

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА (PAI)

TC12075, PAI-1 Antigen ELISA

Каталог. № : TC12075

Методика от 03-2012

Количество : 96

Производитель: Technoclone,
(Австрия)



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

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор PAI-1 Antigen ELISA Kit специально разработан для определения уровней PAI-1 антигена у пациентов с тромботическими нарушениями (тромбоз глубоких вен, инфаркт миокарда, ишемический инсульт), при злокачественных образованиях и сепсисе.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых моноклональными антителами к PAI-1; осушитель вложен в запечатанный алюминиевый пакет.
- Буфер промывочный, концентрат (1 флакон, 80 мл) (PBS; pH 7.3); содержит детергент; 0,01% мертиолат.
- Буфер для инкубации (PBS; pH 7.3) (1 флакон, 90 мл) содержит стабилизированный белок; 0,05% проклин; краситель, готов к использованию.
- Лиофилизированные калибровочные образцы, пронумерованные; лиофилизированные, концентрации зависят от лота. Концентрация указана на этикетке флакона.
По 1 флакону каждого.
- Лиофилизированные контрольные плазмы низкого и высокого уровней; концентрации зависят от лота. Концентрация указана на этикетке флакона. По 1 флакону каждой.
- Конъюгат моноклональных антител анти-PAI-1-ПОХ (с пероксидазой); окрашен в голубой цвет. (1 флакон 0.3 мл).
- Раствор субстрата ТМБ (тетраметилбензидина). Готов к использованию. (1 флакон, 12 мл).
- Стоп-раствор (0.45 моль/л серная кислота). Готов к использованию. (1 флакон, 12 мл).
- Адгезивная пленка для заклеивания стрипов. 2 шт

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ (не поставляемые)

- Дистиллированная вода.
- Пробирки для разведения стандартов и образцов.
- Мерный цилиндр (1л).
- Микропипетки переменного объема (10, 100 и 1000 мкл)
- Переменные пипетки (1000 мкл)
- Многоканальные пипетки (100-200 мкл); наконечники к ним.
- Устройство для автоматического промывания микропланшет (альтернативно, можно использовать ручные промывки, с помощью многоканальных пипеток или помпы).
- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм и желательной длиной волны сравнения - 620 нм.
- Инкубатор на 37° С.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Со всеми образцами крови или плазмы человека и реагентами следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом. Эти материалы должны обрабатываться и утилизироваться с соблюдением соответствующих мер предосторожности и со строгим соблюдением мер безопасности, принятых в лаборатории.
- Компоненты набора (калибраторы и контроли), содержащие материалы человеческого происхождения, были протестированы на отсутствие антител HBs Ag, HIV 1/2 Ab и HCV-Ab (см. указания на этикетке флакона и/или набора).
- Стоп-раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу или в глаза, следует тщательно промыть водой и обратиться к врачу.

- Некоторые реагенты содержат консерванты (мертиолат). Избегайте контакта с кожей и слизистой.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Срок годности, указанный на этикетках флаконов, относится к хранению не вскрытых реагентов при + 2...8 °С. Стабильность компонентов после вскрытия, растворения и/или разведения можно узнать из таблицы, приведенной ниже.

Материал/реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Калибраторы, контрольные плазмы	После разведения	-20 °С	6 месяцев
Стрипы	После вскрытия пакета	2 ... 8 °С при хранении в пластиковом пакете с осушителем	Срок годности указан на наборе
Буфер промывочный, концентрат	После вскрытия	2 ... 8 °С	6 месяцев
Буфер промывочный	После разведения 1+11.5	2 ... 8 °С	3 недели
Буфер для инкубации	После вскрытия	2 ... 8 °С	2 месяца
Конъюгат	После вскрытия	2 ... 8 °С	6 месяцев
	Рабочий раствор	Комнатная температура	60 минут
Хромоген ТМБ	После вскрытия	2 ... 8 °С	Срок годности указан на наборе

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Материал образцов: Плазма.
Рекомендуется использовать коммерческие пробирки, содержащие стабилизирующий агент (СТАД). 90% PAI-1 антигена содержится в тромбоцитах, поэтому важно удостовериться, что во время сбора образцов не повреждены тромбоциты, что может привести к повышению их уровня в плазме. Для данного анализа подходят также цитратная и EDTA-плазма. Плазму следует центрифугировать 15 минут со скоростью не менее 2500 g (DIN 58905). Образцы плазмы могут храниться 3 часа при комнатной температуре; для более длительного хранения образцы необходимо заморозить немедленно после центрифугирования. Замороженные при -20°С образцы стабильны 6 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

Образцы сыворотки не должны использоваться, так как они показывают высокие уровни PAI-1, что связано с их содержанием в тромбоцитах. Супернатант клеточной культуры и экстракт опухолевых клеток, также можно использовать для анализа, однако необходимо подобрать оптимальные разведения и использовать соответствующий коэффициент разбавления для вычисления концентраций.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры.
- Приготовление буфера для промывок:** Разбавьте 1 часть (по объему) концентрата буфера для промывок 11.5 частями (по объему) дистиллированной воды (1+11.5). Хорошо перемешайте! (Разведенный концентрат буфера для промывок = промывочный буфер). В буфере могут образовываться кристаллы, которые растворяются при 37°С в течение 10 минут.
- Пометьте/пронумеруйте стрипы водостойким маркером, на тот случай, если стрипы случайно выпадут из рамки-держателя во время тестирования.
- Растворение калибровочных и контрольных образцов плазмы: калибраторы и контрольные плазмы растворяют в 500 мкл дистиллированной воды и перемешивают через 10 секунд после разведения в течение 15 минут на вортексе. Разведенные компоненты могут быть чуть мутноватыми.
- Приготовление рабочего раствора конъюгата (1+50): Разбавьте 1 часть конъюгата 50 частями (по объему) инкубационного буфера.

Для анализа в 8 лунках: разведите 20 мкл конъюгата в 1000 мкл инкубационного буфера

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Инкубация образцов (см. описание 1,2)	Внесите калибраторы, контрольные плазмы и образцы в лунки, добавьте инкубационный буфер, закройте тестируемые стрипы пленкой	25 мкл 75 мкл
	инкубируйте при температуре 37 °С	60 минут
Инкубация конъюгата (см. описание 1,2)	Вытряхните содержимое из лунок, внесите разведенный конъюгат , закройте тестируемые стрипы пленкой	100 мкл
	инкубируйте при температуре 37 °С	60 минут
Промывка** (см. описание 1,3,4)	буфер для промывок	3 x 200 мкл
Реакция с субстратом (см. описание 1,2)	Внесите раствор субстрата в лунки, закройте тестируемые стрипы пленкой	100 мкл
	инкубируйте при комнатной температуре (20-25°С)	10 минут
Остановка реакции (см. описание 1,2)	Внесите стоп-раствор в лунки	100 мкл
Измерение (см. описание 5)	Микропланшетный ИФА анализатор, 450 нм	Встряхивать 10 секунд, измерить не позже, чем через 10 минут после внесения стоп-раствора.

**При использовании автоматического вошера – промыть 6 раз.

1. Не используйте реагенты из разных лотов.
2. Точность и воспроизводимость в большой степени зависят:
 - От тщательного перемешивания всех компонентов перед разведением.
 - От постановки калибраторов, контролей и образцов в дублях.
 - Инкубация должна проводиться при указанной температуре
 - Строгого соблюдения порядка внесения реагентов и указанных временных интервалов:
 - Время инкубации образцов, реакции с конъюгатом и субстратом, указанное в методике, отсчитывается от внесения компонента в последнюю лунку. Время инкубации не может различаться более, чем на 10%.
 - В процессе инкубации образцов и реакции с конъюгатом время внесения разведенных калибраторов/ образцов/ контрольных образцов плазмы и/или раствора конъюгата не должно превышать 60 секунд на один стрип (8 лунок).
 - Во время реакции с субстратом и при остановке реакции, время, необходимое для внесения субстрата и/или стоп-раствора не должно превышать 10 секунд на стрип. Использование многоканальных пипеток или диспенсеров облегчает соблюдение временных правил.
3. После последней промывки жидкость из лунок должна быть тщательно удалена, микропланшет перевернут и положен на фильтровальную бумагу. Аккуратно постукивая, удалите последние оставшиеся в лунках капли.
4. При измерении разницы между ОП при двух длинах волн 450 и 620 нм или 450 и 690 нм, точность результатов возрастает.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Образцы значения, которых выше чем в калибровочном образце с наибольшей концентрацией, должны быть анализированы заново при более значительном разбавлении, эффект хука возникает выше 130 нг/мл

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Построение калибровочной кривой:

ось X – концентрация антигена PIA антиген -1 нг/мл,

ось Y – оптическая плотность,

Построение проводится в линейной системе координат, кривая строится от точки к точке, либо по уравнению линейной регрессии.

Пример калибровочной кривой – см. оригинал инструкции

Вычисление концентрации в образцах:

- Вычисляйте концентрацию, исходя из калибровочной кривой
- Если экстинкция в тестируемых образцах превышает ОП калибровочного образца с наибольшей концентрацией, разбавьте образец инкубационным буфером (1+1). Полученную концентрацию в тестируемом образце необходимо умножить на 2.

ДИАПАЗОН НОРМАЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ

Диапазон нормальных значений PAI-1 определен как 7-43 нг/мл (n=32 цитратной плазмы). Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон нормальных значений.

Уровень активного PAI-1 выше 100 нг/мл может указывать на снижение фибринолитической способности, и, таким образом, усилению склонности к тромбозам.

PAI-1 является острофазным белком, и его концентрация в плазме возрастает при возрастании интерлейкина -1, как при инфекциях, некоторых опухолях и в постоперационном периоде. Повышенные уровни также наблюдаются при инфаркте миокарда и коронарной болезни.

Этот анализ измеряет свободный, комплексный и латентный PAI-1 и не поддается влиянию других ингибиторов активатора плазминогена.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ (См. оригинал инструкции).

СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Используемые калибровочные образцы PAI, соответствуют международным стандартам ВОЗ.



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