

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕНИНА В СЫВОРОТКЕ, ПЛАЗМЕ, ГОМОГЕНАТАХ ТКАНЕЙ, СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР КЛЕТОК И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА

SEA889Hu, Renin ELISA

Каталог. № : SEA889Hu
Количество : 96
Производитель: Cloud-Clone Corp.,
(США)

Методика от 07-2013
Версия 11



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 использования в in-Vitro диагностике и исследовательских целях. Не для использования в диагностических и терапевтических целях

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для количественного определения ренина в образцах сыворотки, плазмы, гомогенатах тканей, супернатантах культур клеток и других биологических жидкостях человека.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Реагенты	Количество
Готовый к использованию, 96-луночный планшет с предварительным покрытием	1
Стандарт	2
Реагент для детекции А	1 x 120 мкл
Реагент для детекции В	1 x 120 мкл
Субстрат ТМБ	1 x 9 мл
Промывочный Буфер (30x Концентрат)	1 x 20 мл
Пленка для заклеивания планшетов	4
Растворитель для стандартов	1 x 20 мл
Рабочий Растворитель А	1 x 12 мл
Рабочий Растворитель В	1 x 12 мл
Стоп Раствор	1 x 6 мл
Инструкция	1

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер с фильтром на 450 ± 10 нм
2. Калиброванные одноканальные и многоканальные пипетки переменного объема и одноразовые сменные наконечники к ним
3. Пробирки типа «эппендорф» для разведения образцов
4. Дистиллированная или деионизированная вода
5. Фильтровальная бумага для высушивания микропланшета
6. Емкость для приготовления буфера для промывок

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ НАБОРОВ

1. Невскрытый набор: Все реагенты должны храниться в условиях, указанных на этикетках флаконов. **Стандарт, детектирующий реагент А, детектирующий реагент В и микропланшет** должны храниться при температуре -20°C после получения набора, остальные компоненты хранить при 4°C .
2. Вскрытый набор: Неиспользованные стрипы должны храниться в плотно закрытом пакете с осушителем для предотвращения контакта с влажным воздухом. Набор может быть использован в течение всего срока годности (6 месяцев с момента производства). Вскрытый набор стабилен до истечения срока годности, если храниться так, как описано в данной инструкции.

Примечание: Строго рекомендуется использовать оставшиеся реагенты в течение 1 месяца, до окончания срока годности.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы сыворотки - Используйте пробирки для отделения сыворотки и дайте образцам крови свернуться в течение двух часов при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C , а затем центрифугируйте 20 минут при приблизительно 1000 г. Для анализа

используйте свежеприготовленные образцы сыворотки. Для хранения алиquotируйте образцы сыворотки немедленно после получения и храните алиquotы замороженными при -20°C или ниже, при -80°C . Не допускайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

Образцы плазмы - Соберите плазму, используя ЭДТА или гепарин в качестве антикоагулянта. Центрифугируйте образцы 15 минут при 1000 г при $2 - 8^\circ\text{C}$ в течение 30 минут после сбора. Отберите плазму и анализируйте немедленно, или алиquotируйте образцы и храните алиquotы замороженными при -20°C или ниже, при -80°C . Не допускайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

Гомогенаты тканей - подготовка гомогенатов тканей будет варьироваться в зависимости от типа ткани. Для данного анализа ткани были промыты в холодном растворе PBS (0.01 моль/л, pH 7.0-7.2) для удаления лишней крови и взвешивания перед гомогенизацией. Размельчить ткани до маленьких кусочков и гомогенизировать их в 5-10 мл PBS со стеклянным гомогенизатором на льду. Полученная суспензия была разрушена ультразвуком или подверглась двум циклам замораживания-оттаивания для дальнейшего измельчения клеточных мембран. После этого гомогенаты были центрифугированы в течение 5 минут при 5000 x g. Удалить супернатант и исследовать немедленно или алиquotировать и хранить при $\leq -20^\circ\text{C}$.

Клеточные лизаты - Клетки должны быть лизированы перед анализом в соответствии со следующими пунктами.

1. Прилипшие клетки должны быть отделены с помощью трипсина и затем собраны центрифугированием (подвижные клетки могут быть собраны путем центрифугирования напрямую).
2. Вымыть клеток трижды в холодном PBS.
3. Ресуспендировать клетки в PBS (1x) и обработать ультразвуком 4 раза (или заморозить клетки при $\leq -20^\circ\text{C}$. Разморозить клетки при осторожном перемешивании. Повторить цикл замораживания/оттаивания 3 раза).
4. Центрифугировать при 1500g в течение 10 минут при $2-8^\circ\text{C}$. Удалить продукты распада клеток.

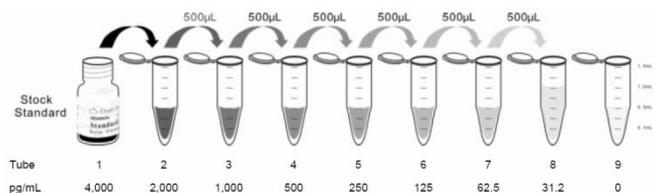
Супернатанты культур клеток и другие биологические жидкости - Центрифугируйте образцы 20 минут при 1000 g. Отберите супернатант и анализируйте немедленно, или алиquotируйте образцы и храните алиquotы замороженными при -20°C или ниже, при -80°C . Не допускайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

Замечания:

1. Образцы, которые будут протестированы в течение 5 дней, могут храниться при 4°C , для более длительного хранения образцы необходимо замораживать и хранить при -20°C (до 1 месяца) или -80°C (до 2 месяцев), чтобы избежать потери биоактивности и контаминации.
2. Перед выполнением анализа образцы должны медленно достичь комнатной температуры.
3. Гемолиз влияет на результаты, образцы с гемолизом не могут быть использованы для тестирования данным методом.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Перед использованием все компоненты набора должны достичь комнатной температуры ($18-25^\circ\text{C}$).
2. **Стандарт** - Растворите стандарт в 1.0 мл буфера для разведения стандарта, оставьте на 10 минут при комнатной температуре и аккуратно перемешайте (без образования пены). Концентрация сток-раствора стандарта составляет 4,000 пг/мл. Вначале разведите сток-раствор стандарта до концентрации 2,000 пг/мл, а затем выполните серию разведений, используя разведение 2,000 пг/мл в качестве самого высокого стандарта. Используйте разведение 2,000 пг/мл для получения серии разведений (см. рисунок ниже). Тщательно перемешивайте содержимое каждой пробирки перед выполнением следующего разведения. Приготовьте 7 разведений стандарта, с концентрациями 2,000 пг/мл, 1,000 пг/мл, 500 пг/мл, 250 пг/мл, 125 пг/мл, 62.5 пг/мл, в последней пробирке должен быть буфер для разведения стандарта, в качестве стандарта 0 пг/мл.



3. **Детектирующий реагент А и Детектирующий реагент В** - Быстро покрутите или центрифугируйте сток-раствор детектирующего реагента А и детектирующего реагента В перед использованием. Разведите до рабочей концентрации

готовым буфером для разведения **A** или **B**, соответственно (1:100).

4. **Буфер для промывок** - Разведите 20 мл концентрата буфера для промывок (30x) в 580 мл деионизированной или дистиллированной воды, для приготовления 600 мл готового буфера для промывок (1x).
5. **Раствор субстрата ТМВ** - Отберите необходимое количество раствора стерильным наконечником и не прикасайтесь оставшегося раствора тем же наконечником еще раз.

Замечание:

1. Не разрешается выполнение серийных разведений непосредственно в лунках микропланшета.
2. Приготовьте стандарт за 15 минут до начала тестирования. Не растворяйте реагенты при 37 °С.
3. При растворении стандарта и разведении детектирующего реагента **A** и **B** строго соблюдайте данную инструкцию, не допускайте образования пены и тщательно аккуратно перемешивайте до тех пор, пока кристаллы полностью не растворятся. Для снижения неточности, вызванной пипетированием, используйте небольшие объемы и убедитесь, что пипетки точно прокалиброваны. Рекомендуется выполнять пипетирование объемов больше 10 мкл за один раз.
4. Растворенные стандарт, детектирующий реагент **A** и детектирующий реагент **B** могут быть использованы **только один раз**.
5. Если в концентрате (30x) буфера для промывок образовались кристаллы, нагрейте его до комнатной температуры и аккуратно тщательно перемешайте до полного растворения кристаллов.
6. Загрязненная вода или контейнер для подготовки образцов могут повлиять на результаты.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

1. Компания-производитель несет ответственность только за набор, но не за образцы, используемые во время процедуры анализа. Пользователь должен рассчитать приблизительное количество образцов, используемых для всего тестирования. Пожалуйста, приготовьте необходимое количество образцов предварительно.
2. Рассчитайте концентрацию перед анализом. Если значения не попадают в заданные пределы стандартной кривой, пользователь должен рассчитать оптимальную величину разведения образцов для анализов. Образец должен быть разведен с использованием 0.01 моль/л PBS (pH = 7.0-7.2).
3. Если образцы не указаны в инструкции, необходимо провести предварительный эксперимент для определения пригодности теста.
4. Экстракция тканей или клеток, приготовленная химическим лизисом, может давать неожиданные результаты из-за воздействия определенных химикатов.
5. Из-за возможного несоответствия антигена другого происхождения и антитела, используемого в данных наборах, некоторые протеины от других производителей могут не распознаваться нашими продуктами.
6. Образцы супернатанта клеточной культуры, на которые влияют жизнеспособность клеток, количество клеток или время тестирования, могут быть не обнаружены данным тестом.
7. Для теста рекомендуются свежие образцы, которые долго не хранились. Иначе, деградация протеинов и денатурализация могут привести к ложным результатам.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

1. Определите необходимое для текущей постановки количество лунок, с учетом приготовленных разведений стандарта, бланка и образцов. Приготовьте 7 лунок для стандартов, 1 лунку для бланка. Внесите по 100 мкл каждого разведения стандарта(см. раздел «Приготовление реагентов»), бланка, и образца в соответствующие лунки. Закройте микропланшет. Инкубируйте 2 часа при 37 °С.
2. Снимите крышку, удалите жидкость из лунок, не промывайте.
3. Внесите по 100 мкл рабочего раствора **детектирующего реагента А** в каждую лунку. Закройте микропланшет. Инкубируйте 1 час при 37 °С.
4. Аспирируйте раствор из лунок и внесите по 350 мкл готового буфера для промывок на каждую лунку, с помощью сжимаемой бутылки, многоканальной пипетки, ручного диспенсера или автоматического промывочного устройства, и оставьте не менее чем на 1~2 минуты. Удалите жидкость из всех лунок и тщательно осушите лунки, постучав перевернутым микропланшетом по фильтровальной бумаге. Повторите процедуру 3 раза. После последней промывки удалите из лунок всю жидкость полностью аспирацией или декантированием, переверните микропланшет и постучите им по чистой фильтровальной бумаге.

5. Внесите по 100 мкл рабочего раствора **детектирующего реагента В** во все лунки. Закройте микропланшет. Инкубируйте 30 минут при 37 °С.
6. Повторите процедуру аспирации/промывки 5 раз, как описано в шаге 4.
7. Внесите по 90 мкл **раствора субстрата** в каждую лунку. Закройте новой крышкой. Инкубируйте 15 - 25 минут при 37 °С (но не более 30 минут) в защищенном от света месте. При добавлении раствора субстрата цвет жидкости поменяется на голубой.
8. Внесите по 50 мкл **стоп-раствора** в каждую лунку. При этом цвет жидкости в лунках поменяется на желтый. Аккуратно перемешайте жидкость в лунках, постучав по краю микропланшета. Если изменение цвета не однородно, аккуратно постучите по краю микропланшета до полного перемешивания.
9. Удалите любые капли жидкости и отпечатки пальцев со дна микропланшета и убедитесь, что в лунках нет пузырей воздуха. Затем немедленно выполните измерения с помощью микропланшетного ридера при длине волны 450 нм.

Замечания:

1. **Подготовка к анализу:** Оставьте необходимое для текущей постановки количество стрипов, оставшиеся стрипы удалите из держателя. Не используемые стрипы необходимо хранить в тщательно закрытом пакете, при -20 °С до истечения срока годности набора.
2. **Внесение реагентов и образцов: Используйте только свежеприготовленные стандарты.** Вносите образцы аккуратно, и тщательно перемешивайте без образования пены. Не дотрагивайтесь до внутренней поверхности лунок. На каждом этапе процедуры общее время пипетирования реагентов или образцов в лунки микропланшета не должно превышать 10 минут. Это гарантирует единообразие на всех этапах пипетирования, и исключит какие-либо остановки. Тестирование всех стандартов и образцов в дублях необязательно, но рекомендуется. Не допускайте перекрестной контаминации, используйте новые одноразовые наконечники для внесения каждого стандарта, образца и реагента. Используйте отдельные резервуары для каждого реагента.
3. **Инкубация:** Для получения точных результатов очень важно тщательно закрывать лунки микропланшета во время инкубации. Не оставляйте лунки незакрытыми на длительный период между инкубациями. После внесения реагентов в лунки **НЕОСТАВЛЯЙТЕ ЛУНКИ ОТКРЫТЫМИ, НЕ ДОПУСКАЙТЕ ВЫСЫХАНИЯ** лунок на любом этапе процедуры анализа. Необходимо строго соблюдать время и температуру инкубации.
4. **Промывка:** Процедура промывки очень важна. Для получения достоверных результатов очень важно полностью удалять жидкость на каждом цикле промывки. После последней промывки удалите все остатки буфера для промывок аспирацией или декантированием, и удалите любые остатки жидкости и отпечатки пальцев с доньшка микропланшета. Неполная промывка приведет к низкой воспроизводимости и ложным завешенным результатам.
5. **Контроль времени реакции:** После внесения раствора субстрата **ТМВ** необходимо наблюдать за развитием окрашивания (например, один раз в 10 минут), если окрашивание слишком интенсивное, внесите **стоп-раствор** раньше, чтобы не допустить слишком сильной реакции, в результате чего разовьется слишком темное окрашивание и точное считывание абсорбции будет невозможно.
6. Раствор субстрата **ТМВ** очень легко загрязняется. Защищайте раствор субстрата от света.
7. Влажность ниже 60 % может повлиять на результаты анализа, поэтому рекомендуется использовать увлажнитель.

ПРИНЦИП МЕТОДА

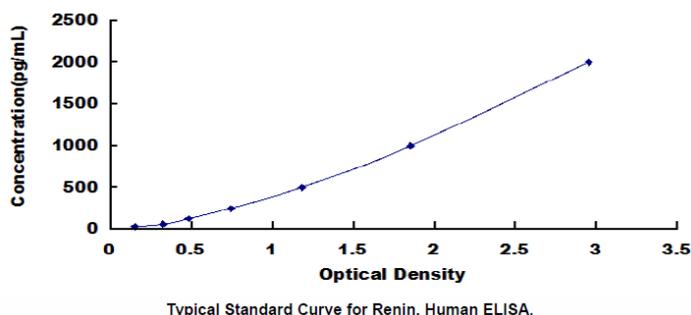
Микропланшет, поставляемый в данном наборе, покрыт специфическими антителами к ренину. Стандарты и образцы вносят в соответствующие лунки микропланшета, вместе с поликлональными антителами к ренину, конъюгированными с биотином. На следующем этапе в лунки вносят авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) и инкубируют в течение необходимого времени. Затем в лунки вносят раствор субстрата ТМВ. Изменение окрашивания у лунок, обусловленное связыванием антител, конъюгированных с биотином, и авидина, конъюгированного с ферментом, будет наблюдаться только в лунках, содержащих ренин. Энзиматическую реакцию останавливают добавлением серной кислоты, и интенсивность развешенного окрашивания измеряют с помощью микропланшетного спектрофотометра при длине волны 450 нм ± 10 нм. Концентрацию ренина в образцах определяют сравнением полученной оптической плотности (ОП) образцов с построенной калибровочной кривой.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитайте среднее значение для дублей каждого стандарта, контроля и образца, и вычитите из полученных значений среднее значение ОП нулевого стандарта. Постройте калибровочную кривую, с помощью соответствующего программного обеспечения, используя четырех параметрическую аппроксимацию (4-PL). Альтернативно, постройте калибровочную кривую, откладывая полученное среднее значение ОП каждого стандарта по оси X, против соответствующей концентрации каждого стандарта по оси Y, и проведя оптимальную кривую через полученные точки. Результаты могут быть линеаризованы при построении графика в логарифмических координатах (log концентрации ренина против log ОП), а оптимальная кривая может быть получена с помощью регрессионного анализа. Для обработки данных рекомендуется использовать соответствующее программное обеспечение. Такая процедура дает адекватную, хотя, возможно, и несколько менее точную аппроксимацию. Если образец был разведен, то концентрацию, полученную из калибровочной кривой, необходимо умножить на соответствующий коэффициент разведения.

ТИПИЧНЫЕ ДАННЫЕ

Для облегчения подсчета, мы откладываем значение ОП стандарта (ось X) напротив концентрации стандарта (ось Y); также концентрация является независимой вариативной, и значение ОП – зависимая вариативная. Хотя значения ОП на калибровочной кривой могут варьироваться в зависимости от условий проведения анализа (например, от оператора, техники пипетирования, техники промывки или температурных эффектов), для каждого теста рекомендуется построение калибровочной кривой. Типичная калибровочная кривая приведена ниже и только для контроля.



ДИАПАЗОН ИЗМЕРЯЕМЫХ ЗНАЧЕНИЙ

31.2 - 2,000 пг/мл. Концентрации стандартов, используемые для построения калибровочной кривой: 2,000 пг/мл, 1,000 пг/мл, 500 пг/мл, 250 пг/мл, 125 пг/мл, 62.5 пг/мл, 31.2 пг/мл.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Минимальная определяемая концентрация человеческого ренина обычно составляет менее 13.3 пг/мл.

Чувствительность данного метода, или нижний предел определения (LLD) была определена как наименьшая концентрация белка, достоверно отличная от нулевой. Она была рассчитана как среднее значение ОП, полученное при тестировании 20 повторов нулевого стандарта, плюс три стандартных отклонения.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Этот анализ имеет высокую чувствительность и превосходную специфичность для обнаружения ренина.

Не наблюдалось значительной перекрестной реактивности или интерференции между ренином и аналогами.

Примечание:

Ограниченные в навыках и знаниях, мы не можем завершить обнаружение перекрестной реактивности между ренином и всеми аналогами, следовательно, перекрестная реакция может все еще существовать.

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Матрицы, приведенные ниже, были обогащены определенным уровнем рекомбинантного человеческого ренина, и уровни воспроизводимости были подсчитаны сравнением измеренного значения с ожидаемым в образцах.

Матрикс	Диапазон воспроизводимости (%)	Среднее (%)
Сыворотка (n=5)	79-94	86
Человеческая ЭДТК плазма (n=5)	88-102	94
Человеческая гепаринизированная плазма (n=5)	81-93	88

ПРИМЕРЫ ЗНАЧЕНИЙ

Мы обнаружили пятьдесят образцов сыворотки и плазмы от здоровых добровольцев (истории болезни не были доступны для этих добровольцев) для ренина в этом анализе. Большинство образцов, измеренные в этом анализе, были ниже, чем самый низкий стандарт.

Примечание: данные предлагаются только для справки.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Линейность набора определялась тестированием образцов, обогащенных соответствующей концентрацией человеческого ренина, и их серийных разведений. Результаты демонстрируются в % отношении подсчитанных концентраций к ожидаемым значениям.

Образец	1:2 (%)	1:4 (%)	1:8 (%)	1:16 (%)
Человеческая сыворотка (n=5)	85-98	93-105	91-99	84-97
Человеческая плазма (n=5) ЭДТК	87-96	85-99	94-107	82-95
Человеческая гепаринизированная плазма (n=5)	94-104	91-102	82-95	96-107

ТОЧНОСТЬ

Внутрисерийная точность: 3 образца с низким, средним и высоким уровнем человеческого ренина были протестированы 20 раз на одной пластине, соответственно.

Междусерийная точность: 3 образца с низким, средним и высоким уровнем человеческого ренина были протестированы на 3 разных пластинах, 8 копий на каждой.

CV (%) = SD/среднее x 100

Внутрисерийный анализ: CV < 10 %

Междусерийный анализ: CV < 12%

СТАБИЛЬНОСТЬ

Стабильность набора определяется уровнем снижения активности. Уровень данного набора меньше 5 % до окончания срока годности при хранении в надлежащих условиях.

Чтобы свести к минимуму дополнительные влияния на производительность, оперативные процедуры и лабораторные условия, особенно комнатную температуру, влажность воздуха, температура в инкубаторе должно строго контролироваться. Также настоятельно советуем, чтобы весь анализ проводился тем же оператором от начала и до конца.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

- В связи с существующими ограничениями, обусловленными ситуацией и уровнем технологий, производитель не может полностью предоставить полную информацию о материалах, поставляемых в составе данного набора. Использование набора может быть связано с некоторыми рисками.
- Конечные результаты исследования напрямую зависят от пригодности продукта, квалификации персонала, выполняющего анализ, и условий тестирования. Убедитесь, что для тестирования имеется достаточное количество образцов.
- Данный метод разработан с учетом минимизации интерференции растворимых рецепторов, лигандов, связывающих белков и других факторов, присутствующих в биологических образцах. Хотя все известные факторы были протестированы с помощью данного метода, возможность интерференции полностью исключить нельзя.
- Не смешивайте и/или не заменяйте реагенты из разных наборов. Используйте только реагенты и материалы, поставляемые производителем в наборе.
- Защищайте все реагенты от воздействия прямого яркого света во время хранения и инкубаций. Для предотвращения испарения или контаминации реагентов все крышки флаконов должны быть тщательно закрыты.
- При первом вскрытии упаковки лунки микропланшета могут быть мутные. Это никак не влияет на результаты анализа. Не доставляйте микропланшет из пакета до начала тестирования.
- При тестировании данным методом для измерения ОП может быть использован микропланшетный спектрофотометр с полосой пропускания 10 нм или менее, и диапазоном считывания 0-3 ед. ОП или более при длине волны 450 нм.
- Срок годности набора: 6 месяцев с момента производства.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Стоп-раствор, поставляемый в данном наборе, является раствором кислоты. При тестировании данным методом используйте соответствующую защиту для глаз, рук, лица и необходимую защитную одежду.

РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Проблема	Возможный источник	Корректирующие действия
Плохая Стандартная кривая	Неправильная подготовка Стандартной кривой	Обеспечить точную работу разбавления образца
	Неполная промывка и аспирация	Адекватные промывка и аспирация
	Неточное пипетирование	Проверить и провести калибровку пипетки
Слабая точность	Незаконченная промывка лунок	Обеспечить достаточную промывку
	Недостаточное перемешивание и аспирация реагентов	Адекватные аспирация и смешивание реагентов
	Повторное использование пипеток, контейнеров и герметики	Заменить и использовать новые наконечники, контейнеры и герметики
	Неточное пипетирование	Проверить и калибровать пипетки
Низкие значения O.D.	Недостаточные объемы реагента, добавленные в лунки	Провести калибровку пипеток и добавить адекватное количество реагентов
	Неправильное время инкубации	Обеспечить достаточное время инкубации
	Неверная температура инкубации	Реагенты привести к комнатной температуре
	Не работает конъюгат или субстрат	Смешайте конъюгат и субстрат, цвет должен развиваться немедленно
	Не добавлен Стоп раствор Результат считан поздно	Следуйте протоколу анализа Считайте в сроки, рекомендованные в руководстве
Значения образцов	Неправильное хранение образца	Хранить образцы должным образом и использовать свежий образец
	Неверные забор и подготовка образцов	Выбрать правильный метод забора образцов и их подготовки
	Недостаточное количество аналита в образцах	Используйте новый образец и повторите анализ

**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