

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАСПАЗЫ-3 ЧЕЛОВЕКА

BMS2012INST, Human Caspase-3

Каталог. № : **BMS2012INST**
Количество : **128**
Производитель: **Bender**
MedSystems GmbH, (Австрия)

Методика от **24-09-2012**
Версия **21**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор human Caspase-3 Instant ELISA предназначен для количественного определения уровня каспазы-3 человека в экстрактах клеток.

Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.

2. ВВЕДЕНИЕ

Каспазы - это семейство аспартат-специфических цистеиновых протеаз, которые участвуют в пошаговом сигнальном пути как киназы.

Каспазы присутствуют во всех клетках, взаимодействие этих протеаз с олигомерными рецепторами ведет к активации, сопровождающейся аутопротеолитическим расщеплением. Активные каспазы могут осуществлять протеолиз дополнительных каспаз, генерируя таким образом каспазный каскад, расщепляющий белки, критичные для выживания клеток. Конечный итог такого сигнального пути – это запуск контролируемой гибели клеток, называемой апоптозом. Подгруппа каспаз, вовлеченная в апоптоз, делится на инициаторные или эффекторные. Каспаза-3 расщепляет субстрат на карбоксильном конце по остаткам аспартата. Активная каспаза-3 имеет два активных сайта и состоит из двух одинаковых больших (~ 20 кДа) и двух одинаковых малых (~ 10 кДа) субъединиц, происходящих из двух полипептидов-предшественников каспазы-3. Каспаза-3 протеолитически активируется другими каспазами.

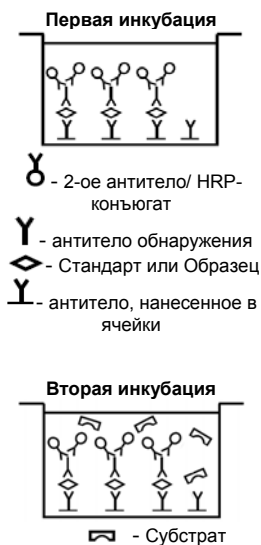
Обе субъединицы участвуют в связывании субстрата и его катализе. Цистеин активного сайта, который ковалентно связывает субстрат, расположен рядом с С-концом большой субъединицы. Активная каспаза-3 обладает двойной симметрией, с двумя карманами активного сайта, расположенными на противоположных сторонах. Каспаза-3, совместно с каспазами 8 и 9, принадлежал центральному комплексу путей апоптоза.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

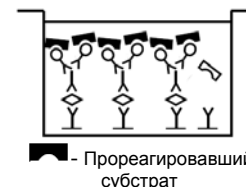
Моноклональные анти-каспаза-3 антитела адсорбированы в ячейках микропланшета.

Каспаза-3, присутствующая в образцах или стандартах, внесенных в ячейки планшета, связывается с антителами, адсорбированными в ячейках. Поликлональные антитела к каспазе-3 связывают молекулы каспазы-3, захваченные первыми антителами. Конъюгат анти-кроличьих антител с пероксидазой хрена (анти-кроличьи/HRP) связывается со вторыми антителами к каспазе-3.

После инкубации и промывки из ячеек удаляются не связавшиеся анти-каспаза-3 антитела и анти-кроличьи/HRP, и в ячейки добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора. Реакция останавливается добавлением кислоты. Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации



каспазы-3, присутствующей в образцах. Концентрация каспазы-3 в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта каспазы-3.



4. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Кол-во
96-луночный микропланшет, покрытый мышинными моноклональными антителами к каспазе-3 человека. Выявляющие антитела (Поликлональные антитела к каспазе-3), Буфер для разведения образцов, Конъюгат анти-кроличьих антител и пероксидазы хрена, HRP-конъюгат , лиофилизированные	1 алюминиевый пакет
Стандартная кривая каспазы-3 (окрашенная)	2 алюминиевых пакета
Концентрат Промывочного Буфера, 25 мл	1 флакон
Субстратный раствор (ТМВ), 15 мл	1 флакон
Разбавитель образцов, 12 мл. Использовать, когда необходимо внешне предварительное разведение образцов	1 флакон
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл.	1 флакон
Лизирующий буфер, концентрат 10x, 15 мл	1 флакон
Плѐнки для заклеивания стрипов	2

5. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Храните микропланшет и Стандартные кривые или весь набор при -20°C. Можно вытащить микропланшет и Стандартные кривые и хранить их отдельно при -20°C, а остальной набор хранить при 2° - 8°C. Сроки годности реагентов и набора указаны на этикетках. Только при соответствующем хранении и исключении контаминации во время предыдущего использования набора гарантируется качественная работа реагентов.

6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для анализа могут использоваться клеточные экстракты.

Приготовьте экстракты клеток после индуцирования апоптоза. Может быть использовано множество протоколов экстракции. Протокол, описанный ниже, приведен только в качестве примера подходящей процедуры экстракции, но не должен рассматриваться как метод, обязательный к использованию. Пользователи могут желать проводить эксперименты, используя другие процедуры экстракции, которые в их исполнении работают лучше.

Протокол получения лизата клеток:

- Для суспензии клеток, осадите центрифугированием, удалите супернатант и переходите к шагу 3. Для прилипающих клеток, удалите супернатант с клеток.
- Промойте клетки 1 раз PBS, соберите клетки соскабливанием и аккуратно центрифугируйте.
- Аспирируйте PBS, оставляя клеточный осадок нетронутым (на этом этапе осадок клеток может быть заморожен при -80 °C и лизирован позже). Ресуспендируйте осадок в лизирующем буфере, на каждые 5 X 10⁶ клеток рекомендуется использовать по 1 мл лизирующего буфера.
- Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре при аккуратном шейкере.
- Перенесите экстракты в микроцентрифужные пробирки и центрифугируйте при 1000 x g 15 минут.
- Аликвотируйте чистые лизаты в чистые микроцентрифужные пробирки. Теперь образцы готовы для анализа согласно инструкции, описанной в разделе **Протокол анализа**. Лизаты могут быть заморожены при -80 °C и протестированы позднее. Образцы должны быть разделены на небольшие аликвоты, чтобы избежать повторных циклов замораживания/оттаивания.

Стабильность и пригодность образцов описаны в соответствующих главах.

Замечание: Образцы, в которых содержится более 100 нг/мл Каспазы-3 (т.е. за пределами диапазона калибровочной кривой), должны быть разведены поставляемым в наборе буфером для разведения образцов, так, чтобы концентрация каспазы-3 попадала в диапазон, охватываемый калибровочной кривой, и протестированы повторно.

7. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Градуированные пипетки на 5 и 10 мл

- Калиброванные пипетки одноканальные переменного объема с одноразовыми наконечниками на 5 – 1000 мкл
- Многоканальные пипетки переменного объема с одноразовыми наконечниками на 50 – 300 мкл
- Ванночка для реагентов для использования с многоканальной пипеткой
- Калиброванные стаканы и цилиндры, необходимые для приготовления реактивов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, при возможности, фильтром сравнения ≥ 620 нм
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов (линейная регрессия)

8. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в диагностических или терапевтических процедурах.
2. Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.
3. Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
4. Избегайте облучения реагентов сильным источником света во время хранения и инкубации.
5. Не пипетируйте ртом.
6. Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ.
7. Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми.
8. При ручном методе анализа пользуйтесь резиновыми или латексными перчатками для защиты рук.
9. Избегайте контакта субстратного раствора с металлами и окислителями.
10. Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей.
11. Чтобы избежать микробного загрязнения или загрязнения реактивами и получения в результате недостоверных результатов, пользуйтесь одноразовыми наконечниками.
12. Используйте чистую, специально выделенную посуду для конъюгатов и субстратного раствора.
13. Для приготовления реактивов используйте дистиллированную или деионизированную воду.
14. Субстратный раствор должен иметь комнатную температуру перед использованием
15. Обеззараживайте после работы образцы, так как они могут быть инфицированы, предпочтительно автоклавированием не менее 1 часа при 121.5 °С.
16. Жидкие отходы, не содержащие кислоту, и нейтрализованные необходимо смешать с раствором гипохлорита натрия таким образом, чтобы получился в итоге 1% раствор гипохлорита. Оставьте полученную смесь на 30 минут для эффективного обеззараживания. Жидкие отходы, содержащие кислоту, необходимо нейтрализовать до обеззараживания раствором гипохлорита натрия.

9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Концентрат буфера должен быть доведен до комнатной температуры и разбавлен перед началом процедуры. Если кристаллы образовались в буферном концентрате, слегка разогрейте его до полного растворения.

9. Концентрат буфера для промывок

Разведите 25 мл концентрата буфера для промывок дистиллированной водой в мерном цилиндре до конечного объема 500 мл. Перемешайте, избегайте вспенивания. Перенесите Буфер для промывок в чистую стеклянную емкость. Храните буфер для промывок при 2-25 °С. Буфер для промывок стабилен 30 дней.

9.2. Лизирующий буфер

Разведите все содержимое (15 мл) Концентрата Лизирующего Буфера в чистом 150 мл градуированном цилиндре. Разведите до конечного объема 150 мл дистиллированной или деионизированной водой и слегка смешайте. Храните при комнатной температуре.

10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

- Используйте планшет немедленно после того, как его достали из температурной среды -20°C!
- Не ждите, пока осадки полностью растворятся перед внесением образцов – реакция связывания в стандартных стрипах начинается немедленно после добавления воды!
- Не пытайтесь растворить осадки пипетированием вверх/вниз в лунках – какие-то части осадков могут налипнуть на наконечник, вызывая высокую вариабельность результатов.
- Выполняйте шаг промывки, используя не менее 400 мкл буфера для промывок, как задано в руководстве, или

заполняйте лунки полностью – в противном случае остатки осадка, налипшие на края лунки не будут удалены и явятся причиной высокой вариабельности результатов.

- Оставьте буфер для промывок в лунках на несколько секунд (замачивание) перед аспирацией.
 - Удалите покрытие стандартных стрипов аккуратно, так, чтобы все лиофилизированные осадки остались в лунках.
- a. Определите по количеству образцов требуемое для проведения анализа число 8-луночных стрипов, плюс один 8-луночный стрип для бланков и стандартов (окрашенный). Все Образцы и Контроль (опционально) необходимо анализировать в дублях. **Неиспользуемые стрипы** выньте из держателя и сразу уберите в пакет с осушителем, плотно закройте и храните при -20°C. Поместите стрип, содержащий калибровочную кривую в позицию A1/A2 - H1/H2 (см. Таблицу 1).
 - b. Добавьте **дистиллированную воду** во все лунки со стандартами и бланками (от A1, A2 до H1, H2).
 - c. Добавить 140 мкл **дистиллированной воды** во все лунки с образцами.
- Таблица 1: Пример расположения образцов, бланка и стандартов на Планшете для разведений

	1	2	3	4
A	Ст #1 (10.0 нг/мл)	Ст #1 (10.0 нг/мл)	O 1	O 1
B	Ст #2 (5.0 нг/мл)	Ст #2 (5.0 нг/мл)	O 2	O 2
C	Ст #3 (2.50 нг/мл)	Ст #3 (2.50 нг/мл)	O 3	O 3
D	Ст #4 (1.25 нг/мл)	Ст #4 (1.25 нг/мл)	O 4	O 4
E	Ст #5 (0.63 нг/мл)	Ст #5 (0.63 нг/мл)	O 5	O 5
F	Ст #6 (0.31 нг/мл)	Ст #6 (0.31 нг/мл)	O 6	O 6
G	Ст #7 (0.16 нг/мл)	Ст #7 (0.16 нг/мл)	O 7	O 7
H	Бланк	Бланк	O 8	O 8

Ст – Стандарт, O – образец

- d. Добавьте по 10 мкл **образцов**, в дублях, в соответствующие лунки, предназначенные для образцов.
- e. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 3 часа при комнатной температуре (18° to 25°C), если возможно, используя орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- f. Снимите **плёнку** и полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 6 раз, используя по 400 мкл Буфера для промывок, полностью удаляя жидкость между промывками. Избегайте царапин на поверхности ячеек. Стряхните планшет на фильтровальной бумаге после последней промывки. Используйте стрипы немедленно после стряхивания или максимум через 15 минут при условии, что стрипы уложены на влажную фильтровальную бумагу в перевернутом виде. Не позволяйте ячейкам высохнуть!
- g. Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора ТМБ** во все ячейки, включая «Бланк».
- h. Инкубируйте при комнатной температуре около 10 минут, избегайте попадания прямого солнечного света, **За развитием окраски необходимо наблюдать и субстратная реакция должна быть остановлена (см. пункт j. протокола) до того, как значение оптической плотности в положительных лунках превысят предел определения прибора.** Рекомендуется останавливать реакцию добавлением стоп-раствора тогда, когда самый высокий стандарт окрасится в темно-голубой цвет. Альтернативно, развитие окрашивания можно наблюдать с помощью ИФА анализатора при длине волны 620 нм. Субстратная реакция должна быть остановлена как только будет достигнута ОП 0.9 – 0.95.
- i. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в ячейках. Важно вносить стоп-раствор быстро и с той же скоростью, что и субстратный раствор. Оптическую плотность считать немедленно после внесения стоп-раствора или в течение 1 часа при условии, что стрипы находились всё это время при температуре 2-8°C в темноте.
- j. Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм против «Бланка», желательнее использовать длину волны сравнения 620 нм (допустима длина волны сравнения в диапазоне 610-650 нм). Бланкируйте микропланшетный ридер так, как это описано в инструкции производителя, с использованием лунок «бланк». Абсорбцию определяйте как в неизвестных образцах, так и в стандартах Каспазы-3.

Замечание: если инкубация проводилась без встряхивания, значения могут быть ниже, чем в примере, приведённом ниже. Тем не менее, эти результаты также считаются достоверными.

11. РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитайте результаты. Для этого рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта и образца. Отклонение от среднего не должно быть более 20%.
- Используя графическую бумагу, отметьте точки считанных значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации **Каспазы-3** на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Для определения концентрации **Каспазы-3** в образцах сначала найдите соответствующее среднее значение абсорбции на оси ординат, затем проведите перпендикулярную оси прямую линию (горизонтально) до пересечения со стандартной кривой. Из точки пересечения проведите вертикальную линию до пересечения с абсциссой и считайте соответствующее значение концентрации **Каспазы-3**.
- В ходе анализа образцы были разведены в 10 раз, следовательно концентрации, полученные из калибровочной кривой, должны быть умножены на коэффициент разведения (x10).**
- Согласно описанному протоколу лизиса определяемая концентрация также может быть соотнесена с количеством клеток (1мл = 5x10⁶ клеток)**
- Подразумевается, что каждая лаборатория должна установить свой контрольный образец с известной концентрацией **Каспазы-3** и включать его в каждую постановку. Если полученные для контроля значения не укладываются в диапазон ожидаемых значений для данного контроля, результаты анализа могут быть недостоверны.
- Пример стандартной кривой показан на Рисунке 4. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

*N.B: Из-за конъюгата существует общий коэффициент разведения для стандартов и образцов, который должен быть учтен при расчетах. Доля и стандартов и образцов в конечном объеме составляет по 100 мкл на лунку. Для лунок с образцами эти 100 мкл состоят из 90 мкл буфера для разведения образцов, плюс 10 мкл образца. Это разведение в 10 раз.

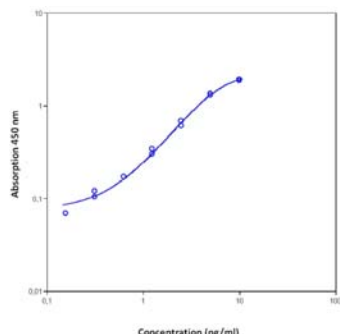
Остальные 50 мкл, в сумме дающие 150 мкл, учитываются как 50 мкл конъюгата, во всех лунках.

Схема заполнения лунок:

Лунки стандартов: 100 мкл стандарта и 50 мкл конъюгата, конечный объем после растворения составляет 150 мкл.

Лунки образцов: 90 мкл буфера для разведения образцов и 50 мкл конъюгата составляют объем после растворения 140 мкл, и добавляется 10 мкл образца (90 мкл + 10 мкл = разведение в 10 раз)

Рисунок 4. Пример стандартной кривой для Каспазы-3 ELISA. Была приготовлена серия последовательных двукратных пошаговых разведений Каспазы-3 рабочим буфером. Каждый символ обозначает среднее значение из трех параллельных титрований. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.



Типичные результаты, полученные с использованием данного набора.

Измерение на 450 нм

Длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	Концентрация Каспазы-3 нг/мл	О.П. (450 нм)	О.П. среднее	C.V. (%)
1	10.00	1.922 1.866	1.894	1.5
2	5.00	1.343 1.278	1.311	2.5
3	2.50	0.609 0.674	0.642	5.1

4	1.25	0.300 0.341	0.321	6.4
5	0.63	0.171 0.171	0.171	0.0
6	0.31	0.104 0.120	0.112	7.1
7	0.16	0.070 0.069	0.070	0.7
Бланк	0.00	0.045 0.044	0.045	1.1

Значения ОП стандартной кривой могут меняться согласно условиям проведения теста. Более того, срок годности набора могут влиять на интенсивность цвета. Значения все же действительны.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Так как точные условия могут меняться от анализа к анализу, стандартная кривая должна быть включена в каждую серию анализа.
- Бактериальное или грибковое загрязнение образцов или реактивов, или перекрестное загрязнение реактивов могут привести к недостоверным результатам.
- Предпочтительно использование одноразовых наконечников, флаконов, многоразовая стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта и следы детергента должны быть полностью удалены перед использованием.
- Неполная промывка на любом этапе негативно влияет на точность результатов и может привести как к ложноположительным, так и к ложноотрицательным результатам. Полностью удаляйте Промывочный буфер из ячеек между циклами промывки. Наполняйте лунки буфером для промывок как это указано, для каждого цикла промывки. Не позволяйте ячейкам высохнуть или оставаться незакрытыми долгий период времени.
- Использование радиоиммунотерапии значительно увеличило число пациентов с человеческими анти-мышинными IgG антителами (НАМА). НАМА могут влиять на тесты, в которых используются мышинные моноклональные антитела, которые приводят к фальшиво позитивным и фальшиво негативным результатам. Образцы сыворотки, содержащие антитела к мышинным иммуноглобулинам (сыворотка, асцитическая жидкость или моноклональные антитела нерелевантной специфичности) добавляются в Образец.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

13.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация Каспазы, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 0.12 нг/мл (среднее 6 независимых определений).

13.2 Воспроизводимость

13.2.1 Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась в 3 независимых сериях анализа. В каждой серии анализа было выполнено 6 определений каждого из 4 образцов лизатов, содержащих различные концентрации Каспазы-3. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. Полученные данные приведены в таблице ниже. Коэффициент вариации составил в среднем 7.7 %.

Положительный образец	Эксперимент	Концентрация Каспазы-3, нг/мл	Козфф. Вариации (%)
1	1	31.3	5
	2	31.4	9
	3	27.5	5
2	1	17.2	9
	2	15.7	7
	3	15.9	9
3	1	53.8	9
	2	56.5	3
	3	59.0	10
4	1	97.2	9
	2	105.3	10
	3	97.4	8

13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определялась в одной лаборатории в 3-х независимых сериях анализа, 3 различными лаборантами. В каждой серии анализа было выполнено 6 определений каждого из 4 образцов лизатов, содержащих различные концентрации Каспазы-3. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. Полученные данные приведены в таблице ниже. Коэффициент вариации был рассчитан из 18 определений каждого образца и составил в среднем 5.4%.

Образец	Концентрация Каспазы-3, нг/мл	Кэфф. Вариации (%)
1	30.1	7.4
2	16.2	5.0
3	56.5	4.6
4	100.0	4.6

13.3 Линейность разведения

4 образца лизатов с различными уровнями Каспазы-3 были проанализированы в четырех двукратных серийных разведениях (1:10-1:80) по 4 повтора каждый. Ниже в таблице указан процент извлечения от ожидаемых значений. Диапазон значений извлечения составил 88.3% – 118.1%, в среднем 105.0%.

Образец	Разведение	Концентрация Каспазы-3, нг/мл		
		Ожидаемое значение	Наблюдаемое значение	% извлечения
1	1:10	--	28.4	--
	1:20	14.2	15.8	111.4
	1:40	7.9	7.5	94.5
	1:80	3.7	3.3	88.3
2	1:10	--	75.1	--
	1:20	37.5	38.8	103.4
	1:40	19.4	21.4	110.1
	1:80	10.7	12.4	116.4
3	1:10	--	64.3	--
	1:20	32.1	34.1	106.0
	1:40	17.0	19.4	114.2
	1:80	9.7	11.5	118.1
4	1:10	--	31.5	--
	1:20	15.8	16.5	104.6
	1:40	8.2	8.0	96.6
	1:80	4.0	3.9	96.7

13.4 Стабильность образцов

13.4.1 Стабильность при замораживании/оттаивании

Аликвоты образцов лизатов хранили при температуре -20°C , и оттаивали до 5 раз, после чего определяли уровни Каспазы-3. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности Каспазы-3 при повторных циклах замораживания/оттаивания.

13.4.2 Стабильность при хранении

Аликвоты образцов хранились при температуре -20°C , $2-8^{\circ}\text{C}$, комнатной температуре (RT) и при 37°C в течение 72 часов, после чего определялись уровни Каспазы-3. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности Каспазы-3 при хранении при -20°C и $2-8^{\circ}\text{C}$, хранение при RT привело к 20% потере, хранение при 37°C - к 30% потере иммунореактивности Каспазы-3.

14. ЛИТЕРАТУРА

(См. оригинал инструкции).

15. СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

15.1 Промывочный буфер

Добавить Концентрат Промывочного буфера 20 x (25 мл) в 475 мл дистиллированной воды

15.2 Лизирующий буфер (1x)

Добавить Концентрат Лизирующего буфера 10 x (15 мл) в 135 мл дистиллированной воды

16. СХЕМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

- Поместите стрип со стандартами в позицию A1/A2 - H1/H2.
- Добавьте по 140 мкл **дистиллированной воды** в ячейки, предназначенные для образца.
- Добавьте **дистиллированной воды, в дубликate**, в ячейки, предназначенные для стандарта и бланка как указано на этикетке стандартных стрипов.
- Добавьте по 10 мкл **образца** в соответствующие ячейки.
- Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 3 часа при комнатной температуре (18° to 25°C), если возможно, на орбитальном встряхивателе при 200 об/мин.
- Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 6 раз 400 мкл **Промывочным буфером**.
- Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора TMB** во все ячейки, включая лунки для Бланка.
- Инкубируйте микропланшет около 10 минут при комнатной температуре (18° to 25°C).
- Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки, включая Бланк.

- Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм против «Бланка».

Примечание: В ходе анализа образцы были разведены в 10 раз, следовательно, концентрации, полученные из калибровочной кривой, должны быть умножены на коэффициент разведения (x10).



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com