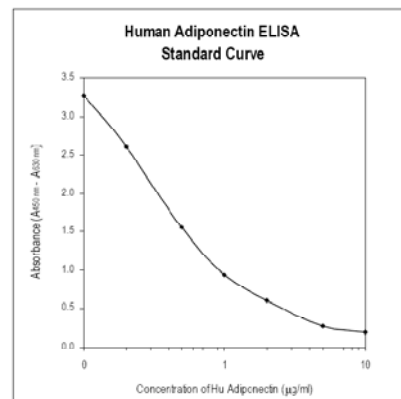
Малюнок 1: Приклад робочого листа.

12. РОЗРАХУНКИ

Більшість мікропланшетних зчитувачів виконують автоматичні розрахунки концентрації аналізованої речовини. Стандартна крива будується з відкладанням середньої величини абсорбції (Y) Стандартів проти відомої концентрації (X) Стандартів у логарифмічній шкалі, за допомогою 4-параметрового алгоритму. Результати представлені як концентрації Адипонектину мкг/мл у зразках.

Крім того, функція *logit log* може бути використана для лінеаризації стандартної кривої, тобто *logit* середньої оптичної щільності (Y) представлено в залежності від логарифма відомої концентрації (X) стандартів.

Виміряна концентрація зразків, розрахована з калібрувальної кривої, повинна бути помножена на коефіцієнт розведення 10, так як стандарти були розведені 3x і зразки та контролі були розведені 30x, наприклад, 1.05 мкг/мл (зі стандартної кривої) x 10 (коефіцієнт розбавлення) = 10.5 мкг/мл.



Малюнок 2: Типова Стандартна крива для ІФА людського Адипонектину

13. ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

» Типові аналітичні дані для набору BioVendor людський Адипонектин ELISA представлені в цьому розділі

• Чутливість

Межа виявлення (LOD) (визначається як концентрації аналіту, який дає оптичну щільність вище, ніж середнє значення оптичної щільності бланка* плюс три стандартних відхилення оптичної щільності бланка: $A_{\text{blank}} + 3 \times SD_{\text{blank}}$) розраховується виходячи з реальних значень людського Адипонектину в лунках і становить 26 нг/мл.

* Буфер для Розведення піпетується в лунки бланк.

• Межа аналізу

Аналізи з результатами, що перевищують рівень Адипонектину 100 мкг/мл, слід повторити з більш розбавленими зразками (наприклад, 60x). Коефіцієнт розведення повинен бути прийнятий до уваги при розрахунку концентрації Адипонектину.

• Специфічність

Антитіла, які використовуються у цьому ІФА, є специфічними для людського Адипонектину.

Аналіз розпізнає природний і рекомбінантний людський Адипонектин (повнометражний білок, змінений мутацією тільки-формуєчий тример білка, і глобулярний домен).

Визначення Адипонектину не інтерферує з гемоглобіном (1.0 мг/мл), білірубін (170 мкмоль/л) і тригліцидами (5.0 ммоль/л).

Адипонектин був виміряний в деяких екстрактах з жирової тканини, проте більшість з рівнів екстракту Адипонектину нижче межі виявлення для аналізу. Перехресної реактивності не спостерігали для людського лептину, рецептора лептину та резистину при 100 нг/мл.

Сироватки від деяких ссавців були аналізовані з цим набором. Дивись результати нижче.

Для отримання додаткової інформації, будь ласка, зв'яжіться з нами по info@biovendor.com.

Зразок сироватки ссавця	Перехресна реактивність
Бичачий	Немає
Кіт	Немає
Собака	Немає
Коза	Немає
Хом'як	Немає
Кінь	Немає
Мавпа	Є
Миша	Немає
Свиня	Немає
Кріль	Немає
Щур	Немає
Вівця	Немає

» Представлені результати множаться на відповідний коефіцієнт розбавлення

• Точність

Внутрішньосерійна (В аналізі) (n = 8)

Взорець	Середнє (мкг/мл)	SD (мкг/мл)	CV (%)
1	11.71	0.69	5.9
2	12.28	0.481	3.9

Міжсерійна (Між аналізами) (n = 8)

Взорець	Середнє (мкг/мл)	SD (мкг/мл)	CV (%)
1	8.23	0.52	6.3
2	19.86	1.39	7.0

• Відновлення після насичення

Зразки сироватки були насичені різними кількостями Адипонектину і проаналізовані.

Взорець	Отримане (мкг/мл)	Очікуване (мкг/мл)	Відновлення От/Оч (%)
1	5.10	-	-
	10.39	10.10	102.9
	15.57	15.10	103.1
	23.19	25.10	92.4
2	10.94	-	-
	16.18	15.94	101.5
	21.14	20.94	101.0
	30.02	30.94	100.3
	-	-	-

• Лінійність

Зразки сироватки були серійно розведені Буфером для розведення і проаналізовані.

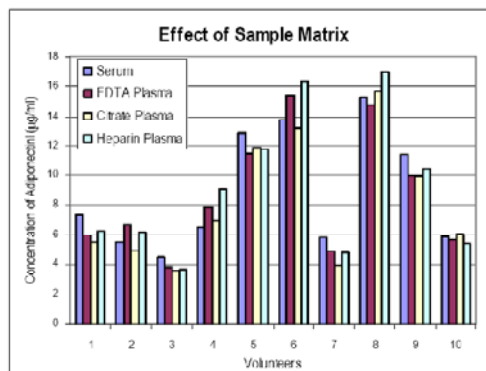
Взорець	Розведення	Отримане (мкг/мл)	Очікуване (мкг/мл)	Відновлення От/Оч (%)
1	--	18.05	-	-
	2x	9.28	9.02	102.8
	4x	4.39	4.51	97.3
	8x	2.53	2.26	112.7
2	--	23.56	-	-
	2x	10.15	11.78	86.2
	4x	5.64	5.89	95.8
	8x	3.08	2.94	104.5

• Вплив матриці зразка

ЕДТА, цитратна і гепаринова плазми були порівняні з відповідними зразками сироватки тих самих 10 осіб.

Результати наведені нижче:

Волонтер	Сироватка (мкг/мл)	Плазма (мкг/мл)		
		ЕДТА	Цитратна	Гепаринова
1	7.37	6.01	5.52	6.23
2	5.52	6.71	4.97	6.19
3	4.57	3.84	3.63	3.67
4	6.57	7.87	6.98	9.05
5	12.89	11.54	11.88	11.83
6	13.72	15.42	13.20	16.32
7	5.82	4.88	3.95	4.81
8	15.29	14.74	15.66	16.97
9	11.43	10.03	9.95	10.44
10	5.93	5.71	6.05	5.39
Середнє (мкг/мл)	8.9	8.7	8.2	9.4
Середнє Плазма/Сироватка (%)	-	97.4	91.8	105.6
Коефіцієнт детермінації R²	-	0.92	0.96	0.91



Малюнок 3: Рівні Адипонектину, виміряні за допомогою Human Адипонектин ELISA у 10 пацієнтів, з використанням сироватки, ЕДТА, цитратної і гепаринової плазми, відповідно.

• Стабільність зразків, що зберігаються при 2-8 °C

Зразки слід зберігати при температурі -20 °C. Проте, зниження концентрації Адипонектину не спостерігалось в зразках сироватки та плазми після 7 днів при зберіганні при температурі 2-8 °C. Щоб уникнути мікробного забруднення, зразки обробляли ε-амінокапроновою кислотою і азидом натрію, в результаті чого кінцеві концентрації склали 0.03% і 0.1%, відповідно.

Взорець	Температура інкубації, Період	Сироватка (мкг/мл)	Плазма (мкг/мл)		
			ЕДТА	Цитратна	Гепаринова
1	-20 °C	2.01	2.08	1.79	1.16
	2-8 °C, 1 день	2.07	1.89	1.69	1.85
	2-8 °C, 7 днів	1.86	1.89	1.64	1.67
2	-20 °C	7.30	6.76	6.56	5.78
	2-8 °C, 1 день	7.24	6.83	6.39	6.20
	2-8 °C, 7 днів	7.10	7.07	5.87	6.20
3	-20 °C	10.72	15.13	11.75	11.02
	2-8 °C, 1 день	10.99	13.65	12.36	10.89
	2-8 °C, 7 днів	12.16	13.38	10.59	10.48

• Вплив заморожування/розморожування

Не спостерігалось зниження концентрації людського Адипонектину в зразках сироватки та плазми після неодноразових (5x) циклів заморожування/відтавання. Однак рекомендується, уникати

непотрібного повторного заморожування/відтавання зразків.

Взірець	Кількість циклів з/в	Сироватка (мкг/мл)	Плазма (мкг/мл)		
			ЕДТА	Цитратна	Гепаринова
1	1x	7.17	7.88	6.25	7.47
	3x	7.38	8.99	7.88	8.98
	5x	6.87	10.31	7.98	10.57
2	1x	10.86	13.16	10.83	10.60
	3x	13.53	14.47	13.21	11.51
	5x	11.23	11.22	8.64	10.96
3	1x	10.66	8.80	8.66	9.17
	3x	9.52	10.34	9.09	8.75
	5x	10.13	8.54	9.26	8.89

14. ВИЗНАЧЕННЯ СТАНДАРТУ

Рекомбінантний людський Адипонектин використовується в якості Стандарту. Рекомбінантний людський Адипонектин виробляється в клітинній лінії НЕК293 і містить 225 амінокислотних залишків людського Адипонектину і 8 додаткових АА.

15. ПОПЕРЕДНІ ДАНІ ПО НАСЕЛЕННЮ І КЛІНІЧНИМ РЕЗУЛЬТАТАМ

• Нормальні значення

Наступні результати були отримані, коли зразки сироватки від 335 здорових донорів аналізували з набором ІФА BioVendor Людський Адипонектин.

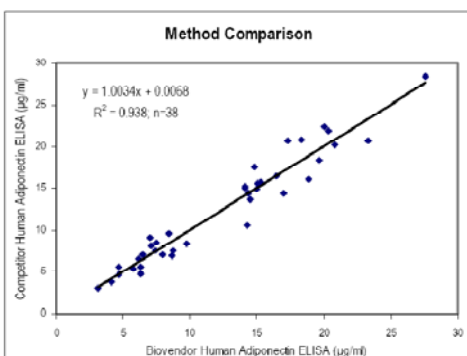
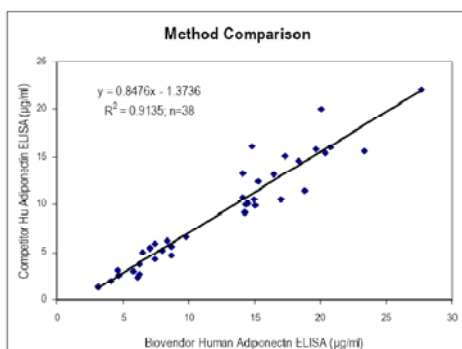
Gender	BMI (kg/m ²)	n	Mean (µg/ml)	SD (µg/ml)
Men	< 25	41	10.9	4.0
	25-30	52	8.8	4.0
	> 30	23	8.3	2.8
	total	115	9.5	3.9
Women	< 25	92	13.6	5.4
	25-30	56	13.9	8.6
	> 30	57	11.4	3.8
	total	220	13.2	6.1

• Референсний діапазон

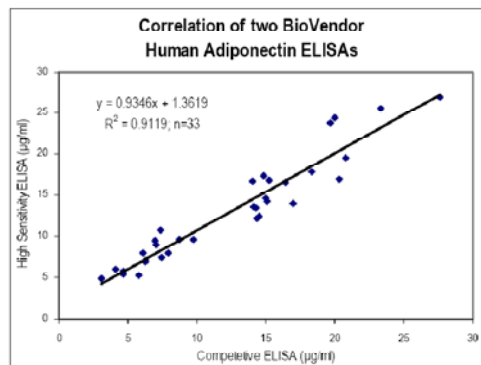
Дані, наведені в цій інструкції, повинні використовуватися тільки для керівництва. Рекомендуються, щоб кожна лабораторія включала власну панель контрольних зразків в аналізі. Кожна лабораторія повинна встановити власні нормальні і патологічні норми, характерні для рівнів Адипонектину з аналізом.

16. Порівняння методів

Набір ІФА BioVendor людський Адипонектин порівняно з іншими комерційними імуноаналізами шляхом аналізу 38 зразків сироватки, в двох різних ELISA. Були отримані наступні кореляційні графіки:



Набір ІФА BioVendor людський Адипонектин високої чутливості (сендвіч ELISA, RD191023100) порівнювали з Набором ІФА BioVendor людський Адипонектин (конкурентний ELISA, RD195023100), шляхом вимірювання 33 зразків сироватки. Наступне співвідношення було отримано:



16. УСУНЕННЯ НЕПОЛАДОК І ПИТАННЯ, ЯКІ НАЙЧАСТІШЕ ЗАДАЮТЬСЯ

» Слабкий сигнал у всіх лунках

Можливі пояснення:

- Пропущений реагент або крок
- Неправильне приготування або зберігання реагенту
- Аналіз виконується до того, як реагенти були приведені до кімнатної температури
- Неправильна довжина хвилі при зчитуванні абсорбції

» Високий сигнал і фон у всіх лунках

Можливі пояснення:

- Неправильне або недостатнє промивання
- Перетримка; Інкубаційний період з Розчином Субстрату повинен бути знижений до додавання Стоп-розчину
- Температура інкубації понад 40 °C

» Високий коефіцієнт варіації (КВ)

Можлива причина:

- Неправильне або недостатнє промивання
- Неправильне змішування Стандартів, Контролів якості або зразків



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