

Аннексин V ІФА

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення Аннексин V в сироватці людини та супернатанті клітинної культури.

REF **BE 59321**

 **96**

   **2-8°C**

Тільки для дослідницьких цілей



I B L I N T E R N A T I O N A L G M B H

Flughafenstrasse 52a

Телефон: +49 (0)40-53 28 91-0

IBL@IBL-International.com

D-22335 Гамбург, Німеччина

Факс: +49 (0)40-53 28 91-11

www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1,
тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua

ЗМІСТ

- 1 Призначене використання
- 2 Загальна інформація
- 3 Принципи випробування
- 4 Реагенти надані
- 5 Інструкція з зберігання - набір ІФА
- 6 Інструкції з збору та зберігання зразків
- 7 матеріалів необхідні, але не надані
- 8 Заходи безпеки для використання
- 9 Підготовка реагентів
- 10 Тестовий протокол
- 11 Розрахунок результатів
- 12 Обмеження
- 13 Характеристика продуктивності
- 14 Інформація про замовлення
- 15 Підготовка Реагенту загальна інформація 28
- 16 Загальна інформація протоколу випробувань

1 Призначене використання

Аннексин V людини ІФА - це імуноферментний аналіз для кількісного виявлення людського аннексину V. Людський Аннексин V ІФА призначений тільки для досліджень. Не для діагностичних або терапевтичних процедур.

2 Загальна інформація.

Аннексини є сімейством кальцієво-залежних фосфоліпід - зв'язуючих білків. Вони присутні в значній кількості в царстві еукаріотів. Навіть структурно добре досліджена *in vivo* функція аннексину все ще є незрозумілою. Вони остаточно належать до сімейства всюдисущих білків цитоплазми, що беруть участь у передачі сигналу. Всі аннексини були показано мають передбачуваний сайт зв'язування протеїнази С, але лише аннексин V володітиме потенційним сайтом псевдо субстратів. Таким чином, аннексин V здається модулює активність деяких РКС на їх підкладках.

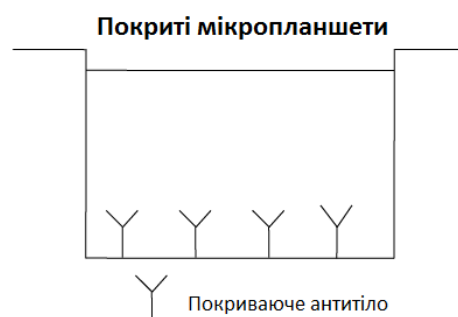
Визначено, що аннексин V відіграє важливу роль у матриці везикулярно-ініційованої кальцифікації хряща як кальцієвий канал, регульований колажем. Аннексин V зв'язується з прокоагулянтними фосфоліпідами (Судинний антикоагулянт альфа) з високою спорідненістю. Привілейованим партнером з приєднання аннексину V є фосфатидилсерин (ФС). ФС переважно знаходиться в мембрані створок, які стикаються з цитозолом. Проте останні дослідження показують, що кожен тип клітини має молекулярну машину для виявлення ФС при ізольованій клітинній поверхні.

Ця машина активована під час виконання апоптозу. Одного разу ФС виявляється на поверхні клітини, він демонструє прокоагулянт і протизапальні заходи. Аннексин V зв'яжеться з ФС- експонованою апоптичною клітиною і може інгібувати прокоагулянт і прозапальну діяльність вмираючої клітини. Ці висновки разом з наявністю Аннексину V в позаклітинному просторі зображує нове патофізіологічне важливе значення для Аннексину *in vivo*. Загальний ендогенний аннексин V може бути виявлений з існуючим ІФА, який дасть змогу краще зрозуміти патофізіологічну роль Аннексину V.

3 Принципи тесту

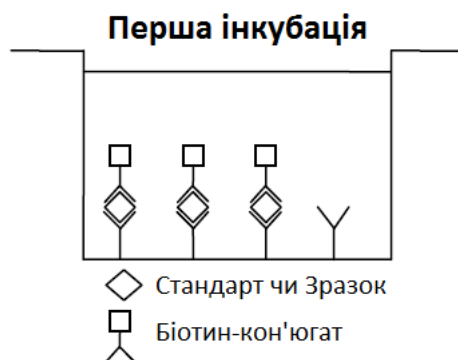
Антилюдський аннексин V покриття антитіл адсорбується на мікропланшети.

Малюнок 1



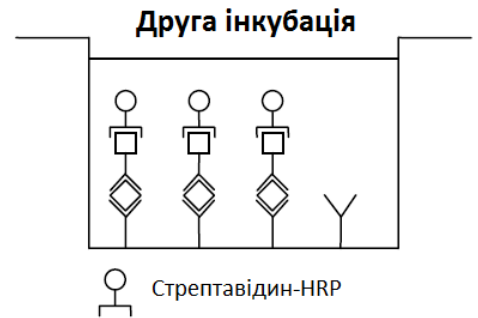
Людський аннексин V присутній у зразку або Стандарті зв'язується з антитілами, адсорбованими на мікропланшеті. Біотин - кон'югований анти людський Аннексин V додають та зв'язуються з Аннексином V людини захопленим першим антитілом.

Малюнок 2



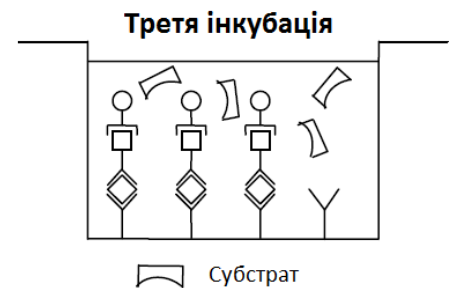
Після інкубації зв'язний біотин - кон'югований антилюдський Аннексин V антитіла видаляються під час промивання. Стрептавідин - HRP додається і зв'язується з біотин - кон'югованими анти-людськими Аннексин V антитілами .

Малюнок 3



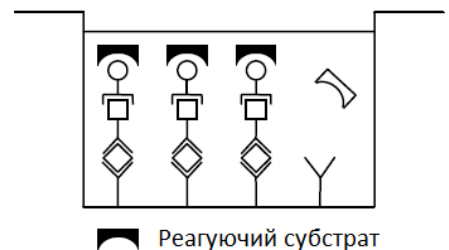
Після інкубації незв'язаний стрептавідин-HRP видаляється під час промивання, і додають до лунок розчин субстрату, реактивний з HRP.

Рисунок 4



Кольоровий продукт формується пропорційно кількості людського аннексину V в присутності зразку або стандарту. Реакція припиняється додаванням кислоти і абсорбція вимірюється при 450 нм. Стандартна крива готується від 7 розведень стандартів аннексину V людини визначається і концентрація зразку аннексину V людини.

Рисунок 5



4 Реагенти надані

- 1 алюмінієвий пакет з Мікропланшетом, покритий моноклональним антитілом до аннексину V людини
- 1 флакон (100 мкл) Біотин-кон'югат анти-людський аннексин V моноклональне антитіло
- 1 флакон (150 мкл) Стрептавідин-HRP
- 2 флакони людського Аннексину V Стандарт ліофілізований, 100 нг / мл на відновлення
- 1 флакон (12 мл) розріджувач зразка
- 1 флакон (5 мл) Концентрат буферу для аналізу 20x (PBS з 1% Tween 20 і 10% BSA)
- 1 флакон (50 мл) промивний буфер концентрат 20 x (PBS з 1% Tween 20)
- 1 флакон (15 мл) Розчин субстрату (тетраметилбензидин)
- 1 флакон (15 мл) стоп-розчин (1M фосфорної кислоти)
- 1 флакон (0,4 мл) синій барвник
- 1 флакон (0,4 мл) зелений барвник
- 1 флакон (0,4 мл) червоний барвник
- 4 клейових плівки

5 Інструкція з зберігання – набір ІФА

Зберігати реагенти набору від 2 ° до 8 ° С. Відразу після використання залишки реагентів повинні бути повернені в холодне зберігання (від 2 ° до 8 ° С). Термін придатності набору і реактиви вказані на етикетках. Термін придатності компонентів набору може бути гарантований лише за умови правильного зберігання компонентів, і якщо в разі повторного використання одного компонента, цей реагент не забруднений першим обертанням.

6 Забір зразків та інструкція зі зберігання.

Супернатант клітинної культури та сироватку протестували за допомогою цього аналізу. Інші біологічні зразки можуть бути придатними для використання в аналізі. Видаліть сироватку із згустку якомога швидше після згортання.

Зразки, що містять видимий осад, повинні бути очищені перед використанням в аналізі. Не використовуйте грубо гемолізовані або ліпемічні зразки.

Зразки слід аліквотувати та зберігати у замороженому вигляді при температурі -20°C , щоб уникнути втрати біоактивного аннексину людини V. Якщо зразки повинні аналізуватися протягом 24 годин, їх можна зберігати при температурі від 2°C до 8°C (для стабільності зразка див. 13.5). Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Перед аналізом заморожені зразки повинні бути повільно приведені до кімнатної температури та обережно змішані.

7 Матеріали необхідні, але не надані

- 5 мл та 10 мл градуйовані піпетки
- 5мкл до 1000мкл регульовані одноканальні мікропіпетки з одноразовими наконечниками
- 50мкл до 300мкл регульовані багатоканальні мікропіпетки з одноразовими наконечниками
- Мультиканальна мікропіпетка резервуар
- Склянки , колби, балони, необхідні для підготовки реагентів
- пристрої для доставки промивного розчину (багатоканальна пральна пляшка або автоматична система миття)
- рідер стріпів мікропланшету, здатний зчитувати при 450 нм (довжина хвилі 620 нм як необов'язкова референтна довжина хвилі)
- дистильована в склі або дейонізована вода
- статистичний калькулятор із програмою виконання регресивного аналізу

8 Заходи безпеки для використанні

- Всі хімікати повинні розглядатися як потенційно небезпечні. Рекомендується, щоб цей продукт використовувався лише тими особами, які пройшли підготовку в лабораторних умовах та використовували відповідно до принципів належної лабораторної практики. Використовуйте захисний одяг, наприклад лабораторний комбінезон, захисні гачки та рукавички. Необхідно дбати про те, щоб уникнути контакту шкіри з очима. У разі контакту з шкірою або очима промийте безпосередньо водою. Дивіться таблицю безпеки матеріалів та / або заяви безпеки для конкретної поради.
 - Діагностичні матеріали призначені для використання лише в дослідженні та не призначені для використання в індивідуальних або терапевтичних процедурах.
 - Не змішуйте та не замінюйте реагенти на ті, що містяться в інших партіях чи інших джерелах.
 - не використовуйте реактиви комплектів після закінчення терміну придатності , вказаного на етикетці.
 - не підвергайте реактиви набору сильному світлу під час зберігання або інкубації.
 - не піпетуйте ротовою порожниною.
 - Не їжте і не паліть в місцях, де обертаються реагенти комплекту реагентів або зразки.
 - Уникайте контакту шкіри або слизових оболонок з реагентами чи комплектами.
 - Гумові або одноразові латексні рукавички повинні носитись під час роботи з реагентами або зразками.
 - Не допускати контакту розчину субстрату з окислювачами та металом.
 - Уникайте розбризкування або утворення аерозолів.
 - Щоб уникнути мікробного забруднення або перехресного зараження реагентів або зразків, що може призвести до недійсних результатів тесту, використовуйте одноразові наконечники піпетки та / або піпетки.
 - Використовуйте чисті, спеціальні лотки для реагентів для розподілу кон'югату та реагенту субстрату.
 - Підтвердження впливу кислоти інактивує кон'югат.
 - Для підготовки реагенту необхідно використовувати кришталево - дистильовану воду або дейонізовану воду.
- Версія 08.02.11 (21)

- Розчин субстрату повинен бути доведений до кімнатної температури перед використанням.
- Знезаразити та утилізувати зразки та всі потенційно забруднені матеріали, оскільки вони можуть містити інфекційні агенти. Переважним способом знезараження є автоклавне утримування протягом мінімум 1 години при 121,5 ° С.
- Рідкі відходи, що містять кислоту та нейтралізовані відходи, можуть бути змішані з гіпохлоритом натрію в об'ємах, такі, що остаточна суміш містить 1,0% гіпохлориту натрію. Дозвольте 30 хвилин для ефективного знезараження. Рідкі відходи, що містять кислоту, повинні бути нейтралізовані перед додаванням гіпохлориту натрію.

9 Підготовка реагентів

Концентрація буферу повинна бути доведена до кімнатної температури і повинна бути розбавлена перед початком процедури випробувань. Якщо кристали утворюються в буферних концентратах, нагрійте їх обережно, поки вони повністю не розчиняються.

9.1.Промивний Буфер (1x)

Залити весь вміст (50мл) промивного буферу концентрату (20x) у чистий 1000мл градуйований циліндр. Доведіть до кінцевого об'єму 1000 мл зі криштално-дистильованою або дейонізованою водою. Змішуйте акуратно, щоб уникнути спінювання. Передайте в чисту пляшку для промивки і зберігайте при температурі від 2 ° до 25 ° С. Будь ласка, зверніть увагу, що буфер для промивки (1x) стабільний протягом 30 днів.

Промивний буфер (1x) може бути приготований як необхідно у відповідності з наведеною нижче таблицею:

Кількість стріпів	Промивний буфер концентрат (20x) мл	Дистильована вода (мл)
1-6	25	475
1-12	50	950

9,2 Буфер аналізу (1x)

Залити весь вміст (5 мл) концентрованого буферу для аналізу (20 x) у чистий 100-мл градуйований циліндр. Довести до кінцевого об'єму 100 мл з дистильованою водою. Ніжно змішайте, щоб уникнути піноутворення. Зберігайте при температурі від 2 ° до 8 ° С. Будь-ласка, зверніть увагу, що буфер для аналізу (1x) стабільний протягом 30 днів. Буфер аналізу (1x) також може бути приготований у відповідності з наведеною нижче таблицею:

Кількість стріпів	Буфер аналізу концентрат (мл)	Дистильована вода (мл)
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

9.3 Біотин-кон'югат

Будь ласка, візьміть до уваги, що біотин - кон'югат слід використовувати протягом 30 хвилин після розведення.

Зробіть 1:100 розчин концентрованого біотин - кон'югату з буфером аналізу (1x) у чистій пластиковій пробірці, як необхідно, згідно наведеної таблиці:

Кількість стріпів	Біотин-кон'югат (мл)	Буфер аналізу (мл)
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

9,4 Стрептавідин-HRP

Будь-ласка, візьміть до уваги що Стрептавідин-HRP слід використовувати протягом 30 хвилин після розведення.

Зробіть 1: 200 розведення концентрованого стрептавідину - HRP розчину з буфером аналізу (1x) у чистій пластиковій пробірці, як необхідно згідно з наведеною нижче таблицею:

Кількість стріпів	Стрептавідин HRP (мл)	Буфер аналізу (1x)(мл)
1-6	0,03	5,97
1-12	0,06	11,94

9,5 Людський аннексин V стандарт

Відновіть людський Аннексин V стандарт за допомогою додавання буферу для аналізу (1x).

Обсяг відновлення вказаний на етикетці флакону стандарту. Дозволити стандарту відновитися протягом 10-30 хвилин. Оберніть або змішайте обережно, щоб забезпечити повне і однорідне розчинення (концентрація розчиненого стандарту = 100 нг / мл).

Стандартні розведення можуть бути приготовані безпосередньо на мікропланшеті (див. 10с) або, альтернативно, у пробірках (див. 9.5.1).

9.5.1 Зовнішнє стандартне розведення

Промаркуйте 7 пробірок, по одній для кожної стандартної точки.

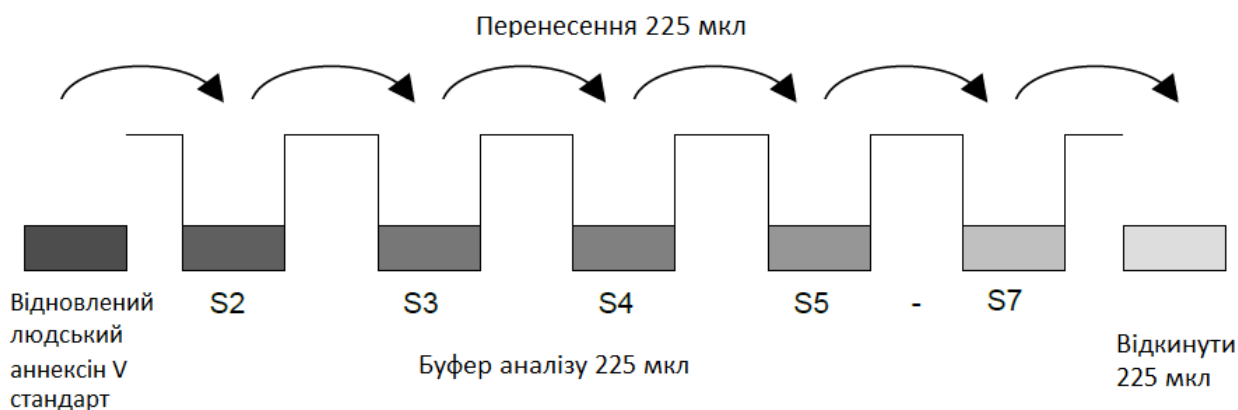
S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7

Потім приготуйте серійні розведення для стандартної кривої 1: 2 таким чином:

прокачайте 225 мкл розчинника зразка у кожну пробірку.

Прокачайте 225 мкл розведеного стандарту (концентрація = 100 нг / мл) в першу пробірку, позначену як S1, і змішайте (концентрація стандарту 1 = 50нг / мл) .

Прокачайте 225 мкл цього розведення в другу пробірку, позначену як S2, та ретельно перемішати перед наступною передачею. Повторюйте серійні розведення ще 5 разів, створюючи таким чином точки на стандартній кривій (див. мал. 6).



Розчинник зразка служить як бланк (порожній).

Малюнок 6

9.6 Додавання забарвлюючих реагентів: синього кольору, зеленого кольору, червоного кольору.

Для того, щоб допомогти нашим клієнтам уникнути будь-яких помилок при проведенні аналізу ІФА, IBL International пропонує інструмент, який допомагає контролювати додання навіть дуже малих об'ємів розчину до реакційної лунки, видаючи відмінні кольори на кожному кроці процедури ІФА. Ця процедура є не обов'язковою, ніяким чином не заважає результатам тесту і є призначена для того, щоб допомогти клієнту виконати тест, але також може бути опущена, просто слідуючи інструкції.

Альтернативно, забарвлюючі розчини із запасів забезпечених (синій барвник, зелений барвник, червоний барвник) можна додати до реагентів відповідно до наступних правил:

- 1. Розріджувач:** Перед розведенням стандарту та зразка додати синій барвник у розведенні 1: 250 (див. Таблицю нижче) до відповідного розчинника (1x) відповідно до протоколу випробувань. Після додавання синього барвнику дотримуйтесь відповідно до інструкції.

5 мл розчинник зразка	20 мкл синій барвник
12 мл розчинник зразка	48 мкл синій барвник
50 мл розчинник зразка	200 мкл синій барвник

2. Біотін – кон'югат

Перед розведенням концентрованого біотин-кон'югату додайте зелений барвник у розрідженні 1: 100 (див. Таблицю нижче) до буферу аналізу (1x), який використовується для остаточного розведення кон'югату. Продовжуйте після додавання зеленого барвника відповідно до інструкції: Підготовка біотин-кон'югату.

3 мл буферу аналізу (1x)	30 мкл зеленого барвника
6 мл буферу аналізу (1x)	60 мкл зеленого барвника

3. Стрептавідин-HRP:

перед розбавленням концентрованого стрептавідину-HRP додайте червоний барвник у розведенні 1: 250 (див. Таблицю нижче) до буферу аналізу (1x), що використовується для остаточного розчинення стрептавідину-HRP. Продовжуйте після додавання червоного - Барвника згідно з інструкцією з буклету:

6 мл буферу аналізу (1x)	24 мкл червоного барвника
12 мл буферу аналізу (1x)	48 мкл червоного барвника

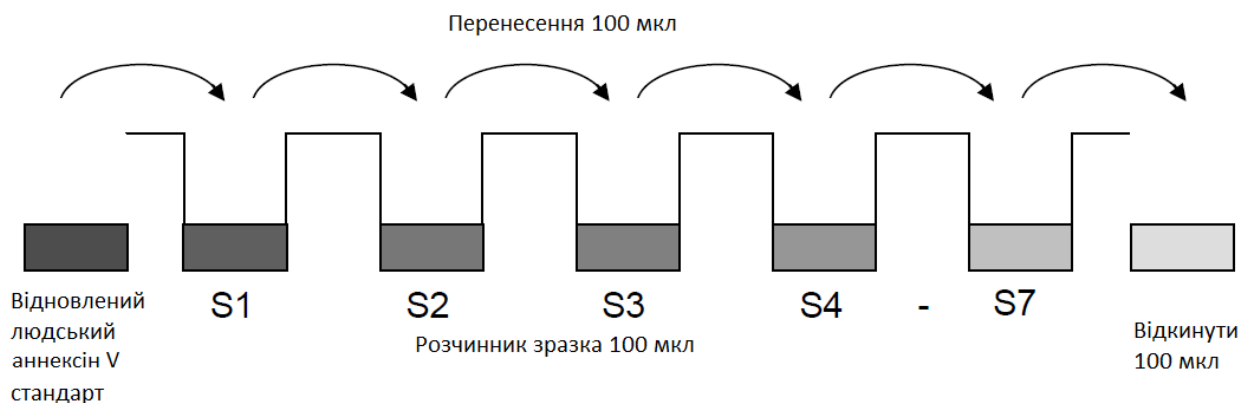
10. Протокол аналізу

А) Визначте кількість стріпів мікролунок, необхідних для тестування потрібного числа зразків плюс відповідну кількість лунок, необхідних для прогону бланків (порожніх) та стандартів. Кожен зразок, стандарт, бланк (порожній) та вибіркового контрольний зразок повинні аналізуватися у двох примірниках. Зніміть надлишкові стріпи з утримувача і зберігайте у ретельно закритому пакеті з фольги з осушувачем при температурі 2 ° -8 ° С.

В) Промивайте мікролунки двічі приблизно 400мл промивного буфера на кожну лунку з ретельною аспірацією вмісту мікролунок між промиваннями. Додайте промивний буфер, щоб знаходився в лунках приблизно 10 - 15 секунд перед аспірацією. Будьте обережні, щоб не подряпати поверхню мікролунок. Після останнього етапу миття, опорожнити лунки та постукати стріпами мікропланшету об абсорбуючу подушку або паперовий рушник для видалення надлишкового промивного буфера. Використовуйте стріпи мікропланшету відразу після промивання. Альтернативно стріпи мікропланшету можуть бути розміщені догори дном на мокрому абсорбентному папері протягом не більше 15 хвилин. Не дозволяйте лункам висихати.

С) Стандартне розведення на мікропланшеті (Альтернативно стандартне розведення може бути приготовано в пробірках - див. 9.5.1):

додайте 100 мкл розчинника зразка у двох примірниках до всіх стандартів. Прокапати 100мкл приготованого стандарту (див. Приготування Стандарту 9.5, концентрація = 100 нг / мл) у двох примірниках у лунки А1 та А2 (див. Таблицю 1). Змішати вміст лунок А1 і А2 шляхом повторної аспірації та видалення (концентрація стандарту 1, S1 = 50 нг / мл), і перемістити 100 мкл у лунки В1 та В2 відповідно (див. Малюнок 7). Будьте обережними - потрібно не подряпати внутрішню поверхню мікролунок. Продовжуйте цю процедуру 5 разів, створюючи два ряди стандартних розведень людського Аннексину V діапазоном від 50,00 до 0,78 нг / мл. Видаліть 100 мкл вмісту з останніх використаних мікролунок (G1, G2).



Малюнок 7

У випадку зовнішнього розведення стандартів (див. 9.5.1) прокапати 100 мкл цих стандартних розведень S1 - S7) у лунки стандартів відповідно до табл.1.

Таблиця 1

Таблиця, що зображує приклад розташування бланків (порожніх), стандартів та зразків у стріпах мікролунок:

	1	2	3	4
A	Стандарт 1 (50,00 нг/мл)	Стандарт 1 (50,00 нг/мл)	Зразок1	Зразок1
B	Стандарт 2 (25,00 нг/мл)	Стандарт 2 (25,00 нг/мл)	Зразок2	Зразок2
C	Стандарт 3 (12,50 нг/мл)	Стандарт 3 (12,50 нг/мл)	Зразок3	Зразок3
D	Стандарт 4 (6,25 нг/мл)	Стандарт 4 (6,25 нг/мл)	Зразок4	Зразок4
E	Стандарт 5 (3,13 нг/мл)	Стандарт 5 (3,13 нг/мл)	Зразок5	Зразок5
F	Стандарт 6 (1,56 нг/мл)	Стандарт 6 (1,56 нг/мл)	Зразок6	Зразок6
G	Стандарт 7 (0,78 нг/мл)	Стандарт 7 (0,78 нг/мл)	Зразок7	Зразок7
H	Бланк (порожня)	Бланк (порожня)	Зразок8	Зразок 8

Д) Додайте 100 мкл розріджувача зразка у двох примірниках до порожніх лунок.

Е) Додайте 50 мкл розчинника зразка до лунок зразка.

ф) Додайте по 50 мкл кожного зразка у дублікатах до лунок зразка.

Г) Приготуйте біотин-кон'югат (див. Підготовка біотин-кон'югату 9.3).

Н) Додайте 50 мкл біотин-кон'югату до всіх лунок.

і) Накривають клейкою плівкою та інкубують при кімнатній температурі (18-25 ° C) протягом 2 годин, якщо можливо, на шейкері мікропланшетів, встановленому при 100 об. / хв.

ж) Підготуйте стрептавідин-HRP (див. "Підготовка стрептавідин-HRP9.4") .

- к) Видаліть клейку плівку і опорожніть лунки. Промийте стріпи мікролунок 4 рази відповідно до пункту б. протоколу випробувань. Перейдіть відразу до наступного кроку.
- л) Додайте 100 мкл розбавленої стрептавідину-HRP до всіх лунок, включаючи порожні лунки (бланк).
- м) накривають клейкою плівкою та інкубують при кімнатній температурі (18-25 ° C) протягом 1 години, якщо можливо на шейкері мікропланшетів, встановленому на швидкості 100 об. /хв.
- н) Видаліть клейку плівку і опорожніть лунки. Промийте стріпи мікропланшета 4 рази відповідно до пункту б. протоколу випробувань. Перейдіть відразу до наступного кроку.
- о) Прокачайте 100 мкл розчину субстрату ТМБ до всіх лунок .
- р) Інкубуйте стріпи мікропланшета при кімнатній температурі (від 18 до 25 ° C) приблизно 10 хвилин. Уникати прямого впливу інтенсивного світла.

Розвиток кольору на планшеті слід контролювати, і реакція субстрату припиняється (див. Наступну статтю цього протоколу), перш ніж позитивні лунки більше не будуть правильно записуватися. Визначення ідеального періоду часу для розвитку кольору має здійснюватися індивідуально для кожного аналізу.

Рекомендується додати стоп розчин, коли найвищий стандарт розвине темно-синій колір. Альтернативно, розвиток кольору можна контролювати рідером ІФА при 620 нм. Реакція субстрату повинна бути зупинена, як тільки Стандарт 1 досягнув ОГ 0,9-0,95.

q. Зупиніть реакцію ферменту, швидко піпетуючи 100 мкл Стоп розчину в кожен лунку. Важливо, щоб Стоп розчин швидко і рівномірно поширювався на всі мікролунок, щоб повністю інактивувати фермент. Результати слід читати відразу після додавання стоп розчину або протягом однієї години, якщо стріпи мікропланшета зберігаються при температурі від 2 до 8 ° C в темряві.

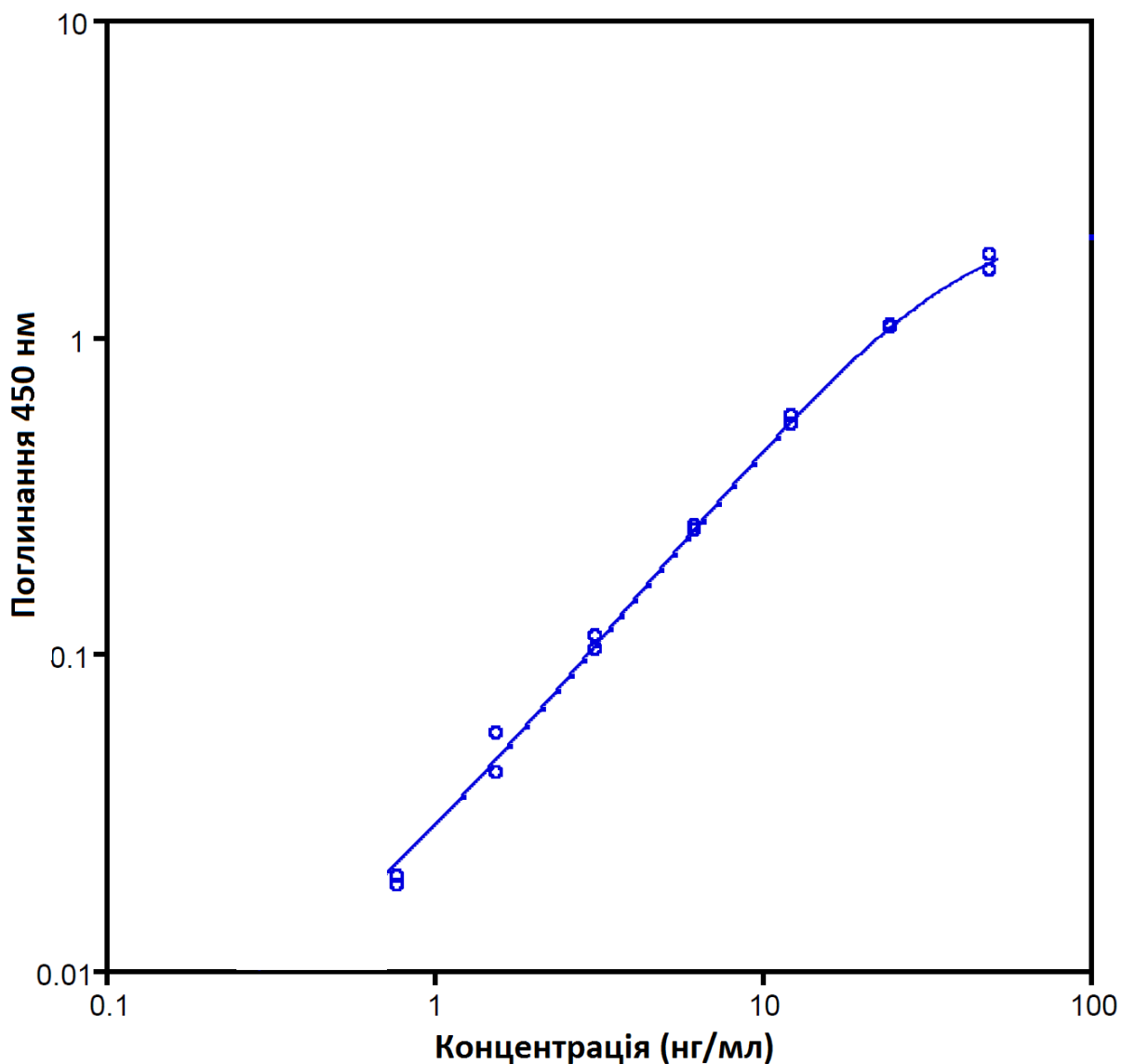
г) зчитайте абсорбцію кожної мікролунки на спектро - фотометрі , використовуючи 450 нм у якості довжини первинної хвилі (необов'язково 620 нм як референтна довжина хвилі ; 610-650 нм є прийнятне). Налаштуйте на бланк рідер мікропланшетів згідно з інструкціями виробника, використовуючи порожні лунки (бланк). Визначте абсорбції як зразків, так і стандартів.

Примітка. У випадку інкубації без струшування на шейкері отримані значення О.Г можуть бути нижчими, ніж зазначено нижче. Тим не менше такі результати все ще дійсні.

11 Розрахунок результатів .

- Обчислити середні значення абсорбції для кожного набору дублікатів стандартів та зразків. Дублікати повинні бути в межах 20 відсотків від середнього значення.
- Створіть стандартну криву, намітивши середню абсорбцію для кожної стандартної концентрації на ординаті проти концентрації аннексину V на абсцисі. Намалюйте найкращу криву відповідно до точок графіка (5-параметрна крива відповідності рекомендована).
- Щоб визначити концентрацію циркулюючого людського аннексину V для кожного зразка, спочатку знайдіть значення середнього поглинання для ординат і витягніть горизонтальну лінію зі стандартною кривою . У точці перетину розтягніть вертикальну лінію до абсциси та прочитайте відповідну концентрацію Аннексин V людини.
- Якщо слідували інструкціям, вказаним в цьому протоколі, зразки були розбавлені 1: 2 (50 мкл зразка + 50 мкл розріджувача зразка), концентрація прочитана зі стандартної кривої повинна бути помножена на коефіцієнт розведення (x 2).
- Обчислення зразків з концентрацією, що перевищує стандарт 1, може призвести до некоректного, низького рівня аннексину V людини. Такі зразки вимагають додаткового зовнішнього попереднього розведення відповідно до очікуваних значень людського аннексину V з розріджувачем зразка для точного кількісного визначення фактичного рівня аннексину V людини.
- Передбачається, що кожний випробувальний комплекс встановить контрольний зразок відомої концентрації людського аннексину V та виконує цей додатковий контроль з кожним аналізом. Якщо значення, отримані не в межах очікуваного діапазону контролів, результати аналізу можуть бути недійсними.

- Репрезентативна стандартна крива показана на малюнку 8. Ця крива не може бути використана для отримання результатів тесту. Кожна лабораторія повинна підготувати стандартну криву для кожної групи аналізованих стріпів мікропланшету.



Малюнок 8

Представлена стандартна крива для людського Аннексин V ІФА. Аннексин V людини розбавили серійно 2-кратними кроками в пробірному розріджувачі. Не використовуйте цю стандартну криву для отримання результатів тестування. Стандартна крива повинна бути визначена для кожної групи стріпів мікропланшета. (див. оригінал інструкції.)

Таблиця 2

Типові дані з використанням людського Аннексину V ІФА

Вимірювана довжина хвилі: 450 нм

Референта довжина хвилі: 620 нм

стандарт	аннексин V людини концентрація (нг/мл)	О.Г. при 450 нм	Значення ОГ при 450 нм	С.V. (%)
1	50,00	1,833 1,626	1,73	6,0
2	25,00	1,091 1,108	1,1	0,8
3	12,50	0,548 0,585	0,567	3,3
4	6,25	0,266 0,276	0,272	1,8
5	3,13	0,126 0,137	0,132	4,2
6	1,56	0,066 0,080	0,074	9,6
7	0,78	0,043 0,044	0,044	1,1
Бланк (порожня)	0,00	0,025 0,024	0,024	2,9

Значення ОГ стандартної кривої можуть змінюватися залежно від умов проведення аналізу (наприклад, оператора, методу піпетування, техніки промивання або температурних ефектів). Більше того, термін зберігання набору може впливати на ферментативну активність і, таким чином, на інтенсивність кольору. Значення вимірювані все ще є дійсними.

12 Обмеження

- оскільки точні умови можуть відрізнятися від аналізу до аналізу, стандартна крива повинна бути встановлена для кожного запуску.

- Бактеріальне або грибокве забруднення зразків або реагентів екрану або перехресне забруднення між реагентами може призвести до помилкових результатів.

- одноразові ковпачки для піпетки, склянки або скляний посуд є кращими, багаторазовий скляний посуд необхідно мити і ретельно промити з усіх детергентів, що використовуються перед використанням. Недостатнє або недостатнє промивання на будь-якій стадії процедури буде приводити до хибно-позитивних або хибно-негативних результатів. Порожні лунки повністю перед доданням свіжого миючого розчину заповнюють промивним буфером, як зазначено для кожного циклу прання, і не дозволяють лункам знаходитись непокритими або висихати протягом тривалого періоду часу.

- Використання радіоімунотерапії значно збільшило кількість пацієнтів з людськими анти-мишачими антитілами IgG (НАМА). НАМА може впливати з аналізами, утилізуючи мишачі моноклональні антитіла, що призводять як до хибно-позитивних, так і до хибно-негативних результатів. Зразки сироватки, що містять антитіла до мишачих імуноглобулінів, все ще можуть бути проаналізовані в таких аналізах, коли додають мишачі імуноглобуліни (сироватки, асцитичні рідини або моноклональні антитіла, що не мають відношення до специфічності) до зразка.

13 Характеристики продуктивності

13.1 Чутливість

Ліміт виявлення людського аннексину V, визначеного як концентрація аналіту, внаслідок чого абсорбція значно вище, ніж середовище розрідження (середнє значення плюс 2 стандартних відхилення), було визначено як 0,33 нг / мл (середнє значення 6 незалежних аналізів) .

13.2. Відтворюваність

13.2.1. В аналізі

Відтворюваність в межах аналізу була оцінена у 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6-ти повтореннями 8 зразків, що містять різні концентрації людського аннексину V. 2 стандартні криві були прогнані на кожному планшеті. Обчислений загальний коефіцієнт варіації в аналізі був <10% .

13.2.2. Між аналізами

Відтворюваність між аналізами в межах однієї лабораторії оцінювали в 3 незалежних експериментах. Кожний аналіз проводили з 6 повторами з 8 проб, що містять різні концентрації людського аннексину V. 2 стандартні криві були прогнані на кожному планшеті. Обчислений загальний коефіцієнт варіації між аналізами був 11% .

13.3 Відновлення збагаченням.

Відновлення збагаченням оцінювалось шляхом збагачення 4 рівнів людського аннексину V на різних зразках. Відновлення виявлено у 3-х незалежних експериментах з 4-ма повторами кожний. Неопрацьований зразок використовувався як порожній у цих експериментах. Загальне середнє відновлення становило 85%.

13,4 Розведення Паралельне

4 зразка з різним рівнем людського аннексину V проаналізували у серійних 2-кратних розведеннях з 4-ма повторами кожний. Загальне середнє відновлення склало 89% .

13.5 Стабільність зразка

13.5.1 Сійкість до заморожування-відтавання

Аліквоти зразків (збагачені або незбагачені) зберігали при -20 ° C та заморожували 5 разів, і рівні людського аннексину V визначали. Було виявлено істотне зменшення імунореактивності аннексину V людини. Тому зразки повинні зберігатись аліквотовані при -20 ° C і охолоджуватись лише один раз.

13.5.2 Стабільність зберігання

Аліквоти зразків (збагаченого або незбагаченого) зберігалися при -20 ° C, 2-8 ° C, кімнатній температурі (КТ) та при 37 ° C, і рівень аннексину V людини визначається через 24 год. Не було виявлено суттєвої втрати імунореактивності людського аннексину V, виявленого під час зберігання при певних умовах.

13.6. Специфічність.

Втручання циркулюючих факторів імунної системи оцінювалось за рахунок збільшення цих білків у фізіологічно відповідних концентраціях у людській Аннексин V позитивній сироватці. Відсутня перехресна реактивність, зокрема не з Annexin VIII (Vac beta) .

14 Інформація для замовлення .

Для замовлення, будь ласка, зв'яжіться з: Див останню сторінку

15 Підготовка реагентів загальна інформація

15.1 Промивний буфер (1x)

Додайте концентрат буферу для промивки 20x (50 мл) до 950 мл дистильованої води.

Кількість стріпів	Промивний буфер концентрат (мл)	Дистильована вода (Мл)
1-6	25	475
1-12	50	950

15.2 Буфер аналізу

Додайте концентрат буферу аналізу 20x (5 мл) до 95 мл дистильованої води.

Кількість стріпів	Буфер аналізу концентрат (мл)	Дистильована вода (Мл)
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

15.3 Біотин-кон'югат

Зробіть 1: 100 розчин Біотин-кон'югата в буфері аналізу (1x):

Кількість стріпів	Біотин-кон'югат (мл)	Буфер аналізу
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

15.4 Стрептавідин –HRP

Зробіть 1:200 розведення Стрептавідину HRP в буфері аналізу (1x)

Кількість стріпів	Стрептавідин HRP (мл)	Буфер аналізу
1-6	0,03	5,97
1-12	0,06	11,94

15.5 Людський аннексин V стандарт

Відновіть ліофілізований людський Аннексин V стандарт з буфером аналізу (1x) .

(Об'єм відновлення вказаний на етикетці флаконів стандартів.)









16 Загальна інформація тестовий протокол

1. Визначте кількість необхідних стріпів мікропланшета.
2. Промийте стріпи мікропланшета двічі, використовуючи промивний буфер.
3. Розведення стандартів на мікропланшеті : додайте 100мкл розріджувача зразка, у двох примірниках до всіх лунок стандартів. Прокачайте 100мкл підготовленого стандарту в перші лунки та створюйте розведення стандартів, переносючи 100мл з лунки до лунки. Видаліть 100 мкл з останніх лунок. Альтернативно Зовнішнє розведення стандартів в пробірках (див. 9.5.1): Прокапати 100 мкл цих розведень стандартів в стріпи мікропланшета.
4. Додайте 100 мкл розріджувача зразків, у двох примірниках, до порожніх лунок.
5. Додайте 50 мкл розріджувача зразків до лунок зразків.
6. Додайте 50мкл зразка у двох примірниках до призначених лунок зразка.
7. Приготувати біотин-кон'югат.

8. Додайте 50 мкл біотин-кон'югату до всіх лунок.
9. Покрийте стріпи мікропланшета та інкубуйте 2 години при кімнатній температурі (від 18 до 25 ° C) .
10. Приготуйте стрептавідин-HRP.
11. Опорожніть и промийте стріпи мікропланшета 4 рази з промивним буфером.
12. Додайте 100 мкл розведеного стрептавідин-HRP до всіх лунок.
13. Покрийте стріпи мікропланшета та інкубуйте 1 годину при кімнатній температурі (від 18 до 25 ° C) .
14. Опорожніть та промийте стріпи мікропланшета 4 рази за допомогою промивного буфера.
15. Додайте до всіх лунок 100 мкл розчину субстрату ТМБ.
16. Інкубуйте стріпи мікропланшета приблизно 10 хвилин при кімнатній температурі (від 18 до 25 ° C) .
17. Додайте 100 мкл стоп-розчину до всіх лунок.
18. Налаштуйте рідер мікропланшетів «на бланк» та вимірюйте інтенсивність кольору при 450 нм.

Примітка: якщо інструкції в цьому протоколі були використані, проби розбавляли 1: 2 (50 мкл проби + 50 мкл розчинника зразка), концентрація, прочитана зі стандартної кривої, повинна бути помножена на коефіцієнт розведення (x 2).


УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

REF	№ Кат.:
LOT	№ Партії:
	Використати до:
	Кількість тестів:
CONC	Концентрат
LYO	Ліофілізований
IVD	Медичний пристрій для діагностики in vitro
	Оціночний набір
	Прочитайте інструкцію перед використанням
	Зберігати поодаль від джерел тепла і прямого сонячного світла.
	Зберігати при температурі:
	Виробник:
	Увага!
Умовні позначення компонентів див. у розділі «Матеріали, що входять до набору».	

СКАРГИ: Первинно скарги можна пред'явити в письмовому вигляді або усно. Згодом необхідно подати їх, включаючи хід дослідження та отримані результати, в письмовому вигляді, з аналітичних міркувань.

ГАРАНТІЯ: Гарантується відсутність у продукті дефектних матеріалів у межах відповідного терміну придатності, а також дотримання специфікацій, поданих разом із продуктом. Продукт слід використовувати за призначенням, відповідно до всіх інструкцій, наведених в інструкції з використання та в межах відповідного терміну придатності продукту. Будь-яка модифікація процедури аналізу, або обміну, або змішування компонентів різних партій може негативно вплинути на результати. Ці випадки анулюють будь-які вимоги про заміну.

ОБМЕЖЕННЯ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ: ЗА БУДЬ-ЯКИХ ОБСТАВИН РІВЕНЬ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ВИРОБНИКА ОБМЕЖУЄТЬСЯ ЗАКУПІВЕЛЬНОЮ ВАРТІСТЮ ВКАЗАНОВОГО (-ИХ) НАБОРУ (ІВ) . ЗА ЖОДНИХ УМОВ ВИРОБНИК НЕ МАЄ НЕСТИ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ ЗА ВИПАДКОВІ ЧИ ПОБІЧНІ ЗБИТКИ, У ТОМУ ЧИСЛІ ВТРАТУ ПРИБУТКУ, ВТРАТУ ПРОДАЖ, ТРАВМИ ЛЮДЕЙ ЧИ ПОШКОДЖЕННЯ ВЛАСНОСТІ АБО ІНШІ ВИПАДКОВІ ЧИ НЕПРЯМІ ЗБИТКИ.

	IBL International GmbH	Тел .:	+ 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11
	Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург,	E-MAIL:	IBL@IBL-International.com
	Німеччина	WEB:	http://www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua