

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ГАЛЕКТИНА-3

BMS279/4 / BMS279/4TEN, Human Galectin-3 Platinum ELISA

Каталог. №: **BMS279/4 /BMS279/4TEN**
Количество: **96, 10x96**
Производитель: **Bender MedSystems
GmbH, (Австрия)**

Методика от **17-11-2014**
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 ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данный набор предназначен для количественного определения человеческого галектина-3.

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

2. ВВЕДЕНИЕ (См. оригинал инструкции).

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Антитела, специфичные к галектину-3, сорбированы в ячейках планшета.

Галектин-3 в образце или стандарте связывается с антителами в ячейках планшета.

После инкубации не связавшиеся биологические компоненты удаляются во время промывки, и добавляется, и в ячейки добавляются антитела анти-Галектина-3, конъюгированные с HRP, которые связываются с Галектином-3, захваченным первым антителом.

После инкубации антитела анти-Галектина-3, конъюгированные с HRP, удаляются во время стадии промывки и раствор субстрата, реактивный с HRP, добавляется в лунки.

Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации галектина-3, присутствующего в образцах. Концентрация галектина-3 в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта.

4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты в наборе Человеческий Галектин-3 ELISA BMS279/4 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к галектину-3 человека	1 планшет
Конъюгат моноклональных антител анти-галектин-3 и HRP, 120 мкл	1 флакон

Стандарт галектина-3, лиофилизированный, 60 нг/мл после разведения	2 флакона
Разбавитель образцов, 12 мл	1 флакон
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл	1 флакон
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	1 бутылка
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	1 флакон
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл	1 флакон
Плѐнки для заклеивания стрипов	4

4.2 Реагенты в наборе Человеческий Галектин-3 ELISA BMS279/4TEN (10x96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому галектину-3	10 планшетов
Конъюгат моноклональных антител анти-галектин-3 и HRP, 120 мкл	10 флаконов
Стандарт галектина-3, лиофилизированный, 60 нг/мл после разведения	10 флаконов
Разбавитель образцов, 12 мл	7 флаконов
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл	2 флакона
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	3 бутылки
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	10 флаконов
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 100 мл	1 флаконов
Плѐнки для заклеивания стрипов	20

5. ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ – НАБОР ИФА

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

Только при соответствующем хранении и, если набор используется для нескольких постановок, исключении контаминации во время предыдущего использования, гарантируется качественная работа реагентов.

6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Супернатанты культуры клеток, сыворотка и плазма (EDTA, цитратная, гепариновая) были протестированы с помощью этого анализа. Отделить сыворотку или плазму от сгустка или клеток, как можно скорее после свертывания и разделения. Образцы, содержащие видимый осадок, необходимо очистить перед использованием в анализе. Не используйте сильно гемолизированные или липемические образцы.

Образцы должны быть аликвотированы и должны храниться в замороженном виде при -20 °С, чтобы избежать потери биологически активного человеческого Галектина-3. Если образцы будут тестироваться в течение 24 часов, они могут храниться при температуре от 2 до 8 °С (стабильность образца указана в разделе 13.5). Добавление ингибиторов протеазы может обеспечить более высокую стабильность образцов.

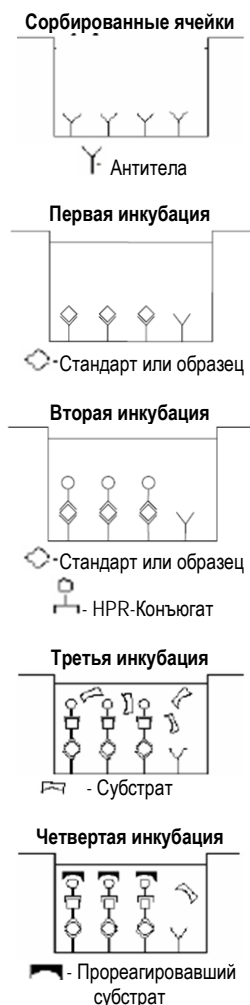
Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания. Перед анализом замороженные образцы должны быть доведены до комнатной температуры медленно и осторожно перемешаны.

7. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Калиброванные пипетки на 5 мл и 10 мл
- Калиброванные пипетки одноканального 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 ≥ 620 нм
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов (линейная регрессия)

8. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

- 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.
- Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.
- Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.



- Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
- Избегайте облучения реагентов сильным источником света во время хранения и инкубации.
- Не пипетируйте ртом.
- Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ.
- Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми.
- При ручном методе анализа пользуйтесь латексными перчатками для защиты рук.
- Избегайте контакта субстратного раствора с металлами и окислителями.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей.
- Чтобы избежать микробного загрязнения или загрязнения реактивами и получения в результате недостоверных результатов, пользуйтесь одноразовыми наконечниками.
- Используйте чистую, специально выделенную посуду для конъюгатов и субстратного раствора.
- Загрязнение кислотой инактивирует конъюгат.
- Для приготовления реактивов используйте дистиллированную или деионизированную воду.
- Субстратный раствор должен иметь комнатную температуру перед использованием
- Обеззараживайте после работы образцы, так как они могут быть инфицированы, предпочтительно автоклавированием не менее 1 часа при 121.5 °С
- 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 (1х)

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:

Кол-во стрипов	Концентрат Рабочего буфера (20х) (мл)	Дистиллированная вода (мл)
1-6	2.5	47.5
1-12	5.0	95.0

9.3 Антитело, конъюгированное с HPR

Заметьте, что HPR-конъюгированное антитело должно быть использовано в течение 30 минут после разведения.

Приготовьте разбавление 1:100 концентрированного HPR-Конъюгата буфером для анализа (1х) в чистой пластиковой пробирке по мере необходимости в соответствии со следующей таблицей:

Кол-во стрипов	HRP-Конъюгат (мл)	Рабочий буфер (1х) (мл)
1-6	0.06	5.94
1-12	0.12	11.88

9.4 Стандарт человеческого Галектина-3

Растворите Стандарт Галектина-3 в дистиллированной воде. Необходимый объем для растворения указан на этикетке флакона,

содержащего стандарт. Оставить на 10-30 минут. Осторожно перемешивайте до полного растворения. Конечная концентрация полученного раствора составит 60 нг/мл.

Разведения стандарта могут производиться непосредственно на планшете (см. пункт 10с) или альтернативно в пробирках (см. Пункт 9.4.1).

9.4.1 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:

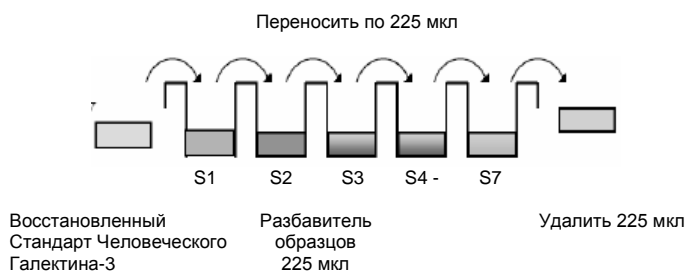
Пипетировать 225 мкл Разбавителя Образцов в каждую пробирку.

Пипетировать 225 мкл восстановленного стандарта (концентрация стандарта = 60 нг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1 = 30 нг/мл).

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

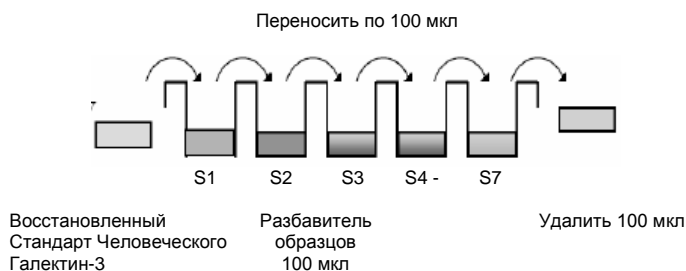
Повторить серийные разведения еще 5 раз, таким образом формируя точки стандартной кривой (См. рисунок ниже).

Разбавитель образцов служит в качестве бланка.



10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

- Определить количество микролуночных стрипов, необходимых для проверки требуемого количества образцов плюс соответствующее количество лунок, необходимых для бланков и стандартов. Каждый образец, стандарт, бланк и дополнительные контрольные образцы должны быть проанализированы в двух экземплярах. Удалите лишние микрострипы из держателя и храните их в пакете из фольги с осушителем при 2-8 °С плотно закрытыми.
- Промойте ячейки 2 раза 400 мкл **Промывочного Буфера** на лунку, полностью удаляя жидкость между промывками. Оставить 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 высыхать!**
- 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 давлением по 100 мкл разбавленного **Стандарта** (раздел «Приготовление реагентов» 9.4) 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 Галектин-3** в диапазоне от 30 до 0.47 нг/мл. Удалите и выбросите 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).



При **внешнем разведении стандарта** пипетировать 100 мкл этих разведений стандартов (S1-S7) в лунки для стандартов согласно таблице 1.

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

	1	2	3	4
A	Ст #1 (30.00 нг/мл)	Ст #1 (30.00 нг/мл)	O 1	O 1
B	Ст #2 (15.00 нг/мл)	Ст #2 (15.00 нг/мл)	O 2	O 2
C	Ст #3 (7.50 нг/мл)	Ст #3 (7.50 нг/мл)	O 3	O 3
D	Ст #4 (3.75 нг/мл)	Ст #4 (3.75 нг/мл)	O 4	O 4
E	Ст #5 (1.88 нг/мл)	Ст #5 (1.88 нг/мл)	O 5	O 5
F	Ст #6 (0.94 нг/мл)	Ст #6 (0.94 нг/мл)	O 6	O 6
G	Ст #7 (0.47 нг/мл)	Ст #7 (0.47 нг/мл)	O 7	O 7
H	Бланк	Бланк	O 8	O 8

Ст – Стандарт, O – образец

- d. Внесите по 100 мкл **Растворителя Образцов** в дубликаты в ячейки «Бланк».
- e. Внесите по 50 мкл **Растворителя Образцов** в ячейки, предназначенные для образцов.
- f. Внесите по 50 мкл каждого **образца** в дублях в соответствующие ячейки.
- g. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25 °С), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин. **Встряхивание является абсолютно необходимым для оптимального выполнения теста.**
- h. Подготовьте **HRP-конъюгированное антитело** (см. раздел 9.3).
- i. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 4 раза как указано в шаге «b» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- j. Внесите по 100 мкл разбавленного **Стрептавидин-HRP** во все ячейки, включая бланк.
- k. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25 °С), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин. **Встряхивание является абсолютно необходимым для оптимального выполнения теста.**
- l. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек. **Промойте** ячейки 4 раза как указано в шаге «b» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- m. Внесите 100 мкл **раствора субстрата ТМБ** во все лунки.
- n. Инкубируйте при комнатной температуре в течение примерно 30 минут. Избегайте воздействия прямых солнечных лучей. **Развитие цвета на пластине должно контролироваться и реакция с субстратом останавливается (см. следующий пункт этого протокола), прежде чем положительные лунки больше не фиксируются должным образом.**
Определение идеального периода времени для развития окраски должно быть сделано индивидуально для каждого анализа.

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.
- o. 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 °С в темноте.
- p. Определите оптическую плотность всех ячеек при 450 нм, желательно 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 Галектин-3.

Замечание: Встряхивание является абсолютно необходимым для оптимального выполнения теста.

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 Галектина-3 на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации Галектина-3 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 Галектина-3 в соответствующей пробе.
- **В ходе анализа, согласно данной инструкции, образцы были разведены 1:2, следовательно концентрации, полученные из калибровочной кривой, должны быть умножены на коэффициент разведения (x2).**
- **Замечание: расчёт образцов с оптической плотностью выше Стандарта 1 может быть некорректен – результаты будут занижаться. Такие образцы необходимо дополнительно развести буфером для разведения и протестировать еще раз, для получения результата, отражающего точную концентрацию Галектина-3.**
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией Галектина-3. 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 Галектина-3. Галектин-3 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.

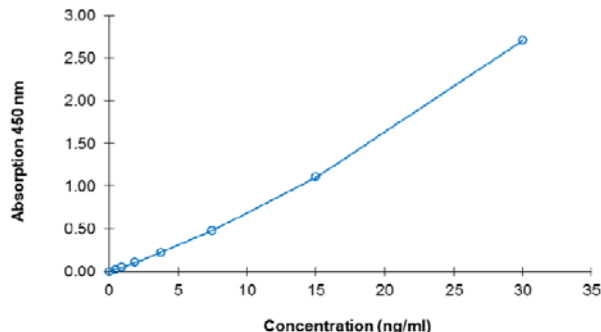


Таблица: Типичные результаты, полученные с использованием данного набора.

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	Галектин-3, нг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	30.00	2.751 2.748	2.749	0.1
2	15.00	1.151 1.146	1.148	0.3
3	7.50	0.520 0.520	0.520	0.1
4	3.75	0.273 0.268	0.270	1.4
5	1.88	0.150 0.149	0.149	0.6
6	0.94	0.094 0.089	0.092	3.6
7	0.47	0.067 0.064	0.065	4.0
Бланк	0.0	0.041 0.043	0.042	2.9

ОП, полученные для стандартов, могут меняться в зависимости от условий выполнения анализа (например, температурный режим).

Кроме того, на протяжении срока годности набора энзиматическая активность, и, следовательно, интенсивность окрашивания, могут изменяться. При этом результаты тестирования остаются достоверными.



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

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. Стеклопосуда 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.

13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация Галектина-3, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше, чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 0.29 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 по 6 определений каждого из 8 образцов сывороток, содержащих различные концентрации Галектина-3. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. Коэффициент вариации составил в среднем 7.5 %.

13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями в одной лаборатории определялась в 3-х независимых сериях анализа. В каждой серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации Галектина-3. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. Коэффициент вариации составил в среднем 5.4 %.

13.3 Извлечение

Извлечение оценивали, тестируя образцы пулированной человеческой сыворотки, плазмы и супернатанта культуры клеток, обогащенные 3 разными уровнями Галектина-3 человека по 6 реплик каждый. Количество эндогенного Галектина-3 в не обогащенной сыворотке вычитали из значений, полученных для обогащенного образца. Извлечение составило в среднем 100%, в диапазоне от 80 % до 120 %.

13.4. Линейность

Образцы человеческой сыворотки, плазмы и супернатанта культуры клеток с различными уровнями Галектина-3, были проанализированы в сериях двукратных разведений, по 4 повторам каждого. Показано, что извлечение в среднем составило 100 %, в диапазоне от 80% до 120 %.

13.5 Стабильность образцов

13.5.1 Стабильность при замораживании-размораживании

Аликвоты образцов сыворотки, плазмы и супернатанта культуры клеток хранили при температуре -20°C , и оттаивали до 3 раз, после чего определяли уровни Галектина-3. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности Галектина-3 после 3 повторных циклов замораживания/оттаивания.

13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты образцов сыворотки, плазмы и супернатанта культуры клеток хранились при температуре -20°C , $2-8^{\circ}\text{C}$, комнатной температуре (RT) и при 37°C в течение 24 часов, после чего определялись уровни Галектина-3. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности Галектина-3 при хранении при всех перечисленных условиях.

13.6 Специфичность

Анализ обнаруживает как природный, так и рекомбинантный Галектин-3.

Влияние циркулирующих факторов иммунной системы было оценено путем добавления к образцам с известной концентрацией Галектина-3 физиологически значимых количеств исследуемых факторов. Перекрестная реактивность не была выявлена ни с одним из исследованных факторов.

15. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

(См. оригинал инструкции).

16. ПРОТОКОЛ ТЕСТА (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

(См. оригинал инструкции).