

НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА ПЕРИФЕРІЙНОГО МІЄЛІНУ 22 (PMP22)

SEC746Hu, Peripheral Myelin Protein 22 (PMP22)

Каталог. №: **SEC746Hu**

Методика від **07-2013**

Кількість : **96**

Версія **11**

Виробник : **Cloud-Clone Corp., (США)**



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

ПРИЗНАЧЕННЯ

Даний набір є імуноферментним аналізом типу "сандвіч" для кількісного in-Vitro визначення PMP22 в гомогенатах тканин людини, клітинних лізатах та інших біологічних рідинах.

РЕАГЕНТИ ТА МАТЕРІАЛИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ

Реагенти	Кількість
Готовий до використання, 96-лунковий смужковий планшет з попереднім покриттям	1
Стандарт	2
Реагент для детекції А	1 x 120 мкл
Реагент для детекції В	1 x 120 мкл
Субстрат ТМБ	1 x 9 мл
Промивний Буфер (30x Концентрат)	1 x 20 мл
Плівка для заклеювання планшетів	4
Розріджувач стандартів	1 x 20 мл
Реагент Детекції А	1 x 12 мл
Реагент Детекції В	1 x 12 мл
Стоп Розчин	1 x 6 мл
Інструкція	1

НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. Мікропланшетний зчитувач з 450 ± 10 нм фільтром.
2. Точні одно- або багатоканальні піпетки та одноразові наконечники.
3. Пробірки Еппендорфа для розбавлення зразків.
4. Деіонізована або дистильована вода.
5. Фільтрувальний папір для промокання планшета.
6. Контейнер для Промивного розчину.

ЗБЕРІГАННЯ НАБОРІВ

1. **Для нерозкритих наборів:** Всі реагенти повинні зберігатися згідно з інформацією, вказаною на флаконах. **Стандарт, Реагент для детекції А, Реагент для детекції В і планшет** повинні зберігатися при температурі - 20 ° при отриманні, а інші повинні зберігатися при 4 °С.
2. **Для відкритих наборів:** після відкриття набору реагенти як і раніше повинні зберігатися відповідно до вищезазначених умов зберігання. Крім того, будь ласка, поверніть невикористані смужки в пластикову упаковку, яка містить осушувач, і щільно закрийте її.

Примітка:

Рекомендується використовувати залишки реагентів протягом 1 місяця за умови, що не закінчився термін придатності набору. Термін придатності набору вказаний на етикетці на упаковці набору. Всі компоненти стабільні до закінчення терміну його дії.

ЗАБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Гомогенати тканин - Приготування тканинних гомогенатів буде змінюватися в залежності від типу тканини. Для цього тесту тканини промивали в охолодженому льодом PBS (0.01 моль/л, рН 7.0-7.2), щоб видалити надлишок крові і ретельно зважили перед гомогенізацією. Подрібнені тканини гомогенізують в 5-10 мл PBS за допомогою скляного гомогенізатора на льоду. Отриману суспензію обробляють ультразвуком за допомогою ультразвукового клітинного дезінтегратора або піддають двом циклам заморожування-відтавання для подальшого порушення клітинних мембран. Після цього гомогенат центрифугують протягом 5 хвилин при 5000 x g. Видаляють супернатант та аналізують негайно або аліквотують і зберігають при ≤ -20 °С.

Клітинні лізати - Клітини повинні бути лізовані перед аналізом у відповідності з наступними кроками.

1. Клітини, що прилипли, повинні бути відокремлені за допомогою трипсину і потім зібрані центрифугуванням (суспензійні клітини можуть бути зібрані шляхом центрифугування безпосередньо).
2. Промити клітини тричі в холодному PBS.
3. Ресуспендувати клітини в PBS (1x); клітини підлягають обробці ультразвуком протягом 4 разів (або заморозити клітини при ≤-20 °С. Розморозити клітини при обережному перемішуванні. Повторити цикл заморожування/відтавання протягом 3 разів)
4. Центрифугувати при 1500 x g протягом 10 хвилин при 2-8 °С для видалення клітинного сміття.

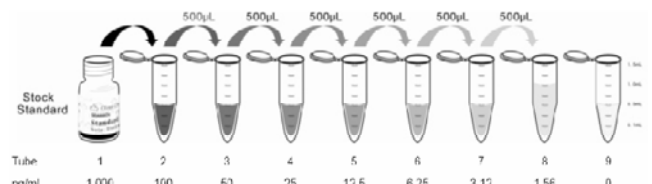
Інші біологічні рідини - Центрифугувати зразки протягом 20 хвилин при 1000xg. Видалити тверді частинки та аналізувати негайно або зберігати зразки в аліквотах при -20 °С або при -80 °С для пізнішого використання. Уникайте повторних циклів заморожування/відтавання.

Примітка:

1. Зразки, які будуть використовуватися протягом 5 днів, можна зберігати при температурі 4 °С, в іншому випадку зразки повинні зберігатися при температурі -20 °С (≤ 1 місяць) або -80 °С (≤ 2 місяці), щоб уникнути втрати біологічної активності та забруднення.
2. Гемоліз зразка буде впливати на результат, тому гемолітичні зразки не повинні аналізуватися.
3. При виконанні тесту привести зразки до кімнатної температури.

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Привести всі компоненти набору та зразки до кімнатної температури (18-25 °С) перед використанням.
2. **Стандарт** - Відновити **Стандарт** з 1.0 мл **Розріджувача стандарту**, який зберігався протягом 10 хвилин при кімнатній температурі, злегка потрусити (не до утворення піни). Концентрація стандарту в вихідному розчині 1,000 нг/мл. Будь ласка, спочатку розбавте вихідний розчин до 100 нг/мл і розбавлений стандарт служить як найвищий стандарт (100 нг/мл). Тоді підготуйте 7 пробок, що містять 0.5 мл Розчинника Стандарту, і проведіть подвійний ряд розбавлення відповідно з малюнком нижче. Перемішайте кожну пробірку ретельно перед наступним переміщенням. Налаштуйте 7 розведень стандарту, наприклад 100 нг/мл, 50 нг/мл, 25 нг/мл, 12.5 нг/мл, 6.25 нг/мл, 3.12 нг/мл, 1.56 нг/мл, і остання пробірка EP з **Розчинником стандарту** є порожньою 0 нг/мл.



3. **Реагент детекції А і Реагент детекції В** – Центрифугувати Вихідний Розчин Детекції А та Вихідний Розчин Детекції В перед використанням. Розбавити робочий концентрат з робочим **Розчинником для аналізів А або В** відповідно (1:100).
4. **Промивний Розчин** - Розвести 20 мл концентрату Розчину для промивання (30x) з 580 мл деіонізованої або дистильованої води для отримання 600 мл Розчину для промивання (1x).
5. **Субстрат ТМБ** - Аспірувати необхідні дози розчину за допомогою стерилізованих наконечників і не повертати залишки розчину знову у флакон.

Примітка:

1. Проведення серійних розведень безпосередньо в лунках не допускається.
2. Приготувати стандарт протягом 15 хвилин до аналізу. Будь ласка, не розчиняйте реагенти безпосередньо при 37 °С.
3. Обережно відновити Стандарти або робочі Реагенти детекції А і В у відповідності з інструкцією, уникаючи піноутворення, і акуратно перемішати, поки кристали повністю не розчиняться. Щоб звести до мінімуму неточності, пов'язані з піпетуванням, використовуйте невеликі обсяги і переконайтеся, що піпетки калібровані. Рекомендується набирати більше 10 мкл на одну піпетування.
4. Відновлені Стандарти, Реагент детекції А та Реагент детекції В можуть бути використані **тільки один раз**.
5. Якщо кристали утворилися в Концентраті Розчину для промивання (30x), його необхідно нагріти до кімнатної температури і акуратно перемішати, поки кристали повністю не розчиняться.
6. Забруднена вода або контейнер для приготування реагентів будуть впливати на результати аналізу.

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

1. **Корпорація Cloud-Clone** несе відповідальність тільки за сам набір, але не за зразки, які використовуються в процесі аналізу. Користувач повинен розрахувати можливу кількість зразків, що використовуються в тесті. Будь ласка, приготуйте достатню кількість зразків заздалегідь.
2. Будь ласка, розрахуйте концентрацію перед дослідженням. Якщо значення концентрацій не входять в діапазон значень стандартної кривої, користувач повинен визначити оптимальні розведення зразка для конкретного експерименту. Зразок має бути розведений 0.01 моль/л PBS (pH = 7.0-7.2).
3. Якщо зразки не вказані в інструкції, необхідно провести попередній експеримент по визначенню обґрунтованості використання набору.
4. Екстракційні зразки тканин або клітин, приготовані за допомогою хімічного лікуючого буфера, можуть призвести до несподіваних результатів ELISA через вплив деяких хімічних речовин.
5. У зв'язку з можливістю розбіжності між антигеном іншого походження і антитілом, використовуваним в даному наборі, деякі нативні або рекомбінантні білки від інших виробників можуть не працювати з даним набором.
6. Під впливом факторів, таких як життєздатність клітин, число клітин або час тестування зразків, зразки супернатанту культури клітин можуть бути не виявлені за допомогою набору.
7. Для тестування рекомендується використовувати свіжі зразки без тривалого зберігання. В іншому випадку, деградація білків і денатурація можуть відбутися в цих зразках, що призведе до невірних результатів.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

1. Визначити кількість лунок для розбавленого стандарту, бланка і взірця. Підготувати 7 лунок для стандарту, 1 лунку для бланка. Додайте 100 мкл кожного з розведень стандарту (читайте про підготовку реагентів), бланка і зразків у відповідні лунки. Накрити плівкою. Інкубувати протягом 2 годин при 37 °C.
2. Видалити рідину з кожної лунки, не мити.
3. Додати 100 мкл робочого розчину **Реагенту для детекції А** в кожну лунку. Витримати протягом 1 години при 37 °C після покриття планшета плівкою.
4. Аспірувати розчин і промити з використанням 350 мкл 1x Розчину для промивання на кожну лунку, застосовуючи пульверизатор, багатоканальну піпетку, розподільчу колбу або автопромивач, і залишити на 1 ~ 2 хвилини. Видалити залишки рідини з лунок повністю, постукавши пластинкою на фільтрувальний папір. Промити 3 рази. Після останньої промивки видалити залишки промивного буфера шляхом аспірації або декантування. Перевернути планшет і промокнути його фільтрувальним папером.
5. Додати 100 мкл робочого розчину **Реагенту для детекції В** в кожну лунку. Витримати протягом 30 хвилин при 37 °C після покриття планшета плівкою.
6. Повторити процес аспірації/промивання всього 5 разів, як описано в кроці 4.
7. Додати 90 мкл **Розчину субстрату** в кожну лунку. Покрити новою плівкою. Інкубувати протягом 15-25 хвилин при 37 °C (не більше 30 хвилин). Захищати від світла. Рідина стане синього кольору при додаванні розчину субстрату.
8. Додати 50 мкл **Стоп розчину** в кожну лунку. Рідина стане жовтого кольору при додаванні Стоп розчину. Змішати рідину, постукаючи по стороні пластини. Якщо зміна кольору не відбувається, легко постукайте по пластині, щоб забезпечити ретельне перемішування.
9. Видалити всі краплі води і постукайте по нижній частині пластини; впевнитися, що немає бульбашок на поверхні рідини. Потім запустити мікропланшетний зчитувач і провести вимірювання при 450 нм негайно.

Примітка:

1. **Підготовка до аналізу:** Приготуйте відповідну кількість лунок для кожного експерименту і заберіть зайві лунки з планшета. Лунки, які не використовуються, повинні зберігатися при температурі -20 °C.
2. **Додавання зразків або реагентів:** Будь ласка, використовуйте свіжоприготований Стандарт. Обережно додати зразки в лунки і акуратно перемішати, щоб уникнути піноутворення. Не торкатись стінок лунки. Для кожного етапу процедури загальний час дозування для додавання реагентів або зразків в планшет для аналізу не повинен перевищувати 10 хвилин. Це забезпечить рівномірний розподіл часу піпетування для кожного кроку, без переривання. Рекомендується дублювання всіх стандартів і зразків, хоча це не є обов'язковим. Щоб уникнути перехресного забруднення, мийте наконечники піпеток між додаваннями стандартів, зразків і реагентів. Крім того, використовуйте окремі резервуари для кожного реагенту.

3. **Інкубація:** Для забезпечення точності результатів необхідно належне проведення герметизації планшета під час інкубації. Не допускайте, щоб лунки залишалися відкритими на довгий час між інкубаціями. Як тільки реагенти були додані в лунки, НЕ ДОЗВОЛЯЙТЕ смужкам ВИСИХАТИ в будь-який час під час тесту. Час інкубації і температура повинні контролюватися.
4. **Промивка:** Процедура промивання є критичною. Повне видалення рідини на кожній стадії має важливе значення для високої продуктивності. Після останньої промивки видалити залишки розчину для промивання шляхом аспірації або декантування і видалити всі краплі води постукуванням кінчиками пальців по нижній частині пластини. Недостатня промивка призводить до низької точності і помилкових підвищених результатів вимірювання.
5. **Контроль часу реакції:** Спостерігайте за зміною кольору після додавання **субстрату ТМБ** (наприклад, спостереження кожних 10 хвилин), якщо колір занадто насичений, додайте **Стоп розчин** заздалегідь, щоб уникнути надмірно сильної реакції, що призведе до неточності показань оптичної щільності.
6. **Субстрат ТМБ** легко забруднюється. Будь ласка, захищайте його від світла.
7. Вологість навколишнього середовища, менша за 60 %, може вплинути на роботу, тому зволожувач повітря рекомендується використовувати в такому стані.

ПРИНЦИП ТЕСТУ

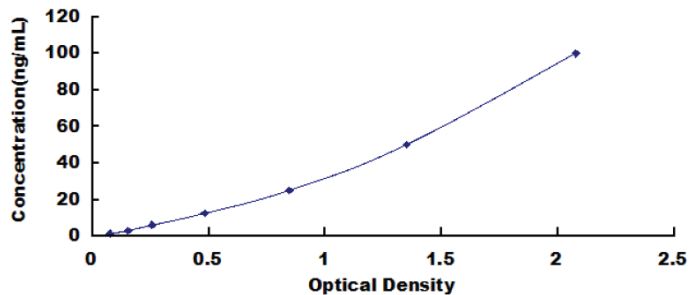
Мікропланшет, який входить до набору, був попередньо покритий антитілом, специфічним до PMP22. Стандарти та зразки додаються до відповідних лунок планшета з біотин-кон'югованими антитілами, специфічними до PMP22. Потім додається кон'югат авідин-HRP до кожної лунки мікропланшета і проводиться інкубація. Після додавання розчину субстрату PMP22, тільки ті лунки, що містять PMP22, біотинильовані антитіла і фермент-кон'югований авідин, будуть демонструвати зміну в кольорі. Фермент-субстрат Реакція фермент-субстрат зупиняється додаванням розчину сірчаної кислоти і зміна кольору вимірюється спектрофотометрично на довжині хвилі 450 нм ± 10 нм. Концентрація PMP22 у зразках визначається шляхом порівняння OD зразків на стандартній кривій.

ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Визначити середнє значення в дублях для кожного стандарту, контролю і зразків і відняти середнє значення оптичної щільності нульового стандарту. Побудувати стандартну криву, відкладаючи середню OD і концентрації для кожного стандарту і провести кращий варіант кривої через точки на графіку або створити стандартну криву на логарифмічному папері зі значеннями концентрації PMP22 на осі ординат і абсорбцією на осі абсцис. Використання програмного забезпечення, наприклад, Експерта кривої 1.30, також рекомендується. Якщо зразки були розбавлені, концентрацію, яка зчитується зі стандартної кривої, слід помножити на коефіцієнт розведення.

ТИПОВІ ДАНІ

Для того, щоб зробити розрахунок простішим, ми відкладаємо значення OD стандарту (X-вісь) проти відомої концентрації стандарту (Y-вісь), хоча концентрація є незалежною змінною і значення OD є залежною змінною. Тим не менш, значення OD стандартної кривої можуть мінятися залежно від умов аналізу (наприклад, оператора, техніки піпетування, техніки промивки або температурних впливів). Рекомендується побудова стандартної кривої для кожного тесту. Типова стандартна крива, приведена нижче, призначена тільки для ознайомлення.



ДІАПАЗОН ВИЯВЛЕННЯ

1.56-100 нг/мл. Концентрації Стандартної кривої, які використовувалися для ELISA, були 100 нг/мл, 50 нг/мл, 25 нг/мл, 12.5 нг/мл, 6.25 нг/мл, 3.12 нг/мл, 1.56 нг/мл.

ЧУТЛИВІСТЬ

Мінімальна доза PMP22, яка визначається, типово є меншою за 0.61 нг/мл.

Чутливість даного аналізу, або Нижня Межа Виявлення (LLD), була визначена як найнижча концентрація протеїнів, більша за нуль. Вона була розрахована додаванням двох стандартних відхилень до значення середньої оптичної щільності 20 нульових стандартів, після чого була розрахована відповідна концентрація.

СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Даний аналіз має високу чутливість та надзвичайну специфічність для виявлення PMP22. Не спостерігалось значної перехресної активності або інтерференції між PMP22 і аналогами.

Примітка:

У зв'язку з обмеженням навичок та знань, неможливо для нас повністю завершити виявлення перехресної реактивності між PMP22 і всіма аналогами, тому перехресна реакція може все ще існувати.

ТОЧНІСТЬ

Точність в аналізі: 3 зразки з низьким, середнім і високим рівнем PMP22 були протестовані 20 разів на одній пластині, відповідно.

Точність між аналізами: 3 зразки з низьким, середнім і високим рівнем PMP22 були протестовані на 3 різних планшетах, 8 повторів на кожному.

CV (%) = SD/середнє X 100

В аналізі: CV < 10%

Між аналізами: CV < 12%

СТАБІЛЬНІСТЬ

Стабільність набору ІФА визначається швидкістю втрати активності. Швидкістю зниження активності даного набору складає менше 5% протягом терміну придатності при відповідних умовах зберігання.

Щоб звести до мінімуму додатковий вплив на продуктивність, необхідно дотримуватись порядку проведення тесту і лабораторних умов, особливо кімнатної температури, вологості повітря, температури інкубатора, які мають суворо контролюватися. Крім того, рекомендується, щоб весь аналіз проводився одним і тим же оператором від початку і до кінця.

РЕЗЮМЕ ПРОЦЕДУРИ АНАЛІЗУ

1. Підготувати всі реагенти, зразки і стандарти;
2. Додати 100 мкл стандарту або взірця в кожен лунку. Інкубувати 2 години при 37 °С;
3. Аспірувати і додати 100 мкл підготовленого Реагенту Детекції А. Інкубувати 1 годину при 37 °С;
4. Аспірувати і промити 3 рази;
5. Додати 100 мкл підготовленого Реагенту Детекції В. Інкубувати 30 хвилин при 37 °С;
6. Аспірувати і промити в 5 разів;
7. Додати 90 мкл розчину субстрату. Витримати 15-25 хвилин при 37 °С;
8. Додати 50 мкл стоп розчину. Зчитати при 450 нм негайно.

ЗАУВАЖЕННЯ

1. Обмежені поточним станом та науковими технологіями, ми не можемо повністю провести всебічну ідентифікацію та аналіз сировини, яка надається постачальниками. Тому можуть існувати деякі якісні та технічні ризики при використанні набору.
2. Остаточні результати аналізу будуть тісно пов'язані з якістю продукції, операційних навичок кінцевих користувачів і експериментальних умов. Будь ласка, переконайтеся, що достатня кількість зразків є доступною.
3. Набори з різних партій може трохи відрізнятися за діапазоном виявлення, чутливістю і часом розвитку забарвлення. Будь ласка, проводьте експеримент в точній відповідності до інструкції, яка додається в комплекті; електронні версії з нашого сайту є тільки інформаційними.
4. Забороняється використовувати реагенти з наборів різних партій. Використовуйте тільки Реагенти, що поставляються виробником.
5. Захищати всі реагенти від яскравого світла під час зберігання та інкубації. Всі пробки на пляшках з реагентами повинні бути щільно закритими, щоб запобігти випаровуванню і забрудненню мікроорганізмами.
6. При першому відкритті в лунках може знаходитись деяка речовина. Це не буде мати ніякого впливу на остаточні результати аналізу. Не виймайте мікротитраційний планшет з пакету, де він зберігається, поки це не є необхідним.
7. Неправильне операціювання при підготовці реагентів та їх завантаженні, а також помилки в налаштуванні параметрів для планшетів можуть призвести до невірних результатів. Мікропланшетний зчитувач з шириною доріжки 10 нм або менше і діапазоном оптичної щільності 0-3 O.D. або більше при довжині хвилі 450 ± 10 нм є прийнятним для використання для вимірювання абсорбції. Будь ласка, прочитайте уважно

інструкцію і налаштуйте прилад до експерименту. Для отримання додаткової інформації, будь ласка, зверніться до операційного відео (<http://www.cloud-clone.us/homepage/operate.htm>).

8. Навіть один і той же оператор може отримати різні результати у двох окремих експериментах. Для того, щоб отримати кращу відтворюваність результатів, робота кожного кроку в аналізі повинна контролюватися. Крім того, рекомендується проведення попереднього експерименту перед аналізом для кожної партії.
9. Кожен комплект пройшов тест з Контролю якості. Тим не менш, результати від кінцевих користувачів можуть бути несумісними з нашими внутрішніми даними через деякі несподівані умови транспортування або різне устаткування лабораторії. Розбіжність між серіями серед комплектів з різних партій може виникнути в результаті цих факторів, теж.
10. Набори від різних виробників можуть призводити до різних результатів, так як ми не порівнювали нашу продукцію з іншими виробниками.
11. Інструкція також підходить для набору 48Т, але всі реагенти набору 48Т зменшені наполовину.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Стоп-розчин, запропонований для використання з цим набором, є розчином кислоти. Використовувати захист для очей, рук, обличчя при роботі з даним матеріалом.

ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМ

Проблема	Можливе джерело	Коригувальні дії
Погана Стандартна крива	Неправильна підготовка Стандартної кривої	Забезпечити точну роботу розбавлення взірця
	Неповна промивка та аспірація	Адекватні промивка та аспірація
	Неточне піпетування	Перевірити та калібрувати піпетки
Слабка точність	Незавершена промивка лунк	Забезпечити достатню промивку
	Недостатнє перемішування і аспірація реагентів	Адекватні аспірація і змішування реагентів
	Повторне використання піпеток, контейнерів та герметики	Змінити і використовувати нові наконечники, контейнери та герметики
	Неточне піпетування	Перевірити та калібрувати піпетки
Низькі значення O.D.	Недостатні обсяги реагенту, додані в лунки	Провести калібрування піпеток і додати адекватну кількість реагентів
	Невірний час інкубації	Забезпечити достатній час інкубації
	Невірна температура інкубації	Реагенти привести до кімнатної температури
	Не працює кон'югат або субстрат	Змішайте кон'югат і субстрат, колір повинен розвиватися негайно
	Не добавлено Стоп розчин	Дотримуйтесь протоколу аналізу
Значення взірців	Результат зчитано пізно	Зчитайте в терміни, рекомендовані в керівництві
	Неправильне зберігання взірця	Зберігати зразки належним чином і використовувати свіжий зразок
	Невірні забір та підготовка взірців	Вибрати правильний метод забору зразків і їх підготовки
	Недостатня кількість аналізу у взірцях	Використовуйте новий зразок і повторіть аналіз



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