

# НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТРОМБОМОДУЛІНУ В ЛЮДСЬКІЙ ПЛАЗМІ

## SEA529Hu, Thrombomodulin

Каталог. №: **SEA529Hu**

Методика від **06-2013**

Кількість : **96**

Версія **10**

Виробник : **Cloud-Clone Corp., (США)**



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

**Тільки для використання в дослідницьких цілях та in-Vitro  
Не для використання в клінічних діагностичних процедурах**

### ПРИЗНАЧЕННЯ

Даний набір є імуноферментним аналізом типу "сандвіч" для кількісного визначення Тромбомодуліна (ТМ) в плазмі крові людини.

### РЕАГЕНТИ ТА МАТЕРІАЛИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ

Реагенти	Кількість
Готовий до використання, 96-лунковий смужковий планшет з попереднім покриттям	1
Стандарт (ліофілізований)	2
Реагент для детекції А (зелений)	1 x 120 мкл
Реагент для детекції В (червоний)	1 x 120 мкл
Субстрат ТМБ	1 x 9 мл
Промивний Буфер (30x Концентрат)	1 x 20 мл
Плівка для заклеювання планшетів	4
Розріджувач стандартів	1 x 20 мл
Робочий Розріджувач А (2x Концентрат)	1 x 6 мл
Робочий Розріджувач В (2x Концентрат)	1 x 6 мл
Стоп Розчин	1 x 6 мл
Інструкція	1

### НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

- Мікропланшетний зчитувач з  $450 \pm 10$  нм фільтром.
- Точні одно- або багатоканальні піпетки та одноразові наконечники.
- Пробірки Еппендорфа для розбавлення зразків.
- Деіонізована або дистильована вода.
- Фільтрувальний папір для промокання планшета.
- Контейнер для Промивного розчину.

### ЗБЕРІГАННЯ НАБОРІВ

- Для нерозкритих наборів: Всі реагенти повинні зберігатися згідно з інформацією, вказаною на флаконах. **Стандарт, Реагент для детекції А, Реагент для детекції В і планшет** повинні зберігатися при температурі  $-20^\circ$  при отриманні, а інші повинні зберігатися при  $4^\circ\text{C}$ .
- Для відкритих наборів: після відкриття набору реагенти як і раніше повинні зберігатися відповідно до вищезазначених умов зберігання. Крім того, будь ласка, поверніть невикористані смужки в пластикову упаковку, яка містить осушувач, і щільно закрийте її.

### Примітка:

Рекомендується використовувати залишки реагентів протягом 1 місяця за умови, що не закінчився термін придатності набору. Термін придатності набору вказаний на етикетці на упаковці набору. Всі компоненти стабільні до закінчення терміну його дії.

### ЗАБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

**Плазма:** - Провести забір плазми з використанням 3,8% цитрату натрію (цитрат натрію:кров = 1:9) в якості антикоагулянту. Центрифугувати зразки протягом 15 хвилин при  $1000 \times g$  при  $2-8^\circ\text{C}$  на протязі 30 хвилин після забору. Видалити плазму і аналізувати негайно або зберігати зразки в аліквотах при  $-20^\circ\text{C}$  або  $-80^\circ\text{C}$  - для подальшого використання. Уникайте повторних циклів заморожування / відтавання.

### Примітка:

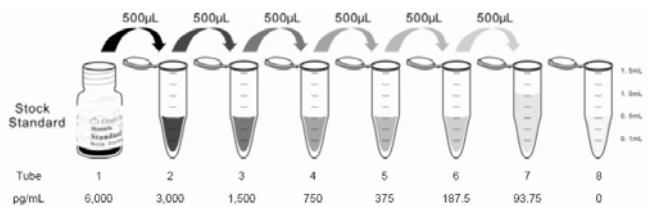
- Зразки, які будуть використовуватися протягом 5 днів, можна зберігати при температурі  $4^\circ\text{C}$ , в іншому випадку зразки повинні

зберігатися при температурі  $-20^\circ\text{C}$  ( $\leq 1$  місяць) або  $-80^\circ\text{C}$  ( $\leq 2$  місяці), щоб уникнути втрати біологічної активності та забруднення.

- Гемоліз зразки буде впливати на результат, тому гемолітичні зразки не повинні аналізуватися.
- При виконанні тесту привести зразки до кімнатної температури.

### ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

- Привести всі компоненти набору та зразки до кімнатної температури ( $18-25^\circ\text{C}$ ) перед використанням.
- Стандарт** - Відновити **Стандарт** з 1,0 мл **Розріджувача стандарту**, який зберігався протягом 10 хвилин при кімнатній температурі, злегка потрусити (не до утворення піни). Концентрація стандарту в вихідному розчині  $6000 \text{ pg/ml}$ . Будь ласка, підготуйте 7 пробірок, що містять 0,5 мл Розчинника Стандарту, і проведіть подвійний ряд розбавлення відповідно з малюнком нижче. Перемішайте кожну пробірку ретельно перед наступним переміщенням. Налаштуйте 7 розведень стандарту, наприклад  $6,000 \text{ pg/ml}$ ,  $3,000 \text{ pg/ml}$ ,  $1,500 \text{ pg/ml}$ ,  $750 \text{ pg/ml}$ ,  $375 \text{ pg/ml}$ ,  $187,5 \text{ pg/ml}$ ,  $93,75 \text{ pg/ml}$ , і остання пробірка ЕР з Розчинником стандарту є порожньою  $0 \text{ pg/ml}$ .



- Робочий Розріджувач А і Робочий Розріджувач В** – розвести 6 мл Концентрату (2x) Робочого розчинника А або В з 6 мл деіонізованої або дистильованої води для приготування Робочого Розчинника А або В. **(У флаконах знаходиться більше ніж 6 мл Робочого Розчинника а та Робочого Розчинника В. Тому, в кожному тесті піпетувати точну кількість необхідного об'єму Розчинника для отримання подвійного розведення в новій ємності. Приготоване Робоче розведення не можна заморожувати).**
- Реагент детекції А і Реагент детекції В** – Центрифугувати Вихідний Розчин Детекції А та Вихідний Розчин Детекції В перед використанням. Розбавити робочий концентрат з робочим Розчинником для аналізу **А або В** відповідно (1:100).
- Промивний Розчин** - Розвести 20 мл концентрату Розчину для промивання (30x) з 580 мл деіонізованої або дистильованої води для отримання 600 мл Розчину для промивання (1x).
- Субстрат ТМБ** - Аспірувати необхідні дози розчину за допомогою стерилізованих наконечників і не повертати залишки розчину знову у флакон.

### Примітка:

- Проведення серійних розведень безпосередньо в лунках не допускається.
- Приготувати стандарт протягом 15 хвилин до аналізу. Будь ласка, не розчиняйте реагенти безпосередньо при  $37^\circ\text{C}$ .
- Обережно відновити Стандарти або робочі Реагенти детекції А і В у відповідності з інструкцією, уникаючи піноутворення, і акуратно перемішати, поки кристали повністю не розчиняться. Щоб звести до мінімуму неточності, пов'язані з піпетуванням, використовуйте невеликі обсяги і переконайтеся, що піпетки калібровані. Рекомендується набирати більше 10 мкл на одне піпетування.
- Відновлені Стандарти, Реагент детекції А та Реагент детекції В можуть бути використані тільки один раз.
- Якщо кристали утворилися в Концентраті Розчину для промивання (30x), його необхідно нагріти до кімнатної температури і акуратно перемішати, поки кристали повністю не розчиняться.
- Забруднена вода або контейнер для приготування реагентів будуть впливати на результати аналізу.

### ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

- Корпорація Cloud-Clone** несе відповідальність тільки за сам набір, але не за зразки, які використовуються в процесі аналізу. Користувач повинен розрахувати можливу кількість зразків, що використовуються в тесті. Будь ласка, підготуйте достатню кількість зразків заздалегідь.
- Будь ласка, розрахуйте концентрацію перед дослідженням. Якщо значення концентрацій не входять в діапазон значень стандартної кривої, користувач повинен визначити оптимальні розведення зразка для конкретного експерименту.

- Зразки плазми потрібно розводити близько 1:50. Пропоноване 50-кратне розведення - 10 мкл зразка + 490 мкл PBS. Зразок має бути розведений 0,01 моль/л PBS (pH = 7.0 - 7.2).
- Якщо зразки не вказані в інструкції, необхідно провести попередній експеримент по визначенню обґрунтованості використання набору.
- Екстракційні зразки тканин або клітин, приготовані за допомогою хімічного лікувального буфера, можуть призвести до несподіваних результатів ELISA через вплив деяких хімічних речовин.
- У зв'язку з можливістю розбіжності між антигеном іншого походження і антитілом, використовуваним в даному наборі, деякі нативні або рекомбінантні білки від інших виробників можуть не працювати з даним набором.
- Під впливом факторів, таких як життєздатність клітин, число клітин або час тестування зразків, зразки супернатанту культури клітин можуть бути не виявлені за допомогою набору.
- Для тестування рекомендується використовувати свіжі зразки без тривалого зберігання. В іншому випадку, деградація білків і денатурація можуть відбутися в цих зразках, що призведе до невірних результатів.

## ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

- Визначити кількість лунок для розбавленого стандарту, бланка і взірця. Підготувати 7 лунок для стандарту, 1 лунку для бланка. Додайте 100 мкл кожного з розведень стандарту (читайте про підготовку реагентів), бланка і зразків у відповідні лунки. Накрити плівкою. Інкубувати протягом 2 годин при 37 °C.
- Видалити рідину з кожної лунки, не мити.
- Додати 100 мкл робочого розчину **Реагенту для детекції А** в кожну лунку. Витримати протягом 1 години при 37 °C після покриття планшета плівкою.
- Аспірувати розчин і промити з використанням 350 мкл 1x Розчину для промивання на кожну лунку, застосовуючи пульверизатор, багатоканальну піпетку, розподільчу колбу або автопромивач, і залишити на 1 ~ 2 хвилини. Видалити залишки рідини з лунок повністю, постукавши пластиною на фільтрувальний папір. Промити 3 рази. Після останньої промивки видалити залишки промивного буфера шляхом аспірації або декантування. Перевернути планшет і промокнути його фільтрувальним папером.
- Додати 100 мкл робочого розчину **Реагенту для детекції В** в кожну лунку. Витримати протягом 1 години при 37 °C після покриття планшета плівкою.
- Повторити процес аспірації/промивання всього 5 разів, як описано в кроці 4.
- Додати 90 мкл **Розчину субстрату** в кожну лунку. Покрити новою плівкою. Інкубувати протягом 15-25 хвилин при 37 °C (не більше 30 хвилин). Захистити від світла. Рідина стане синього кольору при додаванні розчину субстрату.
- Додати 50 мкл **Стоп розчину** в кожну лунку. Рідина стане жовтого кольору при додаванні Стоп розчину. Змішати рідину, постукаючи по стороні пластини. Якщо зміна кольору не відбувається, легко постукати по пластині, щоб забезпечити ретельне перемішування.
- Видалити всі краплі води і постукати по нижній частині пластини; впевнитися, що немає бульбашок на поверхні рідини. Потім запустити мікропланшетний зчитувач і провести вимірювання при 450 нм негайно.

## Примітка:

- Підготовка до аналізу:** Приготуйте відповідну кількість лунок для кожного експерименту і заберіть зайві лунки з планшета. Лунки, які не використовуються, повинні зберігатися при температурі -20 °C.
- Додавання зразків або реагентів:** Будь ласка, використовуйте свіжоприготований Стандарт. Обережно додати зразки в лунки і акуратно перемішати, щоб уникнути піноутворення. Не торкатись стінок лунки. Для кожного етапу процедури загальний час дозування для додавання реагентів або зразків в планшет для аналізу не повинен перевищувати 10 хвилин. Це забезпечить рівномірний розподіл часу піпетування для кожного кроку, без переривання. Рекомендується дублювання всіх стандартів і зразків, хоча це не є обов'язковим. Щоб уникнути перехресного забруднення, міняйте наконечники піпеток між додаваннями стандартів, зразків і реагентів. Крім того, використовуйте окремі резервуари для кожного реагенту.
- Інкубація:** Для забезпечення точності результатів необхідно належне проведення герметизації планшета під час інкубації. Не допускайте, щоб лунки залишалися відкритими на довший час між інкубаціями. Як тільки реагенти були додані в лунки, НЕ ДОЗВОЛЯЙТЕ смужкам ВИСИХАТИ в будь-який час під час тесту. Час інкубації і температура повинні контролюватися.
- Промивка:** Процедура промивання є критичною. Повне видалення рідини на кожній стадії має важливе значення для

високої продуктивності. Після останньої промивки видалити залишки розчину для промивання шляхом аспірації або декантування і видалити всі краплі води постукуванням кінчиками пальців по нижній частині пластини. Недостатня промивка призводить до низької точності і помилкових підвищених результатів вимірювання.

- Контроль часу реакції:** Спостерігайте за зміною кольору після додавання субстрату ТМБ (наприклад, спостереження кожних 10 хвилин), якщо колір знаєдо насичений, додайте Стоп розчин заздалегідь, щоб уникнути надмірно сильної реакції, що призведе до неточності показань оптичної щільності.
- Субстрат ТМБ** легко забруднюється. Будь ласка, захищайте його від світла.
- Вологість навколишнього середовища, менша за 60 %, може вплинути на роботу, тому зволожувач повітря рекомендується використовувати в такому стані.

## ПРИНЦИП ТЕСТУ

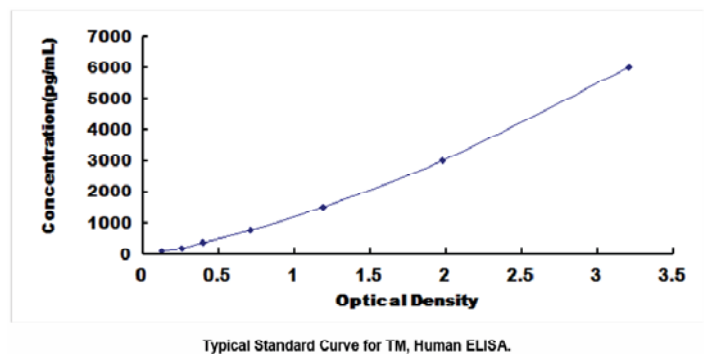
Мікропланшет, який входить до набору, був попередньо покритий антитілом, специфічним до ТМ. Стандарти та зразки додаються до відповідних лунок планшета з біотин-кон'югованими антитілами, специфічними до ТМ. Потім додається кон'югат авідин-HRP до кожної лунки мікропланшета і проводиться інкубація. Після додавання розчину субстрату ТМБ, тільки ті лунки, що містять ТМ, біотинильовані антитіла і фермент-кон'югований авідин, будуть демонструвати зміну в кольорі. Фермент-субстрат Реакція фермент-субстрат зупиняється додаванням розчину сірчаної кислоти і зміна кольору вимірюється спектрофотометрично на довжині хвилі 450 нм ± 10 нм. Концентрація ТМ у зразках визначається шляхом порівняння OD зразків на стандартній кривій.

## ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Визначити середнє значення в дублях для кожного стандарту, контролю і зразків і відняти середнє значення оптичної щільності нульового стандарту. Побудувати стандартну криву, відкладаючи середню OD і концентрації для кожного стандарту і провести кращий варіант кривої через точки на графіку або створити стандартну криву на логарифмічному папері зі значеннями концентрації ТМ на осі ординат і абсорбцією на осі абсцис. Використання програмного забезпечення, наприклад, Експерта кривої 1.30, також рекомендується. Якщо зразки були розбавлені, концентрацію, яка зчитується зі стандартної кривої, слід помножити на коефіцієнт розведення.

## ТИПОВІ ДАНІ

Для того, щоб зробити розрахунок простішим, ми відкладаємо значення OD стандарту (X-вісь) проти відомої концентрації стандарту (Y-вісь), хоча концентрація є незалежною змінною і значення OD є залежною змінною. Тим не менш, значення OD стандартної кривої можуть мінятися залежно від умов аналізу (наприклад, оператора, техніки піпетування, техніки промивки або температурних впливів). Рекомендується побудова стандартної кривої для кожного тесту. Типова стандартна крива, приведена нижче, призначена тільки для ознайомлення.



## ДІАПАЗОН ВІЯВЛЕННЯ

93.75-6,000 пг/мл. Концентрації Стандартної кривої, які використовувались для ELISA, були 6000 пг/мл, 3000 пг/мл, 1500 пг/мл, 750 пг/мл, 375 пг/мл, 187.5 пг/мл, 93.75 пг/мл.

## ЧУТЛИВІСТЬ

Мінімальна доза ТМ, яка визначається, типово є меншою за 41.25 пг/мл.

Чутливість даного аналізу, або Нижня Межа Виявлення (LLD), була визначена як найнижча концентрація протеїнів, більша за нуль. Вона була розрахована додаванням двох стандартних відхилень до значення середньої оптичної щільності 20 нульових стандартів, після чого була розрахована відповідна концентрація.

## СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Даний аналіз має високу чутливість та надзвичайну специфічність для виявлення ТМ.

Не спостерігалось значної перехресної активності або інтерференції між ТМ і аналогами.

## Примітка:

У зв'язку з обмеженням навичок та знань, неможливо для нас повністю завершити виявлення перехресної реактивності між ТМ і всіма аналогами, тому перехресна реакція може все ще існувати.

## ВІДНОВЛЕННЯ

Матриці, перераховані нижче, були насичені певним рівнем рекомбінантного ТМ і швидкість відновлення була розрахована шляхом порівняння виміряного значення та очікуваної кількості ТМ у зразках.

Матриця	Діапазон відновлення, %	Середнє значення, %
Плазма Цитратнатрієва (n=5)	80-94	88

## ЛІНІЙНІСТЬ

Лінійність набору аналізували за допомогою випробувань зразків, насичених відповідною концентрацією ТМ, і їх серійних розведень. Результати були продемонстровані у відсотках розрахункової концентрацією до очікуваної.

Взірець	1:2	1:4	1:8	1:16
Плазма Цитратнатрієва (n=5)	93-102 %	88-99 %	91-105 %	85-96 %

## ТОЧНІСТЬ

Точність в аналізі: 3 зразки з низьким, середнім і високим рівнем ТМ були протестовані 20 разів на одній пластині, відповідно.

Точність між аналізами: 3 зразки з низьким, середнім і високим рівнем ТМ були протестовані на 3 різних планшетах, 8 повторів на кожному.

$CV (\%) = SD/\text{середнє} \times 100$

В аналізі:  $CV < 10\%$

Між аналізами:  $CV < 12\%$

## СТАБІЛЬНІСТЬ

Стабільність набору ІФА визначається швидкістю втрати активності. Швидкість зниження активності даного набору складає менше 5% протягом терміну придатності при відповідних умовах зберігання.

Щоб звести до мінімуму додатковий вплив на продуктивність, необхідно дотримуватись порядку проведення тесту і лабораторних умов, особливо кімнатної температури, вологості повітря, температури інкубатора, які мають суворо контролюватися. Крім того, рекомендується, щоб весь аналіз проводився одним і тим же оператором від початку і до кінця.

## РЕЗЮМЕ ПРОЦЕДУРИ АНАЛІЗУ

1. Підготувати всі реагенти, зразки і стандарти;
2. Додати 100 мкл стандарту або взірця в кожну лунку. Інкубувати 2 години при 37 °C;
3. Аспірувати і додати 100 мкл підготовленого Реагенту Детекції А. Інкубувати 1 годину при 37 °C;
4. Аспірувати і промити 3 рази;
5. Додати 100 мкл підготовленого Реагенту Детекції В. Інкубувати 30 хвилин при 37 °C;
6. Аспірувати і промити в 5 разів;
7. Додати 90 мкл розчину субстрату. Витримати 15-25 хвилин при 37 °C;
8. Додати 50 мкл стоп розчину. Зчитати при 450 нм негайно.

## ЗАУВАЖЕННЯ

1. Обмежені поточним станом та науковими технологіями, ми не можемо повністю провести всебічну ідентифікацію та аналіз сировини, яка надається постачальниками. Тому можуть існувати деякі якісні та технічні ризики при використанні набору.
2. Остаточні результати аналізу будуть тісно пов'язані з якістю продукції, операційних навичок кінцевих користувачів і експериментальних умов. Будь ласка, переконайтеся, що достатня кількість зразків є доступною.
3. Набори з різних партій може трохи відрізнятися за діапазоном виявлення, чутливістю і часом розвитку забарвлення. Будь ласка, проводьте експеримент в точній відповідності до інструкції, яка додається в комплекті; електронні версії з нашого сайту є тільки інформаційними.
4. Забороняється використовувати реагенти з наборів різних партій. Використовуйте тільки Реагенти, що поставляються виробником.

5. Захищати всі реагенти від яскравого світла під час зберігання та інкубації. Всі пробки на пляшках з реагентами повинні бути щільно закритими, щоб запобігти випаровуванню і забрудненню мікроорганізмами.
6. При першому відкритті в лунках може знаходитись деяка речовина. Це не буде мати ніякого впливу на остаточні результати аналізу. Не виймайте мікротитраційний планшет з пакету, де він зберігається, поки це не є необхідним.
7. Неправильне операціонування при підготовці реагентів та їх завантаженні, а також помилки в налаштуванні параметрів для планшетів можуть призвести до невірних результатів. Мікропланшетний зчитувач з шириною доріжки 10 нм або менше і діапазоном оптичної щільності 0-3 O.D. або більше при довжині хвилі 450 ± 10 нм є прийнятним для використання для вимірювання абсорбції. Будь ласка, прочитайте уважно інструкцію і налаштуйте прилад до експерименту. Для отримання додаткової інформації, будь ласка, зверніться до операційного відео (<http://www.cloud-clone.us/homepage/operate.htm>).
8. Навіть один і той же оператор може отримати різні результати у двох окремих експериментах. Для того, щоб отримати кращу відтворюваність результатів, робота кожного кроку в аналізі повинна контролюватися. Крім того, рекомендується проведення попереднього експерименту перед аналізом для кожної партії.
9. Кожен комплект пройшов тест з Контролю якості. Тим не менш, результати від кінцевих користувачів можуть бути несумісними з нашими внутрішніми даними через деякі несподівані умови транспортування або різне устаткування лабораторії. Розбіжність між серіями серед комплектів з різних партій може виникнути в результаті цих факторів, теж.
10. Набори від різних виробників можуть призводити до різних результатів, так як ми не порівнювали нашу продукцію з іншими виробниками.
11. Інструкція також підходить для набору 48Т, але всі реагенти набору 48Т зменшені наполовину.

## ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Стоп-розчин, запропонований для використання з цим набором, є розчином кислоти. Використовувати захист для очей, рук, обличчя при роботі з даним матеріалом.

## ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМ

Проблема	Можливе джерело	Коригувальні дії
Погана Стандартна крива	Неправильна підготовка Стандартної кривої	Забезпечити точну роботу розбавлення взірця
	Неповна промивка та аспірація	Адекватні промивка та аспірація
	Неточне піпетування	Перевірити та калібрувати піпетки
Слабка точність	Незавершена промивка лунок	Забезпечити достатню промивку
	Недостатнє перемішування і аспірація реагентів	Адекватні аспірація і змішування реагентів
	Повторне використання піпеток, контейнерів та герметики	Змінити і використовувати нові наконечники, контейнери та герметики
	Неточне піпетування	Перевірити та калібрувати піпетки
Низькі значення O.D.	Недостатні обсяги реагенту, додані в лунки	Провести калібрування піпеток і додати адекватну кількість реагентів
	Невірний час інкубації	Забезпечити достатній час інкубації
	Невірна температура інкубації	Реагенти привести до кімнатної температури
	Не працює кон'югат або субстрат	Змішайте кон'югат і субстрат, колір повинен розвиватися негайно
	Не добавлено Стоп розчин	Дотримуйтесь протоколу аналізу
Результат зчитано пізно	Зчитайте в терміни, рекомендовані в керівництві	
Значення взірців	Неправильне зберігання взірця	Зберігати зразки належним чином і використовувати свіжий зразок
	Невірні забір та підготовка взірців	Вибрати правильний метод забору зразків і їх підготовки
	Недостатня кількість аналізу у взірцях	Використовуйте новий зразок і повторіть аналіз



**ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР**

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
е-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)