

## НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ HNP1-3 ЛЮДИНИ (ПЕПТИДУ НЕЙТРОФІЛІВ 1-3)

### Human HNP1-3 (Neutrophil Peptide 1-3) Elisa Kit

Каталог. №: **MBS2503205**

К-сть тестів: **96/48/24**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

Перед використанням цього продукту необхідно уважно та повністю прочитати дану інструкцію.

Будь ласка, дивіться термін придатності, зазначений на етикетці збоку коробки.

Якщо у вас виникли проблеми, зверніться за допомогою до нашого Центру технічного обслуговування.

Будь ласка, надайте нам номер партії набору (на зовнішній стороні коробки), щоб ми змогли швидше вам допомогти.

#### ПРИЗНАЧЕННЯ

Цей ІФА набір використовується для кількісного *in vitro* визначення концентрації HNP1-3 людини в сироватці, плазмі та інших біологічних рідинах.

#### СПЕЦИФІКАЦІЯ

- Чутливість: 0.38 нг/мл (ng/mL).
- Діапазон виявлення: 0.63-40 нг/мл (ng/mL)
- Специфічність: Цей набір розпізнає HNP1-3 людини у зразках. Значної перехресної реакції чи інтерференції між HNP1-3 людини та аналогами не спостерігалось.
- Повторюваність: Коефіцієнт варіації становить < 10%.

#### ПРИНЦИП ТЕСТУ

Цей ІФА набір використовує принцип «Сендвіч»-ІФА. Мікропланшет ІФА, що входить до складу цього набору, був попередньо покритий антитілом, специфічним до HNP1-3 людини. Стандарти або зразки додають до лунки мікропланшета ІФА та з'єднують зі специфічним антитілом. Потім біотинільоване антитіло для виявлення, специфічне до HNP1-3 людини, і кон'югат авідин-пероксидази хрому (HRP) послідовно додають до кожної лунки мікропланшета та інкубують. Вільні компоненти вимиваються. У кожну лунку додають розчин субстрату. Лише ті лунки, які містять HNP1-3 людини, біотинільоване антитіло для виявлення та кон'югат авідин-HRP, матимуть синій колір. Ферментно-субстратна реакція припиняється після додавання стоп-розчину і колір стає жовтим. Оптичну щільність (ОЩ) вимірюють спектрофотометрично при довжині хвилі 450 нм (nm) ± 2 нм (nm). Значення ОЩ пропорційне концентрації HNP1-3 людини. Обчислити концентрацію HNP1-3 людини у зразках можна шляхом порівняння ОЩ зразків зі стандартною кривою.

#### КОМПОНЕНТИ НАБОРУ ТА ЇХ ЗБЕРІГАННЯ

Нерозкритий набір можна зберігати при 4 °C (°C) протягом 1 місяця. Якщо набір не використовується протягом 1 місяця, зберігайте предмети окремо відповідно до наступних умов після отримання набору.

Компонент	Специфікації	Зберігання
Мікропланшет ІФА (розбірний)	96 тестів: 8 лунок x 12 смужок 48 тестів: 8 лунок x 6 смужок 24 тести: 8 лунок x 3 смужки	-20°C (°C), 6 місяців
Референсний стандарт	96 тестів: 2 флакони 48 тестів: 1 флакон 24 тести: 1 флакон	
Концентроване біотинільоване антитіло для виявлення (100x)	96 тестів: 1 флакон, 120 мкл (µL) 48 тестів: 1 флакон, 60 мкл (µL) 24 тести: 1 флакон, 60 мкл (µL)	
Концентрований кон'югат HRP (100x)	96 тестів: 1 флакон, 120 мкл (µL) 48 тестів: 1 флакон, 60 мкл (µL) 24 тести: 1 флакон, 60 мкл (µL)	-20°C (°C)(захищати від світла), 6 місяців
Референсний стандарт і розчинник для зразка	1 флакон 20 мл (mL)	4°C (°C), 6 місяців
Розчинник для біотинільованого антитіла для виявлення	1 флакон 14 мл (mL)	

Розчинник для кон'югату HRP	1 флакон 14 мл (mL)	4°C (°C), 6 місяців
Концентрований буфер для промивання (25x)	1 флакон 30 мл (mL)	
Субстрат реагента	1 флакон 10 мл (mL)	4°C (°C) (захищати від світла)
Стоп-розчин	1 флакон 10 мл (mL)	4°C (°C)
Ущільнювач для планшетів	5 штук	
Опис продукту	1 копія	
Сертифікат аналізу	1 копія	

**Примітка:** Усі кришки флаконів з реагентами слід добре закрутити, щоб запобігти випаровуванню та мікробному забрудненню. Об'єм реагентів у часткових поставках трохи перевищує об'єм, зазначений на етикетці, використовуйте точне вимірювальне обладнання замість безпосереднього розливання у флакон(-и).

#### НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ В НАБОРІ

- Зчитувач мікропланшетів з фільтром довжини хвилі 450 нм (nm)
- Високоточна дозатор для перенесення, пробірки EP та одноразові наконечники для дозаторів
- Інкубатор здатний підтримувати 37 °C (°C)
- Деіонізована або дистильована вода
- Абсорбуючий папір
- Завантажувальний отвір для промивного буфера

#### ПРИМІТКА

- Будь ласка, одягайте лабораторні халати, засоби захисту для очей і захисні латексні рукавички. Проведіть експеримент, дотримуючись національних протоколів безпеки біологічних лабораторій, особливо під час дослідження зразків крові чи інших рідин організму.
- Щойно відкритий ІФА планшет може мати речовину, схожу на воду, що є нормальним явищем і не матиме жодного впливу на результати експерименту.
- Не використовуйте повторно відновлений стандартний, біотинільований робочий розчин антитіл для виявлення, концентрований робочий розчин кон'югату HRP. Невитрачене нерозведене концентроване біотинільоване антитіло для виявлення (100x) та інші вихідні розчини слід зберігати відповідно до умов зберігання, наведених у таблиці вище.
- Зчитувач мікропланшетів має бути встановлений із фільтром, який може виявляти довжину хвилі при 450±10 нм (nm). Оптична щільність повинна бути в межах 0-3.5. Дотримуйтесь інструкцій для зчитувача мікропланшетів для налаштування та попередньо нагрійте його протягом 15 хвилин перед вимірюванням ОЩ.
- Не змішуйте та не використовуйте компоненти з компонентами з інших партій.
- Змініюйте наконечники для дозаторів між додаванням стандартів, зразків та реагентів. Крім того, використовуйте окремі резервуари для кожного реагенту.

#### ЗАБІР ЗРАЗКА

**Сироватка.** Перед центрифугуванням протягом 15 хвилин при 1000xg при 4°C (°C) дайте зразкам згорнутися протягом 2 годин при кімнатній температурі або протягом ночі при 4°C (°C). Зберіть супернатант для проведення аналізу. Пробірки для забору крові мають бути одноразовими та неендотоксинними. Зразки з високим гемолізом або високим вмістом ліпідів не підходять для ІФА аналізу!

**Плазма.** Зберіть плазму, використовуючи EDTA або гепарин в якості антикоагулянту. Через 30 хвилин після забору, центрифугуйте зразки протягом 15 хвилин при 1000xg при температурі 4°C (°C). Зберіть супернатант, щоб провести аналіз. Зразки з високим гемолізом або високим вмістом ліпідів не підходять для ІФА аналізу!

**Клітинні лізати:** якщо клітини склеєні, то слід обережно їх промити помірною кількістю попередньо охолодженого PBS розчину і роз'єднати за допомогою трипсину. Зберіть клітини суспензію у центрифужну пробірку та центрифугуйте протягом 5 хвилин при 1000xg. Викиньте середовище та промийте клітини 3 рази попередньо охолодженим PBS розчином. Для кожної 1x10<sup>6</sup> клітин додайте 150-250 мкл (µL) попередньо охолодженого розчину PBS, щоб зберегти клітини в суспендованому стані. Повторіть процес заморожування-розморожування кілька разів або використовуйте процес заморожування-розморожування кілька разів або використовуйте ультразвуковий руйнівник клітин, доки клітини повністю не лізуються. Центрифугуйте протягом 10 хвилин при 1500xg при 4°C (°C). Видаліть фрагменти клітин, зберіть супернатант для проведення аналізу. Уникайте повторних циклів заморожування-розморожування.

ТІЛЬКИ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ. НЕ ВИКОРИСТОВУВАТИ В ДІАГНОСТИЧНИХ ПРОЦЕДУРАХ.

**Гомогенати тканин:** Рекомендується отримати докладні посилання з літератури перед аналізом різних типів тканин. Для загальної інформації гемолізована кров може вплинути на результати, тому тканини слід подрібнити на дрібні шматочки та промити в крижаному PBS розчині (0.01 M, pH=7.4), щоб ретельно видалити надлишок крові. Шматочки тканини слід зважити, а потім гомогенізувати в PBS розчині (вага тканини (г (g)): PBS (мл (mL)) об'єм = 1:9) за допомогою скляного гомогенізатора на льоду. Щоб далі розщепити клітини, ви можете обробити суспензію ультразвуковим руйнівником клітин або піддати її циклом заморожування-розморожування. Потім гомогенати центрифугують протягом 5 хв при 5000xg, щоб отримати супернатант.

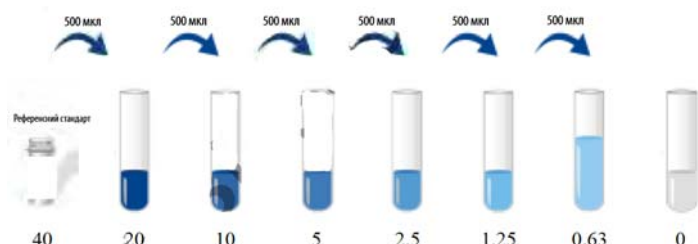
**Супернатант клітинної культури або інші біологічні рідини:** центрифугуйте зразки протягом 20 хвилин при 1000xg при 4°C (°C). Зберіть супернатант для проведення аналізу.

#### ПРИМІТКА ДЛЯ ЗРАЗКІВ

- Зразки слід аналізувати протягом 7 днів за умови зберігання при 4°C (°C), інакше зразки необхідно розділити та зберігати при -20°C (°C) ( $\leq 1$  місяць) або -80°C (°C) ( $\leq 3$  місяці). Уникайте повторних циклів заморожування-розморожування.
- Прогнозуйте концентрацію перед аналізом. Якщо концентрація зразка не входить у діапазон стандартної кривої, користувачі повинні визначити оптимальні розведення зразка для своїх конкретних експериментів.
- Якщо тип зразка не включено в посібник, пропонується попередній експеримент для перевірки валідності.
- Якщо буфер для лізису використовується для приготування тканинних гомогенатів або супернатанту культури клітин, існує ймовірність відхилення через введену хімічну речовину.
- Деякі рекомбінантні білки можуть бути не виявлені через невідповідність з нанесеним антитілом або з антитілом для виявлення.

#### ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

- Усі реагенти перед використанням необхідно довести до кімнатної температури (18~25°C (°C)). Якщо набір не буде використано в одному аналізі, будь ласка, вийміть лише необхідні смужки та реагенти для цього експерименту та зберігайте решту смужок та реагентів у необхідних умовах.
- Буфер для промивання:** Розведіть 30 мл (mL) Концентрованого буфера для промивання зі 720 мл (mL) деіонізованої або дистильованої води, щоб приготувати 750 мл (mL) буфера для промивання. **Примітка:** якщо у концентраті утворилися кристали, нагрійте його на водяній бані при 40°C (°C) та обережно перемішайте до повного розчинення кристалів.
- Робочий розчин стандарту:** Центрифугуйте стандарт при 10000xg протягом 1 хв. Додайте 1.0 мл (mL) референсного стандарту та розчинника для зразків, залишіть на 10 хвилин і обережно інвертуйте кілька разів. Після повного розчинення ретельно перемішайте дозатором. Це відновлення дає робочий розчин 40 нг/мл (ng/mL). Потім за потреби зробіть послідовні розведення. Рекомендований градієнт розведення такий: 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0 нг/мл (ng/mL).  
**Метод розведення:** Візьміть 7 пробірок EP, додайте 500 мкл (µL) референсного стандарту та розчинника для зразків у кожному пробірці. Внесіть 500 мкл (µL) робочого розчину 40 нг/мл (ng/mL) у першу пробірку та перемішайте, щоб отримати робочий розчин 20 нг/мл (ng/mL). Піпетуйте 500 мкл (µL) розчину з першої пробірки в останню згідно з цим кроком. Ілюстрація нижче наведена для довідки.  
**Примітка:** остання пробірка вважається бланк-пробіркою. Не додавайте до неї розчин із попередньої пробірки.



- Робочий розчин біотинільованого антитіла для виявлення:** Розрахуйте необхідну кількість перед експериментом (100 мкл/лунку (µL/well)). При підготовці слід приготувати трохи більше розрахованого. Перед використанням відцентрифугуйте базову пробірку, розведіть 100x концентроване біотинільоване антитіло а для виявлення до 1x

робочого розчину за допомогою розчинника для біотинільованого антитіла для виявлення.

- Робочий розчин концентрованого HRP кон'югату:** Розрахуйте необхідну кількість перед експериментом (100 мкл/лунку (µL/well)). При підготовці слід підготувати трохи більше розрахованого. Розведіть 100x концентрований кон'югат HRP до 1x робочого розчину за допомогою розчинника для концентрованого кон'югату HRP.

**ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ** (Короткий опис процедури аналізу наведено на 7-й сторінці)

- Додайте **робочий розчин стандарту** у перші дві колонки: кожен концентрацію розчину додайте в двох примірниках, до однієї лунки кожного, поруч (100 мкл (µL) для кожної лунки). Додайте зразки в інші лунки (100 мкл (µL) на кожен лунку). Накрийте планшет ущільнювальною плівкою, що входить до набору. Інкубуйте протягом 90 хвилин при 37 °C (°C). **Примітка:** розчини слід додавати на дно лунки мікропланшета ІФА, не торкайтеся внутрішньої стінки та не спричиняйте піноутворення.
- Видаліть рідину з кожної лунки, не мийте. негайно додайте 100 мкл (µL) **робочого розчину біотинільованого антитіла для виявлення** до кожної лунки. Накрийте ущільнювачем для планшетів. бережно перемішайте. Інкубуйте протягом 1 години при 37°C (°C).
- Аспіруйте або декантуйте розчин з кожної лунки, додайте 350 мкл (µL) **буфера для промивання** в кожен лунку. Замочіть на 1-2 хвилини, аспіруйте або декантуйте розчин із кожної лунки та витріть чистим абсорбуючим папером. Повторіть цей крок миття 3 рази. **Примітка:** на цьому етапі та інших етапах промивання можна використовувати пристрій для промивання мікропланшетів.
- Додайте 100 мкл (µL) **робочого розчину HRP кон'югату** до кожної лунки. Накрийте планшет ущільнювальною плівкою. Інкубуйте 30 хв при 37°C (°C).
- Аспіруйте або декантуйте розчин із кожної лунки, повторіть процес промивання п'ять разів, як це було зроблено на кроці 3.
- Додайте 90 мкл (µL) **субстрату реагенту** в кожен лунку. Накрийте новим ущільнювачем для пластин. Інкубуйте приблизно 15 хвилин при 37°C (°C). Захищати планшет від світла. **Примітка:** час реакції може бути скорочений або подовжений відповідно до фактичної зміни кольору, але не більше, ніж на 30 хвилин.
- Додайте 50 мкл (µL) **стоп-розчину** в кожен лунку. **Примітка:** додавання стоп-розчину слід здійснювати в тому ж порядку, що й розчин субстрату.
- Визначіть оптичну щільність (значення оптичної щільності) кожної лунки відразу за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів, встановленого на 450 нм (nm).

#### ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Визначіть середнє значення повторних показників для кожного стандарту та зразків, потім відніміть середню нульову стандартну оптичну густину. Побудуйте чотири-параметрову логістичну криву на логарифмічному міліметровому папері зі стандартною концентрацією на осі x і значеннями ОЩ на осі y.

Якщо зразки були розведені, концентрацію, розраховану за стандартною кривою, слід помножити на фактор розведення. Якщо ОЩ зразка перевищує верхню межу стандартної кривої, ви повинні повторно перевірити його з відповідним розведенням. Фактична концентрація - це розрахована концентрація, помножена на коефіцієнт розведення.

#### ТИПОВІ ДАНІ

Оскільки значення ОЩ стандартної кривої можуть змінюватися залежно від умов фактичного виконання аналізу (наприклад, оператор, метод піпетування, метод промивання або вплив температури), оператор повинен встановити стандартну криву для кожного тесту. Типова стандартна крива та дані наведені нижче лише для довідки.

Концентрація (нг/мл ng/mL)	40	20	10	5	2.5	1.25	0.63	0
ОЩ	2.391	1.598	0.952	0.49	0.294	0.19	0.142	0.091
Виправлена ОЩ	2.3	1.507	0.861	0.399	0.203	0.099	0.051	-

#### ТОЧНІСТЬ

Точність в аналізі (точність в межах аналізу): 3 зразки з низьким, середнім і високим рівнем HNP1-3 людини перевіряли 20 разів на одному планшеті відповідно.

Точність між аналізами (точність між аналізами): 3 зразки з низьким, середнім і високим рівнем HNP1-3 людини були протестовані на 3 різних планшетах, по 20 повторів на кожному планшеті.

ТІЛЬКИ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ. НЕ ВИКОРИСТОВУВАТИ В ДІАГНОСТИЧНИХ ПРОЦЕДУРАХ.

Зразок	Точність в аналізі			Точність між аналізами		
	1	2	3	1	2	3
к-сть	20	20	20	20	20	20
Середнє значення (нг/мл (ng/mL))	1.91	4.86	16.61	2.06	5.3	15.84
Стандартне відхилення	0.12	0.23	0.75	0.13	0.3	0.64
КВ (%)	6.28	4.73	4.52	6.31	5.66	4.04

#### ВІДНОВЛЕННЯ

Відновлення HNP1-3 людини, доданого на трьох різних рівнях у зразках у всьому діапазоні аналізу, оцінювалося в різних матрицях.

Тип зразка	Діапазон (%)	Середнє відновлення (%)
Сироватка (к-сть=5)	85-101	92
ЕДТА плазма (к-сть=5)	91-105	97
Середовище клітинної культури (к-сть=5)	86-99	93

#### ЛІНІЙНІСТЬ

У зразки додавали високі концентрації людського HNP1-3 і розбавляли референсним стандартом і розчинником для зразків, щоб отримати зразки зі значеннями в межах діапазону аналізу.

		Сироватка (к-сть=5)	ЕДТА плазма (к-сть=5)	Середовище клітинної культури (к-сть=5)
1:2	Діапазон (%)	92-106	100-112	100-115
	Середнє значення (%)	100	106	105
1:4	Діапазон (%)	92-105	88-101	85-97
	Середнє значення (%)	99	93	92
1:8	Діапазон (%)	93-107	78-91	86-96
	Середнє значення (%)	100	85	91
1:16	Діапазон (%)	89-101	80-95	83-97
	Середнє значення (%)	94	87	89

#### УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Причини	Рішення
Погана стандартна крива	Неправильне піпетування	Перевірити дозатори.
	Неправильне розведення стандарту	Обережно перемішуючи, забезпечити коротке обертання флакону зі стандартом і розчинення порошку.
	Лунки неповністю аспіровані	Між кроками повністю аспіруйте лунки.
Низький сигнал	Недостатній час інкубації	Забезпечити достатній час інкубації.
	Неправильна температура аналізу	Використовувати рекомендовану температуру інкубації. Довести субстрат до кімнатної температури перед використанням.
	Невідповідні об'єми реагенту	Перевірити дозатори та переконатися у правильності приготування.
	Неправильне розведення	Змішати кон'югат HRP і TMB, швидко забарвлення.
Глибокий колір, але низьке значення	Налаштування зчитувача планшетів не є оптимальним.	Перевірити довжину хвилі та налаштування фільтра на пристрої для зчитування мікропланшетів.
		Відкрити пристрій для зчитування

		мікропланшетів для попереднього нагрівання.
Великий КВ	Неправильне піпетування	Перевірити дозатори.
Високий фон	Концентрація цільового білка дуже висока	Використовувати рекомендований коефіцієнт розведення.
	Планшет недостатньо помитий	Переглянути інструкцію щодо правильного миття. Якщо використовується вошер для планшетів, перевірити чи всі порти відкриті.
	Забруднений буфер для промивання	Приготувати свіжий буфер для промивання.
Низька чутливість	Неправильне зберігання ІФА набору	Усі реагенти слід зберігати, як зазначено в інструкціях.
	Стоп-розчин не додано	Перед вимірюванням стоп-розчин слід додати у кожен лунку.

#### КОРОТКИЙ ОПИС

1. Додати 100 мкл (µL) стандарту або зразка у кожен лунку. Інкубувати протягом 90 хв при 37°C (°C).

2. Видалити рідину. Додати 100 мкл (µL) біотинільованого антитіла для виявлення. Інкубувати протягом 1 години при 37°C (°C).

3. Аспірувати і промити 3 рази.

4. Додати 100 мкл (µL) HRP кон'югату. Інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C (°C).

5. Аспірувати і промити 5 разів.

6. Додати 90 мкл (µL) субстрату реагенту. Інкубувати протягом 15 хвилин при 37°C (°C).

7. Додати 50 мкл (µL) стоп-розчину. Одразу зчитати при 450 нм (nm).

8. Обчислити результати.

#### ДЕКЛАРАЦІЯ

- Через обмеження поточних умов та наукових технологій, ми не можемо провести комплексну ідентифікацію та аналіз усієї наданої сировини. Тому для користувачів, які використовують набір, можуть бути певні якісні та технічні ризики.
- Цей аналіз призначений для усунення впливу факторів, присутніх у біологічних зразках. Поки всі фактори не будуть перевірені в імуноферментному аналізі ELISA, не можна виключити можливість інтерференції.
- Кінцеві експериментальні результати будуть тісно пов'язані з валідністю продуктів, робочими навичками операторів, експериментальним середовищем тощо. Ми несемо відповідальність лише за сам набір, але не за зразки, використані під час аналізу. Користувачі повинні розрахувати можливу кількість зразків, використаних у цілому тесті. Будь ласка, підготуйте достатню кількість зразків заздалегідь.
- Щоб отримати найкращі результати, будь ласка, використовуйте лише

ТІЛЬКИ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ. НЕ ВИКОРИСТОВУВАТИ В ДІАГНОСТИЧНИХ ПРОЦЕДУРАХ.

- реагенти, надані виробником, і суворо дотримуйтесь інструкцій.
- Неправильні результати можуть виникнути через неправильні операції під час підготовки та завантаження реагентів, а також через неправильні налаштування параметрів пристрою для зчитування мікропланшетів. Уважно прочитайте інструкцію та налаштуйте прилад перед дослідженням.
  - Навіть той самий оператор може отримати різні результати в двох окремих дослідженнях. Щоб отримати відтворювані результати, слід контролювати виконання кожного етапу аналізу.
  - Кожен набір суворо пройшов тест з контролю якості. Однак результати кінцевих користувачів можуть не відповідати нашим даним через деякі змінні, наприклад умови транспортування, різне лабораторне обладнання тощо. Розбіжності в аналізі між наборами з різних партій також можуть виникати через наведені вище причини.
  - Набори від різних виробників або інші методи тестування одного аналіту можуть дати суперечливі результати, оскільки ми не порівнювали наші продукти з продуктами інших виробників.
  - Набір розроблено лише для дослідницького використання, ми не несемо відповідальності за будь-які наслідки, якщо набір використовується для клінічної діагностики чи будь-яких інших пов'язаних процедур.



#### **ВИРОБНИК**

MyBioSource, Inc.  
153308, Сан-Дієго, Каліфорнія  
92195-3308, США  
тел.: 1.858.633.0165  
факс: 1.858.633.0166  
e-mail: [sales@mybiosource.com](mailto:sales@mybiosource.com)  
[www.MyBioSource.com](http://www.MyBioSource.com)



ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

