Human H-FABP

ELISA TEST KIT

Н-FABР человека

Набор для иммуноферментного анализа

Информация о продукте и инструкция

Внимательно прочтите перед использованием набора

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор **Hbt human H-FABP ELISA** предназначен для количественного определения нативного человеческого H-FABP сыворотке или плазме. Набор предназначен только для исследовательских целей. Не для диагностики или клинического использования.

Данный набор существует в двух форматах. Обычный формат с длительностью процедуры около 1.5 часов, для проведения более 40 определений. Второй вариант — это быстрая постановка, которая занимает примерно 50 минут.

2. ВВЕДЕНИЕ

Белки, связывающие жирные кислоты (FABPs) –это класс цитоплазматических белков, которые связывают длинноцепочечные жирные кислоты. Они в больших количествах присутствуют в клетках различных типов и играют важную роль во внутриклеточной утилизации жирных кислот. Существует как минимум 6 различных типов FABP, каждый из которых специфически экспрессируется в различных типах тканей. Содержание FABP в человеческой сердечной мышце (H-FABP) достаточно высокое, 10-20%.

После острого инфаркта миокарда (АМІ) маленький белок Н-FABP (15 кДа) быстро поступает в кровоток. Значительно повышенные концентрации сыворотке/плазме выявляются в течение 3 часов после АМІ, и обычно возвращаются к нормальному уровню в течение 12 - 24 часов. Это свойство делает Н-FABP полезным инструментом для ранней оценке или исключении АМІ, а также для мониторинга рецидива инфаркта миокарда. Уровень H-FABP, высвободившегося сердечной мышцы после **AMI** отражается количественно в сыворотке/плазме. Таким образом,

измерение H-FABP является эффективным инструментом для оценки обширности инфаркта.

В сыворотке/плазме здоровых людей присутствует приблизительно 1.6 нг/мл H-FABP. Наблюдается небольшое увеличение уровня H-FABP с возрастом.

3. ПРЕИМУЩЕСТВА НАБОРА

- Время анализа 1½ часа (обычный) и ¾ часа (быстрый).
- Максимально измеряемая концентрация 250 пг/мл.
- Измеряемый диапазон 100 25000 пг/мл.
- Рабочий объем 100 мкл на лунку.

Перекрестная реактивность

| | I-FABP человека | - |
|-----------------|-----------------|---|
| L-FABP человека | | - |
| Н-ГАВР свиньи | | ± |
| H-FABP лошади | | ± |
| | H-FABP лосося | ± |

Перекрестная реактивность с другими видами или белками/пептидами не была протестирована.

4. ПРИНЦИП ТЕСТА

- Набор **Hbt human H-FABP ELISA** основан на «сэндвич» методе твердофазного иммуноферментного анализа.
- Разведенные образцы и стандарты вместе со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой (трейсером), инкубируются в ячейках микропланшета, покрытых антителами, распознающими H-FABP человека.
- Во время этой инкубации антитела, сорбированные в лунках микропланшета, захватывают H-FABP. Если в пробе присутствовал H-FABP, то трейсер будет связываться с H-FABP, захваченнойым антителами.
- Несвязавшийся материал, пристуствующий в образце, и избыток трейсера удаляют при промывке. Затем в ячейки вносят вносят субстрат тетраметилбензидин (ТМБ).
- Окраска развивается пропорционально количеству H-FABP, присутствовавшего в образце.
- Ферментативную реакцию останавливают, добавляя лимонную кислоту. Затем с помощью спектрофотометра измеряют абсорбцию при 450 нм.
- Стандартную кривую получают путем построения графика зависимости оптической плотности от соответствующих известных концентраций стандартов.
- Концентрация H-FABP в образцах с неизвестным содержанием определяют по стандартной кривой (при этом стандарты и образцы должны анализироваться одновременно). При расчете концентрации не забудьте умножить значение, полученное из калибровочной кривой, в пг/мл, на соответствующий коэффициент разведения.

5. СОСТАВ НАБОРА

| c. edelilbiniborn | | | |
|-------------------|--------------|--------------|----------|
| № | компонент | Кол-во | Цветовой |
| компонента | ROMITOTICITI | ROJI BO | код |
| флакон 1 | буфер для | 1 флакон (20 | Серый |

| | промывок, концентрат 20х | мл) | |
|--------------------------------------|--|---|-----------|
| флакон 2 | буфер для разведения, концентрат 10х | 1 флакон (10 мл) | Золотой |
| флакон 3 Стандарт | | 1 флакон, 1 мл, лиофилизи- рованный | Желтый |
| флакон 4 | Конъюгат стрептавидин- пероксидаза | 1 флакон, 1 мл, лиофилизи- рованный | Голубой |
| флакон 5 | Субстрат ТМВ | 1 флакон (20 мл) | Пурпурный |
| Флакон 6 Стоп-раствор | | 1 флакон (20 мл) | Красный |
| компонент 7 | 12 микропланшетных стрипов, покрытых антителами | 1 микропланшет | |
| компонент 8 | рамка для микропланшетных стрипов | 1 | |
| компонент 9 адгезивных пле | | 4 | |
| компонент 10 | Сертификат контроля качества лота | 1 | |
| компонент 11 | Инструкция | 1 | |
| компонент Лист регистрации 12 данных | | 1 | |

1. Храните набор при 2-8°С. <u>НЕ</u> ЗАМОРАЖИВАЙТЕ.

- 2. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- 3. Стандарт и конъюгат в лиофилизированном виде стабильны до окончания срока годности, указанного на упаковке, при хранении при 2 8 °C после получения набора.
- 4. Точная концентрация стандарта указана на этикетке и в сертификате контроля качества к лоту.
- 5. После растворения стандарт и конъюгат должен быть использован в течение 1 месяца при хранении при 2 8 $^{\circ}$ C.
- При получении пакет из фольги с микропланшетами должен быть запечатан под вакуумом и не поврежден. Любые нарушения указанных условий могут повлиять на результаты анализа.
- 7. После того, как был вскрыт пакет, стрипы можно использовать до окончания срока годности, указанного на этикетке, если они хранятся в плотно закрытом пакете в холодильнике при 2 8°C и защищены от влаги.

полуавтоматической/автоматической промывки может понадобиться дополнительный флакон буфера для промывок. Он может быть заказан дополнительно.

- 4. Полипропиленовые пробирки.
- 5. Спектрофотометр для считывания оптической плотности при 450 нм.

6. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ, ОГРАНИЧЕНИЯ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 1. Только для лабораторных исследований. Не для клинических или диагностических целей.
- 2. Анализ должен выполняться только специально обученным персоналом.
- 3. Ни при каких условиях не добавляйте в качестве консерванта азид натрия ни к какому из компонентов, так как это инактивирует пероксидазу, используемую в анализе.
- 4. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- 5. Не смешивайте компоненты из наборов разных лотов. Реагенты были стандартизованы как единое целой для каждого лота. Используйте только реагенты, поставляемые производителем.
- 6. Данный метод был оптимизирован для определения в указанном диапазоне. Не меняйте диапазон определяемых значений.
- 7. Стандарт, трейсер и конъюгат упакованы под вакуумом и должны быть открыты только после растворения.
- 8. Не глотайте какие-либо компоненты набора.
- 9. Некоторые компоненты набора содержат консервант 2-хлорацетамид. 2-хлорацетамид может быть опасным для здоровья при контакте с кожей и токсичным при проглатывании. При случайном контакте или плохом самочувствии немедленно обратитесь к врачу.
- 10. Субстрат ТМВ чувствителен к свету, храните в защищенном от света месте. Раствор должен быть бесцветный до использования.
- 11. Стоп-раствор содержит 2% щавелевую кислоту и может вызвать раздражение или ожог дыхательной системы, кожи или глаз. Избегайте прямого контакта с кожей. При контакте немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу.
- 12. Изменение времени инкубации, температуры инкубации и вносимых объемов может привести к получению ошибочных результатов.
- 13. Не используйте лунки повторно, не сливайте остатки реагентов из емкостей обратно в оригинальные флаконы.
- 14. Со всеми биологическими образцами обращайтесь как с потенциально инфекционно опасными материалами.
- 15. Использование образцов с гемолизом, липемией, образцов, инактивированных нагреванием или контаминированных образцов может привести к получению ошибочных результатов.
- 16. Для приготовления стандартов и образцов используйте полипропиленовые пробирки. Не используйте полистироловые пробирки.

Материалы необходимые, но не поставляемые:

- 1. Микропипетки и одноразовые наконечники к ним.
- 2. Дистиллированная или деионизированная вода.
- 3. Микропланшетный вошер: автоматический или ручной. В случае использования

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЦЗОВ

Сбор и хранение

Образцы сыворотки или плазмы:

Соберите кровь, используя обычную процедуру. При использовании сыворотки, отделите сыворотку после

того, как кровь свернулась при комнатной температуре через 1 час центрифугированием 1500хg при 4° C, 15 минут.

При использовании плазмы, отделите плазму центрифугированием, не позднее чем через 20 минут после взятия образца крови: 1500хg при 4°C, 15 минут. Отберите плазму и перенесите ее в чистые одноразовые полипропиленовые пробирки.

Наиболее достоверные результаты получаются при тестировании образцов ЭДТА плазмы.

Хранение:

Образцы должны храниться при температуре ниже - 20°C, а лучше -70°C, в полипропиленовых пробирках. Хранение при температуре -20°C повлияет на извлечение белка. Используйте образцы в течение 24 часов после оттаивания. Не допускайте повторных циклов замораживания/оттаивания, которые могут привести к потере активности белка и получению ошибочных результатов.

Не используйте образцы с гемолизом, липемией, образцы, инактивированные нагреванием и контаминированные образцы.

Перед тестированием образцы должны достичь комнатной температуры $(18-25^{\circ}\mathrm{C})$ и должны быть тщательно перемешаны. Приготовьте все образцы (контроли и образцы) перед началом анализа. Избегайте образования пены.

Разведение:

Образцы сыворотки или плазмы

Человеческий Ĥ-FABP может быть точно измерен в образцах сыворотки или плазмы разведенных не менее, чем в 5 раз поставляемым буфером для разведения в полипропиленовых пробирках перед исследованием. Наиболее достоверные результаты могут быть получены при использовании ЭДТА плазмы.

Замечания по процедуре разведения образцов:

Рекомендованные разведения ΜΟΓΥΤ использованы только как ориентировочные. Извлечение белка в неразведенных образцах не составляет 100% и может варьировать от образца образцу. При тестировании образцов в меньших разведениях необходимо выполнять извлечения для определения влияния матрикса на измерение белка. Не используйте полистирольные пробирки или планшеты для подготовки или разведения образцов.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием все реагенты должны достичь комнатной температуры ($20-25^{\circ}\mathrm{C}$). Верните в соответствующие условия немедленно после использования.

Буфер для промывок

Приготовьте буфер для промывок, разведя 20 мл 20х концентрата буфера для промывок в 380 мл дистиллированной или деионизированной воды, полученного количества буфера для промывок будет достаточно для проведения 1 х 96 тестов. Если требуется провести меньшее количество тестов, приготовьте только необходимый объем буфера для промывок: разведите 1 часть концентрата буфера для промывок в 19 частях дистиллированной или деионизированной воды.

Буфер для разведения:

Приготовьте буфер для разведения, разведя 10 мл 10х концентрата буфера для разведения и в 90 мл

дистиллированной или деионизированной воды, полученного количества буфера для промывок будет достаточно для проведения 1 х 96 тестов. Если требуется провести меньшее количество тестов, приготовьте только необходимый объем буфера для разведения: разведите 1 часть концентрата буфера для разведения в 9 частях дистиллированной или деионизированной воды.

Концентрат буфера может содержать кристаллы. Если кристаллы не растворятся при комнатной температуре в течение 1 часа, концентрат буфера может быть нагрет до 37°C. Не шейкируйте раствор.

Раствор стандарта:

Растворите стандарт добавив (инъекцией) 0.5 мл дистиллированной или деионизированной воды во флакон. После растворения стандарт должен быть использован в течение 15 минут. Стандарт не хранится для повторного использования. Приготовьте стандарты человеческого кальпротектина, выполнив серию разведений растворённого стандарта в буфере для разведения, как указано в таблице 2

Таблица 2.

| таолица 2. | | | | |
|------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------|--|
| пробирка | Объем буфера для | Объём | Концентрация | |
| пробирка | разведения | стандарта | (пг/мл) | |
| 1 | См. сертификат контроля качества | 100 мкл раствора из флакона 3 | 25000 | |
| 2 | 150 мкл | 100 мкл из флакона 1 | 10000 | |
| 3 | 150 мкл | 100 мкл из флакона 2 | 4000 | |
| 4 | 150 мкл | 100 мкл из флакона 3 | 1600 | |
| 5 | 150 мкл | 100 мкл из флакона 4 | 640 | |
| 6 | 150 мкл | 100 мкл из флакона 5 | 256 | |
| 7 | 150 мкл | 100 мкл из флакона б | 102 | |
| 8 | 150 мкл | - | 0 | |

Конъюгат

Растворите содержимое флакона с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза, добавив (инъекцией) 1 мл дистиллированной или деионизированной воды. Разведите растворенный конъюгат в 5 мл буфера для разведения, полученного количества достаточно для выполнения 1 х 96 тестов. Если требуется провести меньшее количество тестов, приготовьте необходимый объем конъюгата: разведите 1 часть растворенного конъюгата в 5 частях буфера для разведения.

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Перед тестированием все реагенты и образцы должны достичь комнатной температуры $(20-25^{\circ}C)$.

- 1. Определите количество лунок, необходимое для текущей постановки, поместите необходимое количество лунок в рамку-держатель, заполните лист регистрации данных. Верните неиспользуемые стрипы в пакет с осущителем, тщательно закройте пакет и храните его при 2 8°C.
- 2. Внесите по 50 мкл разведенного конъюгата в каждую лунку.
- 3. Внесите по 50 мкл, в дублях, каждого стандарта, образца и контроля в соответствующие лунки.
- 4. Закройте микропланшет адгезивной пленкой. Очень

осторожным постукиванием удалите пузырьки воздуха. Будьте осторожны, не допускайте разбрызгивания жидкости на пленку.

5. Инкубируйте микропланшет <u>1 час при комнатной температуре или 30 минут при 37°С.</u>

- 6. Промойте лунки 4 раза буфером для промывок, используя вошер, или как описано ниже*:
- а. Аккуратно удалите адгезивную пленку, не допускайте разбрызгивания.
- b. Удалите жидкость из лунок планшета, перевернув его и вытряхнув содержимое в раковину, затем просушите его аккуратным постукиванием по толстому слою.
- с. Добавьте по 200 мкл разведенного буфера для промывок в каждую лунку, подождите 20 секунд, и удалите жидкость из лунок микропланшета как описано выше в 6b.
- d. Повторите процесс промывки 6b/6c еще три раза.
- е. Удалите жидкость из лунок планшета и аккуратно постучите перевернутым микропланшетом по толстому слою фильтровальной бумаги.
- 7. Внесите по 100 мкл раствора субстрата ТМВ. При этом не касайтесь стенок или дна лунок.
- 8. Закройте плашку адгезивной пленкой и инкубируйте 15 минут при комнатной температуре, защищая от яркого света (например, заверните плашку в алюминиевую фольгу или поместите ее в темное место).
- 9. Остановите реакцию, добавляя по 100 мкл стопраствора в той же последовательности и с теми же интервалами, что и в шаге 7. Осторожно встряхните планшет для того чтобы перемешать содержимое лунок и удалить все пузырьки воздуха.
- 10. Поместите планшет в спектрофотометр и измерьте абсорбцию при 450 нм, следуя инструкциям производителя оборудования, не позднее чем через 30 минут после внесения стоп-раствора.

10. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 1. Вычислите средние значения абсорбции (A_{450}) для дублей каждого из стандартов, образцов и контролей.
- 2. Если индивидуальное значение абсорбции более чем на 15% отличается от соответствующего среднего значения, результат считается сомнительным и образец необходимо протестировать еще раз
- 3. Среднее значение абсорбции нулевого стандарта, контрольное, должно быть ниже 0.3.
- Постройте калибровочную кривую использованием соответствующего программного обеспечения. И соответствующего метода аппроксимации построения хорошей ДЛЯ калибровочной кривой. Среднее значение абсорбции каждого стандарта откладывают по вертикальной оси против соответствующего значения (Y),концентрации каждого стандарта по горизонтальной (логарифмическая шкала). Пример (X) калибровочной кривой приведен в сертификате контроля качества, поставляемом в наборе. Если стандарты не попадают в диапазон допустимых значений, результаты теста не достоверны. Анализ должен быть повторен.
- 5. Если образец был разведен, то концентрация, полученная по калибровочной кривой, должна быть умножена на коэффициент разведения.
- 6. Концентрация аналита в образцах со средними значениями абсорбции, превышающими среднее

значение абсорбции максимального стандарта, лежит вне диапазона измеряемых значений. Такие образцы необходимо развести дополнительно и протестировать еще раз.

11. ТЕХНИЧЕСКИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- Анализ должен выполняться только специально обученным персоналом.
- Если сотрудники лаборатории не имеют опыта постановки анализа методом ИФА (ELISA), рекомендуется выполнить предварительную постановку перед тестированием образцов. Проанализируйте калибровочную кривую, соблюдая все рекомендации данной инструкции.
- Неправильная или неполная промывка на любом этапе анализа приведет к получению ошибочных ложно положительных или ложноотрицательных результатов. Полностью удаляйте жидкость из лунок перед внесением буфера для промывок на каждом цикле промывки и не оставляйте лунки открытыми или не давайте лункам высыхать.
- Так как точные условия анализа могут различаться от постановки к постановке, калибровочную кривую необходимо анализировать при каждой постановке. Если стандарты не попадают в диапазон допустимых значений, результаты теста не достоверны. Анализ должен быть повторен.
- Не смешивайте и не заменяйте реагенты и стрипы из разных лотов, или других наборов. Не смешивайте остатки реагентов с реагентами из свежее открытых флаконов.
- Для каждой постановки необходимо готовить свежите разведения стандарта, образцов, трейсера, конъюгата стрептавидин-пероксидаза и буферов.
- Крышки и блаконы не взаимозаменяемы. Флаконы должны быть закрыты соответствующими крышками.
- Для предотвращения перекрестной контаминации, используйте новые одноразовые наконечники для внесения каждого реагенты и образца, для разведения образцов. Используйте раздельные ёмкости для реагентов.
- Для гарантии получения точных результатов тщательно заклеивайте лунки поставляемыми адгезивными пленками во время инкубаций.
- Утилизируйте отходы в соответствии с правилами, установленными в лаборатории.

12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Сертификат контроля качества, поставляемый с набором. Специфичен для каждого лота и должен быть использован для верификации результатов, полученных в лаборатории. Значения абсорбции, указанные в сертификате контроля качества, должны быть использованы только как ориентировочные. Результаты, полученные в вашей лаборатории, могут отличаться.

Данный метод разработан таким образом, чтобы интерференцию растворимых минимизировать рецепторов, связывающих белков и других факторов, присутствующих в биологических образцах. Однако невозможно полностью исключить возможность интерференции до тех пор, пока все возможно влияющие вещества не будут протестированы производителем Hycult Biotech. Для получения оптимальных результатов соблюдайте правила хорошей лабораторной практики (good laboratory practice).

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ ОШИБОК

Рекламации и претензии по гарантии в отношении некомплектности должны быть предъявлены в письменном виде до истечения срока годности набора. Письменная форма должна содержать номер лота набора, и первичные данные (если была выполнена постановка). Рекомендации по поиску и устранению ошибок даны в таблице 3 и могут быть использованы в случае получения неожиданных результатов.

| Низкая | Высокая | Разброс | Все лунки | Dag пини | Возможная причина |
|-----------|----------------------|---------|-----------|----------|--|
| | высокая абсорбция | | положи- | отрица- | возможная причина |
| иосородия | иосородия | дуолен | тельные | тельные | |
| | | | | | Материалы набора |
| | | | | | контаминированы или истек срок |
| • | • | | • | • | годности |
| _ | | | | | Использованы неправильные |
| | | | | | реагенты |
| | | | | | Неправильно растворены |
| • | | • | • | | лиофилизированные реагенты |
| • | • | • | • | • | Неправильные разведения или ошибка пипетирования |
| | | | | | Для приготовления стандартов |
| | | | | | и/или образцов использован |
| • | | • | | | неправильный пластик |
| • | • | | | | Неправильное время или |
| | | | | | температура инкубации Особенно в случае инкубации |
| | | | | | особенно в случае инкубации при 37°С: лунки инкубировали не |
| | | • | | | равномерно |
| | | | | | Тестирование начали до того, как |
| • | | | | | все реагенты и образцы достигли |
| | | | | | комнатной температуры |
| • | • | • | • | • | Несоблюдение процедуры |
| | | | | • | Пропущен шаг процедуры или реагент |
| | | • | | | Плохое перемешивание образцов |
| | • | | • | | Низкая чистота воды |
| | | | | | Стрипы слишком долго |
| | | | | | оставались сухими во |
| | • | • | | | время/после промывки |
| | • | • | • | | Неправильная промывка |
| | | | | | Перекрестная контаминация с |
| | | | | | другими образцами или |
| | • | • | | | положительным онтролем |
| | | • | • | | Раствор ТМВ не прозрачный или не бесцветный |
| | | | | | Иомо и оором мограрии и |
| | | | | | Использован неправильные фильтр при считывании |
| | ľ | | | | фильтр при считывании абсорбции в лунках |
| | | | | | аосороции в лупках |
| | • | • | | | Пузырьки воздуха |
| | | | | | Не плотная упаковка |
| | | • | | | неиспользованных лунок после |
| | | | | | вскрытия пакета |
| • | | | | | Неправильное хранение |