

# НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО АННЕКСИНА V

## BMS252/BMS252TEN, Annexin V

Каталог. №: BMS252/BMS252TEN

Количество: 96, 10x96

Производитель: Bender MedSystems GmbH, (Австрия)

Методика от 14-08-2012

Версия 22



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

**Только для исследовательских целей  
Не для использования в диагностических или терапевтических процедурах**

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данный набор предназначен для количественного определения человеческого Аннексина V. Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических или терапевтических процедурах.

### 2. ВВЕДЕНИЕ

Аннексины – это семейство кальций-зависимых, фосфолипид-связывающих белков. Они в избытке присутствуют у эукариот. Не смотря на то, что их структура хорошо исследована (3), их функции in vivo остаются неясными (1). Определенно, они принадлежат к семейству повсеместно присутствующих цитоплазматических белков, вовлеченных в сигнальную трансдукцию. Для всех аннексинов было показано наличие предполагаемого сайта связывания протеинкиназы C, но только аннексин V может обладать потенциальным псевдо-субстратным сайтом. Таким образом, похоже, что аннексин V модулирует активность части протеинкиназы C и их субстратов (2).

Было обнаружено, что аннексин V играет основную роль в кальцификации внеклеточного хрящевого матрикса путем регуляции кальциевых каналов (6). Аннексин V связывается с прокоагулянтными фосфолипидами (Vascular anticoagulant alpha, сосудистый антикоагулянт  $\alpha$ ) с высокой аффинностью. Аннексин V связывается преимущественно с фосфатидилсеринем (PS). PS чаще всего расположен на стороне мембраны, обращенной к цитозолю. Однако недавние исследования показали, что каждый тип клеток имеет механизм, с помощью которого происходит экспонирование PS на клеточной поверхности. Этот механизм активируется в период апоптоза. Как только PS экспонируется на клеточной поверхности, она проявляет прокоагулянтную и провоспалительную активности. Аннексин V будет связываться с экспонированным на поверхности апоптотических клеток PS и ингибировать прокоагулянтную и провоспалительную активности гибнущих клеток. Эти открытия, совместно с фактом присутствия аннексина V в межклеточном пространстве рисуют новую картину патофизиологической значимости аннексина V in vivo (4). С помощью данного ИФА метода (ELISA) может быть определен общий уровень эндогенного аннексина V, что позволит еще глубже проникнуть в суть патофизиологической роли аннексина V (5).

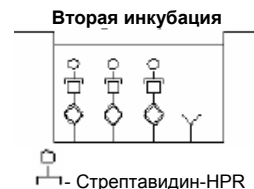
### 3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Антитела, специфичные к аннексину V, сорбированы в ячейках планшета.

Человеческий аннексин V в образце или стандарте связывается с антителами в ячейках планшета. Добавляемый конъюгат Биотин-моноклональные анти-аннексин V-антитела связывают аннексин V, захваченный первыми антителами.



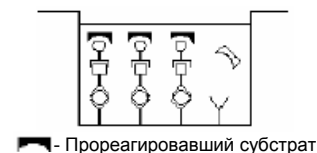
После инкубации и промывки из ячеек удаляется не связавшийся биотиновый конъюгат, и в ячейки добавляется конъюгат стрептавидин-пероксидазы, связывающий биотин, конъюгированный с аннексин V.



После второй инкубации и промывки из ячеек удаляется не связавшийся стрептавидиновый конъюгат, и в ячейки добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора.



Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации аннексина V, присутствующего в образцах. Концентрация аннексина V в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта.



### 4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

#### 4.1 Реагенты в наборе Человеческий Annexin V ELISA BMS252 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому аннексину V	1 планшет
Конъюгат моноклональных анти-аннексин V антител и биотина, 100 мкл	1 флакон
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 150 мкл	1 флакон
Стандарт аннексина V, лиофилизированный, 100 нг/мл	2 флакона
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	1 флакон
Разбавитель образцов, 12 мл	1 флакон
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20и 10% BSA), 5 мл	1 флакон
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	1 флакон
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл	1 флакон
Голубой краситель, 0,4 мл	1 флакон
Зелёный краситель, 0,4 мл	1 флакон
Красный краситель, 0,4 мл	1 флакон
Плётки для заклеивания стрипов	4

#### 4.1 Реагенты в наборе Человеческий Annexin V ELISA BMS252TEN (10 x 96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому аннексину V	10 планшетов
Конъюгат моноклональных анти-аннексин V антител и биотина, 100 мкл	10 флаконов
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 150 мкл	10 флаконов
Стандарт аннексина V, лиофилизированный, 100 нг/мл	10 флаконов
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	5 флаконов
Разбавитель образцов, 12 мл	10 флаконов
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20и 10% BSA), 5 мл	2 флакона
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	10 флаконов
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл	10 флаконов
Голубой краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Зелёный краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Красный краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Плётки для заклеивания стрипов	20

### 5. ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ – НАБОР ИФА

Храните компоненты набора при температуре 2-8°C. Сразу после использования верните реагенты в холодильник. Храните до даты, указанной на упаковке реагентов.

Стабильность набора компонентов может быть гарантирована только при надлежащем хранении, и, в случае повторного

использования одного компонента, если этот компонент не был загрязнен при первом использовании.

## 6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Для анализа могут использоваться супернатант клеточных культур, человеческая сыворотка, плазма или моча. Отделите сыворотку от сгустка эритроцитов как можно скорее после свёртывания крови. Образцы, содержащие видимый преципитат, необходимо отделить от него до анализа. Не используйте сильно гемолизованные или липемические образцы.

Если анализ будет выполнен в ближайшие 24 часа, образцы могут храниться при 2-8 °С. Для хранения образцов более 24 часов следует использовать температуру -20 °С и ниже.

Избегайте повторных циклов замораживания - размораживания образцов. До начала анализа медленно разморозьте образцы и осторожно перемешайте. Не оттаивайте образцы при 37 °С на водяной бане, не перемешивайте образцы на вортексе и не допускайте резкого встряхивания.

## 7. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Калиброванные пипетки на 5 мл и 10 мл
- Калиброванные пипетки одноканальные переменного объема с одноразовыми наконечниками на 5 – 1000 мкл
- Многоканальные пипетки 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, по возможности, фильтром сравнения  $\geq 620$  нм
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов (линейная регрессия)

## 8. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

1. Все химикаты считать потенциально опасными. Рекомендуется использование данных реагентов только квалифицированным персоналом в лабораторных условиях. Использовать защитную одежду, очки и перчатки. Избегать контакта с глазами и кожей. В случае контакта, промыть с большим количеством воды.
2. Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.
3. Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.
4. Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
5. Избегайте облучения реагентов сильным источником света во время хранения и инкубации.
6. Не пипетируйте ртом.
7. Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ.
8. Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми.
9. При ручном методе анализа пользуйтесь латексными перчатками для защиты рук.
10. Избегайте контакта субстратного раствора с металлами и окислителями.
11. Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей.
12. Чтобы избежать микробного загрязнения или загрязнения реактивами и получения в результате недостоверных результатов, пользуйтесь одноразовыми наконечниками.
13. Используйте чистую, специально выделенную посуду для конъюгатов и субстратного раствора.
14. Загрязнение кислотой инактивирует конъюгат.
15. Для приготовления реактивов используйте дистиллированную или деионизированную воду.
16. Субстратный раствор должен иметь комнатную температуру перед использованием
17. Обеззараживайте после работы образцы, так как они могут быть инфицированы, предпочтительно автоклавированием не менее 1 часа при 121,5 °С
18. 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. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

**Буферные концентраты** привести к комнатной температуре и развести перед началом анализа.

Если в **Буферных концентратах** образовались кристаллы, аккуратно подогреть их до полного растворения.

### 9.1 Промывающий раствор (1 х)

Разбавьте 50 мл **концентрата** дистиллированной или деионизированной водой в мерном цилиндре до конечного объема 1,0 л. Перемешайте, избегая вспенивания.

Храните Промывающий раствор при 2-25 °С. Промывающий раствор стабилен 30 дней.

Промывающий раствор (1 х) также может быть приготовлен согласно следующей таблице:

Количество используемых стрипов	Концентрат промывающего раствора, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

### 9.2 Рабочий буфер (1 х)

Хорошо перемешайте **концентрат Рабочего буфера**. Разбавьте 5,0 мл концентрата дистиллированной водой в мерном цилиндре до конечного объема 100,0 мл. Перемешайте, избегая вспенивания.

Храните Разбавитель образцов при 2-8 °С. Разбавитель образцов стабилен 30 дней.

Рабочий буфер (1 х) также может быть приготовлен согласно следующей таблице:

Количество используемых стрипов	Концентрат Разбавителя образцов, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

### 9.3 Конъюгат биотина

**Заметьте, что Конъюгат биотина должен быть использован в течение 30 минут после разведения.**

Разбавьте концентрат Конъюгата **Рабочим буфером** (Реагент В) в 100 раз в чистой пластиковой посуде согласно следующей таблице:

Кол-во стрипов	Концентрат конъюгата, мл	Рабочий Буфер, мл
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

### 9.4 Стрептавидин-HRP

**Заметьте, что Стрептавидин-HRP должен быть использован в течение 30 минут после разведения.**

Разбавьте концентрат Конъюгата **Рабочим буфером** в соотношении 1:200 в чистой посуде.

Кол-во стрипов	Стрептавидин-HRP (мл)	Рабочий буфер(1х) (мл)
1-6	0,03	5,97
1-12	0,06	11,94

### 9.5 Стандарт человеческого Аннексина V

Растворите лиофилизированный стандарт **Рабочим буфером** (точный объем стандартного раствора, который должен получиться в результате растворения, указан на этикетке флакона). Оставьте Стандарт на 10-30 минут. Аккуратно перемешайте. (концентрация стандарта = 100 нг/мл).

**Разбавленные Стандарты** могут быть приготовлены прямо на планшете или в пробирках.

#### 9.5.1 Внешнее разведение Стандарта

Пометить 7 пробирок, одну для каждой точки стандарта. S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7.

Затем подготовить серийные разведения 1:2 для стандартной кривой как указано ниже:

Пипетировать 225 мкл Разбавителя Образцов в каждую пробирку.

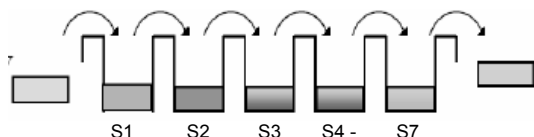
Пипетировать 225 мкл восстановленного стандарта (концентрация стандарта = 100 нг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1 = 50 нг/мл).

Пипетировать 225 мкл этого раствора во вторую пробирку, помеченную S2, и тщательно перемешать перед следующим перемещением.

Повторить серийные разведения еще 5 раз, таким образом формируя точки стандартной кривой (См. рисунок ниже).

Разбавитель образцов служит в качестве бланка.

Переносить по 225 мкл

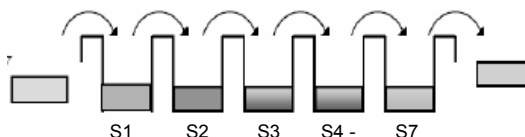


Восстановленный Стандарт Человеческого Аннексина V

Разбавитель образцов 225 мкл

Удалить 225 мкл

Переносить по 100 мкл



Восстановленный Стандарт Человеческого Аннексина V

Разбавитель образцов 100 мкл

Удалить 100 мкл

## 9.6 Добавление окрашивающих реагентов: голубого, зеленого и красного

Для исключения ошибок в пипетировании при работе с иммуноферментными наборами фирма Bender MedSystems теперь предлагает дополнительное средство для контроля пипетирования даже очень маленьких объемов реагентов – каждый реагент будет отличаться от других цветом.

Эта процедура **необязательна**, она не влияет на результаты анализа и предназначена для облегчения работы лаборанта, поэтому можно этот шаг инструкции пропустить (не выполнять).

Альтернативно, можно использовать основные растворы красителей (голубой, зелёный, красный), добавляя их к соответствующему реагенту согласно протоколу (смотри Таблицы ниже).

**1. Разбавитель образцов:** перед разбавлением образцов добавьте **голубой краситель** в соотношении 1:250 (См. Таблицу) в рабочий раствор **Разбавителя образцов** (1x) и выполняйте дальше исследование, следуя инструкции.

5 мл Разбавителя образцов	20 мкл <b>Голубого красителя</b>
12 мл Разбавителя образцов	48 мкл <b>Голубого красителя</b>
50 мл Разбавителя образцов	200 мкл <b>Голубого красителя</b>

**2. Конъюгат биотина:** перед разбавлением концентрата биотинового конъюгата добавьте **зелёный краситель** в соотношении 1:100 (смотри таблицу) к Рабочему буферу, используемому для разбавления конъюгата, окрашенный биотиновый конъюгат используйте согласно инструкции.

3 мл Рабочего буфера (1 x)	30 мкл <b>Зеленого красителя</b>
6 мл Рабочего буфера (1 x)	60 мкл <b>Зеленого красителя</b>

**3. Конъюгат стрептавидина:** перед разбавлением концентрата конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена добавьте **красный краситель** в соотношении 1:250 (смотри таблицу) к Рабочему буферу, используемому для разбавления конъюгата, окрашенный стрептавидиновый конъюгат используйте согласно инструкции.

6 мл Рабочего буфера (1 x)	24 мкл <b>Красного красителя</b>
12 мл Рабочего буфера (1 x)	48 мкл <b>Красного красителя</b>

## 10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

a. Все реагенты и образцы перед началом анализа должны быть выдержаны при комнатной температуре. Жидкие реагенты тщательно перемешайте осторожным переворачиванием перед использованием, избегая образования пены.

Достаньте требуемое для проведения анализа число 8-луночных стрипов. Поместите требуемое количество стрипов в держатель (к необходимому числу ячеек для Образцов добавьте ячейки для Бланка, Стандартов и Контроля). Все Стандарты, Бланк и Образцы необходимо анализировать в дублях. **Неиспользованные стрипы** сразу уберите в пакет с осушителем и храните плотно закрытым при 2-8°C.

b. Промойте ячейки 2 раза 400 мкл **Промывочного Буфера**, полностью удаляя жидкость между промывками. Оставьте на 10-15 секунд. 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!**

c. **Разведение стандарта на планшете** (альтернативно разбавление стандарта может быть приготовлено в пробирках): Добавить 100 мкл Разбавителя для образцов в дублях ко всем **стандартам**. Приготовьте стандартные разведения добавлением по 100 мкл разбавленного **Стандарта Аннексина V** (раздел «Приготовление реагентов» 9.D) в ячейки A1 и A2 в дублях (См. табл. 1). Перемешайте содержимое ячеек A1 и A2 и перенесите по 100 мкл раствора из ячеек A1 и A2 в ячейки B1 и B2 соответственно. Во время этих манипуляций постарайтесь не поцарапать внутреннюю поверхность ячеек. Повторите перенос и разведение стандартов 5 раз, получив в итоге 2 ряда разведений стандарта Аннексина V в диапазоне от 50 до 0.78 нг/мл. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).

При **внешнем разведении стандарта** пипетировать 100 мкл этих разведений стандартов (S1-S2) в лунки для стандартов согласно таблице 1.

Таблица 1: Схема расположения образцов, бланка и стандартов на планшете.

	1	2	3	4
A	Ст #1 (50 нг/мл)	Ст #1 (50 нг/мл)	O 1	O 1
B	Ст #2 (25 нг/мл)	Ст #2 (25 нг/мл)	O 2	O 2
C	Ст #3 (12.5 нг/мл)	Ст #3 (12.5 нг/мл)	O 3	O 3
D	Ст #4 (6.25 нг/мл)	Ст #4 (6.25 нг/мл)	O 4	O 4
E	Ст #5 (3.13 нг/мл)	Ст #5 (3.13 нг/мл)	O 5	O 5
F	Ст #6 (1.56 нг/мл)	Ст #6 (1.56 нг/мл)	O 6	O 6
G	Ст #7 (0.78 нг/мл)	Ст #7 (0.78 нг/мл)	O 7	O 7
H	Бланк	Бланк	O 8	O 8

Ст – Стандарт, O – образец

- Внесите по 100 мкл **Разбавителя образцов** в дубликаты в ячейки «Бланк».
- Внесите по 50 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для образцов.
- Внесите по 50 мкл каждого **образца** в дублях в соответствующие ячейки.
- Приготовьте **биотиновый конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов»).
- Добавьте по 50 мкл **биотинового конъюгата** во все ячейки.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- Приготовьте **стрептавидиновый конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов»).
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 4 раза как указано в шаге «с» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Внесите по 100 мкл разбавленного стрептавидинового конъюгата во все ячейки, включая бланк.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 4 раза как указано в шаге «с» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора** ТМБ во все ячейки.
- Инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течение примерно 10 минут. Время инкубации с субстратным раствором определяется типом используемого микропланшетного ридера. Многие ридеры способны считать оптическую плотность только до 2,0 Ед оптической плотности.

**Для подобных фотометров реакция должна быть остановлена до достижения наиболее ярко окрашенными ячейками предела измерения инструмента.**

Рекомендуется добавление стоп раствора, когда наивысший стандарт достиг темно-синего цвета. Реакция должна быть остановлена как только Стандарт 1 достиг значения ОП 0.9 – 0.95.

- Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в ячейках. Важно вносить стоп-реагент быстро и с той же скоростью, что и

субстратный раствор. Оптическую плотность считать немедленно после внесения стоп-реагента или в течение 1 часа при условии, что стрипы находились всё это время при температуре 2-8°C в темноте.

- г. Определите оптическую плотность всех 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 согласно руководству производителя, используя ячейки «Бланк». Определите ОП как в ячейках, содержащих образцы, так и в ячейках, содержащих разведения стандарта Аннексина V.

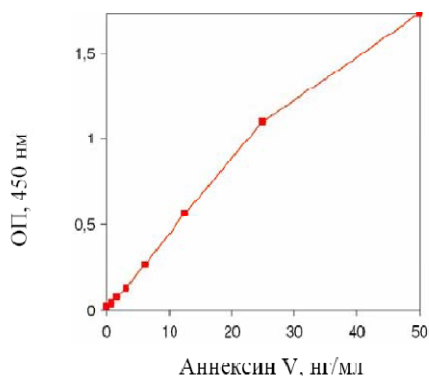
**Замечание:** если инкубация проводилась без встряхивания, значения могут быть ниже, чем в примере, приведённом ниже. Тем не менее, эти результаты также считаются достоверными.

## 11. РАСЧЕТ 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 Аннексина V на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации Аннексина V в образцах из стандартной кривой. Для этого найдите значение на оси ординат (Y) соответствующее среднему значению полученной для каждого образца ОП и проведите горизонтальную линию до пересечения со стандартной кривой. Затем из точки пересечения проведите вертикальную линию до пересечения с осью абсцисс (X). Значение на оси X в точке пересечения и будет соответствовать концентрации Аннексина V в соответствующей пробе.
- Для образцов, разбавленных согласно инструкции, умножьте результат на 2, т.к. они разводились в 2 раза во время анализа.
- Расчёт образцов с оптической плотностью выше 2.0 может быть некорректен – результаты будут занижаться. Для подобных образцов необходимо выполнить повторный анализ, разведя предварительно образец в соотношении 1:4 – 1:8 Разбавителем образцов для получения результата, отражающего точно концентрацию Аннексина V.
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией Аннексина V. Если значения контроля не укладываются в ожидаемый диапазон, результаты анализа могут быть недостоверны.
- Пример стандартной кривой показан на Рисунке ниже. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

**Рисунок.** Пример стандартной кривой для Аннексина V. Аннексин V был разбавлен в серии двукратных последовательных шагов титрования Разбавителем образцов. Здесь представлены средние значения из трех параллельных титрований.

Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.



**Таблица** Типичные результаты, полученные с использованием данного набора.

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	Аннексин V, нг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	50	1.833 1.626	1.73	6.0
2	25	1.091 1.108	1.1	0.8
3	12.5	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	0	0.025 0.024	0.024	2.9

## 12. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Так как условия могут меняться от анализа к анализу, стандартная кривая должна быть включена в каждую серию анализа.
- Бактериальное или грибковое загрязнение образцов или реактивов может привести к недостоверным результатам.
- Используйте одноразовые наконечники.
- Стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта.
- Неполная промывка негативно влияет на точность результатов. Полностью удаляйте Промывочный буфер из ячеек между циклами промывки. Не позволяйте ячейкам высыхать между шагами анализа.
- Использование радиоиммунотерапии значительно увеличило число пациентов с человеческими антимышиными IgG (НАМА). НАМА могут интерферировать в анализе, использующем мышиные моноклональные антитела, приводя к ложно положительным и ложно отрицательным результатам. Образцы сыворотки, содержащие антитела к мышиным иммуноглобулинам, могут быть проанализированы в случае, когда мышиные иммуноглобулины (сыворотка, асцитная жидкость или моноклональные антитела другой специфичности) добавляются к Разбавителю образцов.

## 13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 13.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация Аннексина V, измеренная как среднее плюс 3 стандартных отклонения 6-кратно измеренного образца 0 пг/мл (разводящий раствор) и составляет 0,33 нг/мл.

### 13.2 Воспроизводимость

#### 13.2.1 Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась и коэффициент вариации составил <10 %.

#### 13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определялась в одной лаборатории и коэффициент вариации составил 11%.

### 13.3 Извлечение

Извлечение составило в среднем 85%.

### 13.4. Линейность

Линейность при разведении была проанализирована и извлечение составило в среднем 89%.

### 13.5 Стабильность образцов

#### 13.5.1 Стабильность при замораживании-размораживании

Аликвоты содержащих Аннексин V сывороток и супернатантов культур клеток (обогащенных и не обогащенных) хранились при температуре -20°C и размораживались до 5 раз, после чего определялись уровни Аннексина V. Наблюдались некоторые потери Аннексина V после циклов повторного замораживания-размораживания. Следовательно, необходимо избегать повторных циклов замораживания-оттаивания.

#### 13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты содержащих Аннексин V сывороток и супернатантов культур клеток (обогащенных и не обогащенных) хранились при температуре -20°C, 2-8°C, комнатной температуре (RT) и при 37°C в течение 24 часов, после чего определялись уровни Аннексина V. Значительных потерь иммунореактивности Аннексина V при вышеперечисленных условиях хранения не наблюдалось.

### 13.6 Специфичность

Влияние циркулирующих факторов иммунной системы было оценено путем добавления к образцам с известной концентрацией Аннексина V физиологически значимых количеств исследуемых факторов. Перекрестная реактивность не была выявлена ни для одного исследованного вещества, в том числе и для Аннексина VIII (V $\alpha$  beta).

## 15. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

### 15.1 Промывочный буфер (1 х)

Добавить **Концентрат Промывочного буфера** 20x (50 мл) в 950 мл дистиллированной воды.

Количество стрипов	Концентрат Рабочего буфера, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

### 15.2 Рабочий буфер (1 х)

Количество стрипов	Концентрат Рабочего буфера, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

### 15.3 Конъюгат биотиновый (1 х)

Приготовить разведение 1:100 согласно таблице:

Количество стрипов	Концентрат Биотинового конъюгата, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

### 15.4 Конъюгат стрептавидиновый (1 х)

Количество стрипов	Концентрат стрептавидинового конъюгата, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,03	5,97
1-12	0,06	11,94

### 15.5 Стандарт

Растворите лиофилизированный стандарт **Рабочим буфером** (точный объем стандартного раствора, который должен получиться в результате растворения, указан на этикетке флакона).

## 16. ПРОТОКОЛ ТЕСТА (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

1. Промыть ячейки планшета дважды **Промывочным буфером**
2. Добавьте по 100 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для Стандартов (в дублях).
3. Приготовьте стандартные разведения добавлением 100 мкл разбавленного Стандарта Аннексина V в ячейки A1 и A2, создайте разведения стандарта Аннексина V в диапазоне от 50 до 0.8 нг/мл переносом по 100 мкл из ячейки в ячейку. Удалите и выбросите 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).  
Альтернативное разведение стандарта в пробирках: пипетировать 100 мкл этих разведений стандарта в лунки.
4. Внесите по 100 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки «Бланк».
5. Внесите по 50 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для образцов.
6. Внесите по 50 мкл каждого **образца** в соответствующие ячейки.
7. Приготовьте **биотиновый конъюгат**.
8. Добавьте по 50 мкл разбавленного **биотинового конъюгата**, готового для использования, во все ячейки, включая Бланк.
9. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18 – 25°C).
10. Приготовьте **стрептавидиновый конъюгат**.
11. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 4 раза **Промывочным буфером**.
12. Внесите по 100 мкл **стрептавидинового конъюгата** во все ячейки.
13. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18 – 25°C).
14. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 4 раза **Промывочным буфером**.
15. Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора TMB** во все ячейки, включая Бланк.
16. Инкубируйте при комнатной температуре примерно от 10 до 20 минут.
17. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки, включая Бланк.
18. Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм против «Бланка», желательнее использовать длину волны сравнения 610-650 нм.

**Замечание:** Для образцов, разбавленных согласно инструкции, умножьте результат, полученный по стандартной кривой на фактор разведения 2.



**ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

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