

# MBL Oligomer ELISA Kit

KIT 029RUO



*Pouze pro výzkumné účely.  
Nepoužívat v diagnostických postupech.*

**invitrogen**  
by Thermo Fisher Scientific

## MBL Oligomer ELISA Kit

Přečtěte si prosím pozorně tyto instrukce

### Použití

MBL oligomer ELISA je souprava pro *in vitro* detekci oligomerizovaného mannan-vázajícího lektinu v lidském séru nebo heparinované plazmě. Pouze pro výzkumné účely. Nepoužívat pro diagnostické účely.

### ÚVOD

Mannan-vázající lektin (MBL; zvaný také manózu vázající lektin nebo protein) je multimerní karbohyd- ráty vázající protein produkovaný v játrech a vylučovaný do krve, kde se stává důležitým prvkem vrozené obranyschopnosti jedince proti napadajícím mikroorganismům. Jeho normální oligomerizované formy jsou spojeny se specifickými serinovými proteázami (MASPs), které jsou aktivovány vazbou MBL na karbohydrátové povrchy mikrobů a dále aktivují komplement cestou MBL nebo lektinu<sup>1</sup>.

### Princip stanovení

Jedná se o ELISA metodu prováděnou v mikrodestičkách pokrytých monoklonální protilátkou proti MBL karbohydrát-vázající doméně. Navázaný MBL je detekován toutéž protilátkou značenou biotinem, následnou reakcí se streptavidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou a inkubací s chromogen- ním substrátem. Srovnání výsledků této metody s chromatografií imunoreaktivitu MBL u individuálních vzorků lidského séra ukazuje, že použitá monoklonální protilátka je pro MBL oligomer selektivní, je-li použita zároveň jako vázající a detekční. Metoda má čtyři kroky:

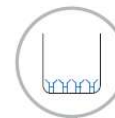
1) Alikvotní množství kalibrátorů, naředěných vzorků séra a všech kontrol je inkubováno v mikrodestičkách, které jsou pokryty monoklonální protilátkou proti MBL. MBL přítomný v roztocích se naváže na protilátkou potažené jamky prostřednictvím svých karbohydráty vázajících domén. Nenavázaný materiál je odstraněn promytím.

2) Do každé testovací jamky je přidána biotinylovaná monoklonální detekční protilátka a inkubována. Detekční protilátka se váže na navázané MBL prostřednictvím svých karbohydráty vázajících domén, které nejsou obsazeny vazbou k protilátce. Nenavázaná detekční protilátka je odstraněna promytím.

3) Do každé testovací jamky je přidán streptavidin konjugovaný s křenovou peroxidázou (HRP-streptavidine) a ponechán, aby vytvořil komplex s navázanou biotinylovanou protilátkou. Nenavázaný konjugát je odstraněn promytím.

4) Do každé testovací jamky je přidán chromogenní peroxidázový substrát obsahující tetramethylbenzidin (TMB). Navázaný HRP-streptavidin reaguje se substrátem a vytváří zbarvený produkt. Enzymatická reakce je chemicky zastavena a ELISA readerem je změřena barevná intenzita při 450 nm. Barevná intenzita (optická hustota) je funkcí koncentrace MBL oligomerových forem původně přidaných do každé jamky. Výsledky měření kalibrátorů slouží pro sestavení kalibrační křivky, ze které jsou poté odvozeny koncentrace MBL v původním vzorku séra.

### Princip stanovení



**MBL protilátka**  
Destičky jsou potažené primární MBL protilátkou. Destičky jsou připraveny k použití.



**MBL**  
Naředěné vzorky a kalibrátory jsou přidány do každé jamky a inkubovány.



**Biotinylovaná MBL protilátka**  
Biotinylovaná detekční protilátka je přidána do každé jamky a inkubována.



**Streptavidin – HRP**  
Streptavidin konjugovaný s křenovou peroxidázou je přidán do každé jamky a inkubován.



**TMB Substrát**  
Substrát je přidán do každé jamky. Nechte reagovat ve tmě po dobu 15 minut.

**Stop činidlo**  
Stop činidlo je přidáno do každé jamky. Odečtení destičky proveďte do 30 minut.

Kvantitativní výsledky se získají měřením absorbance jamek při vlnové délce 450 nm.



**Složení soupravy**

Položka	Obsah	Množství
①	12 stripů po 8 jamkách potažených protilátkou proti MBL + rámeček	96 jamek
②	ředící roztok	1 x 60 mL
③	MBL kalibrátor 1-8	8 x 1 mL
④	25x koncentrovaný promývací roztok	1 x 30 mL
⑤	Biotinylovaná protilátka proti MBL	1 x 12 mL
⑥	HRP-streptavidin	1 x 12 mL
⑦	TMB substrát	1 x 12 mL
⑧	Stop činidlo	1 x 16 mL

**Poznámka:** Kapalné reagentie obsahují konzervanty, které mohou být škodlivé při požití.

**Další potřebný materiál (nedodávaný se soupravou)**

- nastavitelné mikropipety pracující v rozsahu 1-1000 µL a odpovídající jednorázové špičky
- polypropylenové zkumavky s objemem do 1000 µL
- stojany na zkumavky
- nastavitelná 8- nebo 12-ti kanálová mikropipeta (s rozsahem 50-250 µL) nebo mikropipeta dávkující opakovaně stejná množství (volitelná)
- čistý válec se stupnicí do 1 litru
- deionizovaná nebo destilovaná voda
- kryt na mikrodestičku
- čistou nádobku pro naředěný promývací roztok
- přístroj pro plnění jamek během promývací procedury (volitelný)
- papírové ubrousky nepouštějící chloupky nebo absorpční papír

- jednorázové pipetovací kontejnery
- budík (s rozsahem 60 min)
- kalibrovaný reader ELISA destiček schopný odečítat při 450 nm (s referenční vlnovou délkou 650 nebo 620 nm)
- chlornan sodný (domácí bělidlo v ředění 1:10) pro dekontaminaci vzorků, reagentií a materiálů

**Upozornění**

**Pouze pro výzkumné účely.**

**Nepoužívat pro diagnostické účely.**

- Tato souprava by měla být používána pouze kvalifikovanou laboratorní obsluhou
- MBL kalibrátory byly připraveny z MBL purifikovaného z lidské plazmy. Každá jednotka krve použitá pro jejich přípravu byla schválenými metodami testována a potvrzena negativní na hepatitis B povrchový antigen (HBsAg) a protilátky proti viru lidské imunodeficiency (HIV) 1 a 2, a dále viru hepatitidy C (HCV). Navíc byl výsledný produkt podroben virus deaktivčním procedurám. Nicméně, protože žádný test není schopen poskytnout kompletní důkazy o absenci infekčních agens, mělo by být s kalibrátory a se vzorky od pacientů manipulováno dle úrovně biologické bezpečnosti číslo 2, tak jak je doporučeno pro každé potenciálně infekční lidské sérum nebo vzorek krve v návodech CDC/NIH „Bezpečnost práce v mikrobiologických a biomedicinských laboratořích“, 1999. Roztoky obsahující lidské sérum by měly být považovány za potenciálně infekční a podle toho by s nimi mělo být manipulováno.
- K předcházení křížové kontaminace používejte pro každý vzorek, kalibrátor a reagentii

samostatnou pipetovací špičku.

- Pro každou reagentii používejte samostatnou nádobku, to platí zejména pro TMB substrát.
- Po použití dekontaminujte všechny vzorky, reagentie a materiály namočením do roztoku chlornanu sodného min. na 30 min (domácí bělidlo naředěné 1:10).
- K zamezení tvorby kapek během mytí aspirujte promývací roztok do lahvičky obsahující bělidlo.
- Zabraňte znečištění životního prostředí. Likvidujte nádoby a nepoužité zbytky reagentií v souladu s národními a místními předpisy.
- Reagentie v této soupravě obsahují konzervační látky a při použití mohou být toxické.
- Stop činidlo obsahuje 0,5 mol/L kyselinu sírovou a může způsobit podráždění nebo popáleniny kůže a očí. Jestliže dojde ke kontaktu, okamžitě postižené místo opláchněte proudem vody a vyhledejte lékařskou pomoc.
- Nezaměňujte součásti souprav z různých šarží. Komponenty jsou standardizovány jednotlivě pro každou šarží.
- Hemolytické nebo vysoce lipemické vzorky mohou způsobit nesprávné výsledky.
- Neředte vzorky sér přímo v jamkách mikrodestiček.
- Nedotýkejte se a nepoškrábejte dno jamek v mikrodestičkách při pipetování nebo aspiraci tekutiny.
- Jiné než zde uvedené inkubační doby a teploty mohou způsobit nesprávné výsledky.
- Jakmile jednou začnete provádět metodu, nenechte vyschnout jamky mikrodestiček.
- TMB substrát je citlivý na světlo. Uchovávejte

jej mimo přímé světlo.

- Jakmile jednou rozlijete jakékoli reagens, nevracejte je do jejich lahviček zpět; použité mikrodestičky nepoužívejte znovu.
- Při odběru vzorku, jeho přípravě a při manipulaci se vzorkem vždy noste rukavice.
- Souprava obsahuje materiál lidského nebo zvířecího původu a mělo by se s ním zacházet jako s potenciálním nosičem a přenašečem chorob. Hovězí sérový albumin je vyroben z hovězí plazmy kontrolované USDA a je validován na nepřítomnost prionu (TSE).
- Pokud je obal poškozený, soupravu nepoužívejte.

**Stabilita a uchování**

- Uchovávejte soupravu ve všech reagentiích při teplotě 2-8°C. Nezmrazujte ji.
- Použijte všechny reagentie před uplynutím expirační doby uvedené na etiketě lahvičky.
- Naředěný promývací roztok je stabilní při teplotě 2-8°C 4 týdny. Pokud nepoužijete všechny jamky, nařeďte si pouze část promývacího roztoku.
- Pro následné použití jednotlivých stripů mikrodestiček vložte nepoužité stripy zpět do původního obalu s desikantem a znovu zalepte. Před otevřením nechte vždy obal s destičkami vytemperovat na laboratorní teplotu, aby se zabránilo kondenzaci vlhkosti v/n jamkách.

**Odběr vzorků**

**zacházejte se všemi vzorky krve, séra nebo plazmy jako s potenciálně infekčními.**

**viz. upozornění, body 2, 3, 5, 6, 7 a 18.**

Stanovení MBL v jednom vzorku vyžaduje 5-50 µL séra nebo plazmy. Vzorky krve by měly být odebírány asepticky do obyčejných nebo do zkumavek s heparinem kvalifikovanou osobou schváleným způsobem odběru krve. Sérum nebo plazma by měly být zpracovány standardními technikami pro klinické laboratorní testování. Uzavřete vzorky zátkou a pro stanovení do 24 hodin je uchovávejte při teplotě 2-8°C.

Nebude-li měření provedeno do 24 hodin, nebo musí-li být vzorek poslán do laboratoře, uzavřete zkumavku zátkou a uchovejte zmražené na teplotu -20°C nebo nižší. Vyhněte se opakovanému zamrazování a rozmrazování. Nepoužívejte hemolytické, vysoce lipemické, tepelně ošetřené nebo kontaminované vzorky.

#### Příprava reagensií a vzorků

1. Před zahájením měření ponechte všechny vzorky a reagensie vytemperovat na pokojovou teplotu (20-25°C). Důkladně promíchejte vzorky jemným obracením a je-li to nutné, odstraňte viditelné pevné částice šetrnou nízkorychlostní centrifugací.
2. Určete počet vzorků, který budete testovat (v dubletech) plus počet vzorků potřebných pro vnitřní laboratorní kontrolu (v dubletech), plus počet jamek pro blanky. Mikrojamky mohou být použity ve stripech po 8 nebo jednotlivě. Jednotlivé jamky se vylomí ze stripu a umístí se do rámečku na vhodné místo. Písmena a zářezy na jamkách slouží k identifikaci jednotlivých jamek. Přidejte 16 jamek pro 8 kalibrátorů (v dubletech). Vyjměte potřebný počet stripů, zbytek v hliníkové fólii nahradte desikantem a uchovejte při teplotě 2-8°C.
3. Promývací roztok: Naředte 25x koncentrovaný promývací roztok vylitím celkového objemu

lahvičky (30 mL) do válce (kalibrovaného do objemu 1l) a přidejte destilovanou nebo deionizovanou vodu do výsledného objemu 750 mL. Důkladně promíchejte a uchovejte při teplotě 2-8°C.

4. Ředící roztok: Přípraven k použití, dále neředit.
5. MBL kalibrátory: Přípraveny k použití. Příslušné koncentrace jsou uvedeny na etiketách. Dále neředit.
6. Biotinylovaná MBL protilátka: Přípravena k použití, dále neředit..
7. HRP-streptavidin konjugát: Přípraven k použití, dále neředit..
8. TMB substrát: Přípraven k použití, dále neředit.
9. Stop činidlo: Přípraveno k použití, dále neředit.
10. Vzorky naředte s ředícím roztokem tak, aby jste získali minimálně 250 µL naředěného roztoku, který může být v dubletech připraven do jamek v množství 100 µL na jamku. Pro počáteční screening většiny vzorků je doporučováno ředění 1:100 (např. 5 µL séra + 495 µL ředícího roztoku, promícháno obracením nebo pomalým vortexováním), které je následováno přeměřením více či méně naředěných vzorků (jak je nutno) u výsledků ležících mimo měřící rozsah metody. Ředění nižší než 1/20 by nemělo být používáno.

#### Postup měření

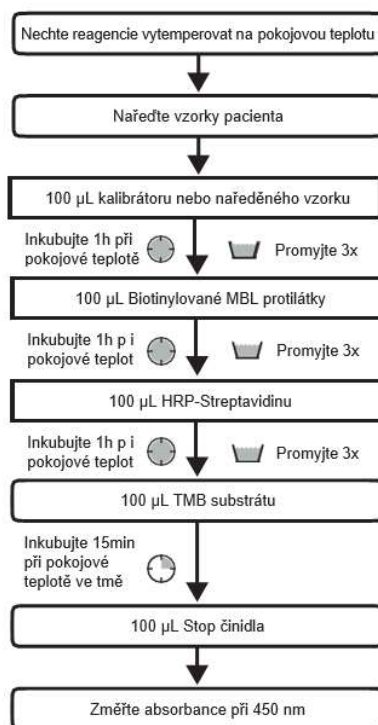
1. Připravte si protokol metody a přiřaďte v něm příslušné jamky kalibrátorům, naředěným vzorkům séra a veškerým laboratorním

kontrolám v dubletech. Jestliže na ELISA readeru není dostupná referenční vlnová délka 620 nebo 650 nm, může být přiřazena jamka pro blank. Ten je připraven napipetováním 100 µL ředícího roztoku místo naředěného séra nebo plazmy a dále je postupováno stejně jako u ostatních jamek.

2. Napipetujte 100 µL objemu každého kalibrátoru, naředěných vzorků a všech laboratorních kontrol do patřičných pozic v mikrodestičce. Zakryjte jamky a inkubujte 60 minut při pokojové teplotě na třepačce nastavené na rychlost 200/min.
3. Odsajte obsah jamek a třikrát je promyjte naředěným promývacím roztokem v množství minimálně 300 µL/jamka. Promýváte-li jamky manuálně, vyprázdněte jamky otočením destičky a jemným vytřepáním jejího obsahu do vhodného kontejneru, a následně osušte takto otočenou destičku papírovým ručníkem. Minimálně před posledním promývacím cyklem je doporučeno před vyprázdněním jamek cca 1 min počkat. Energičnost, s jakou je plněn nebo odstraňován promývací roztok z jamek, ovlivňuje vývoj finálního zabarvení. Manuální pipetování, které může být velmi jemné a vést ke vzniku intenzivního zabarvení, je doporučováno pouze při absenci alternativ jako je plnění jamek ponořením multikanálového manuálního promývacího automatu, nebo používání automatického promývacího přístroje.
4. Napipetujte do každé jamky 100 µL biotinylované MBL protilátky (přípravené k použití). Může být použita multikanálová pipeta nebo pipeta dávkující opakovaně

stejná množství. Zakryjte jamky a inkubujte 60 minut při pokojové teplotě na třepačce nastavené na rychlost 200/min.

5. Promyjte tak, jak je popsáno výše v bodě 3.
6. Napipetujte do každé jamky 100 µL HRP-streptavidin konjugátu (přípraveného k použití). Může být použita multikanálová pipeta nebo pipeta dávkující opakovaně stejná množství. Zakryjte jamky a inkubujte 60 minut při pokojové teplotě na třepačce nastavené na rychlost 200/min.
7. Promyjte tak, jak je popsáno výše v bodě 3.
8. Napipetujte do každé jamky 100 µL TMB substrátu (přípraveného k použití). Z důvodu úspory času je doporučeno použití multikanálové pipety. Zakryjte jamky a inkubujte přesně 15 minut při pokojové teplotě v temnu. Zapněte odpočítávání, když plníte první jamku.
9. Přidejte 100 µL Stop činidla (přípraveného k použití) do každé jamky, a dodržujte stejný pipetovací postup a rychlost jako v kroku 7. Promíchejte jemným protřepáváním cca 20 s, vyhněte se vystříknutí obsahu z jamek. Během 30 minut změřte absorpenci jamek.
10. Absorbanci jamek měřte při vlnové délce 450 nm na vhodném readeru mikrodestiček (referenční vlnová délka 620 nebo 650 nm). Jestliže není k dispozici žádná referenční vlnová délka, pak absorbance jamky obsahující blank je odečtena od každé jednotlivé naměřené absorbance ostatních jamek předtím, než jsou provedeny jakékoliv další kalkulace.

**Schématický přehled:****Výpočet výsledků**

Základním principem je vytvoření kalibrační křivky vnesením průměrů získaných hodnot absorbancí MBL kalibrátorů měřených v dubletech na osu Y proti odpovídající koncentraci MBL v ng/mL vnesených na osu X. Kalibrační křivka musí

respektovat validační požadavky. Koncentrace MBL v každém naředěném vzorku séra je poté zjištěna nalezením místa na křivce odpovídajícím průměrné hodnotě absorbancí naředěného vzorku séra a zjištěním odpovídající koncentrace v ng/mL na ose X. Koncentrace MBL v neředěném vzorku séra je vypočítána vynásobením této hodnoty dilučním faktorem.

Tato metoda může být prováděna manuálně použitím milimetrového papíru s vnesenými osami X a Y. Skrz body může být nakreslena plynulá křivka nebo mohou být vedle sebe ležící body spojeny přímkami. Druhý způsob může mírně nadhodnotit hodnoty koncentrací mezi body, je-li křivka mírně konvexní vlevo, což je typické zjištění. Ačkoli se křivka může podobat přímé lince, je prakticky i teoreticky nesprávné počítat a nakreslit přímou nejvíce vyhovující linku a odečítat výsledky z ní.

Metoda může být prováděna také za použití softwarového programu ELISA readeru, který dokáže vytvářet kalibrační křivky. Metodou volby k sestavení křivky je 4-parametrová funkce za použití lineární X a Y osy.

Naředěné vzorky dávající střední hodnotu absorbance vyšší než hodnotu absorbance kalibrátoru o koncentraci 40 ng/mL, resp. nižší než hodnotu absorbance kalibrátoru o koncentraci 0,5 ng/mL jsou mimo měřicí rozsah a jejich koncentrace by měla být uváděna jako >40ng/mL, resp. <0,5 ng/mL. Odpovídající koncentrace neředěných sér jsou vypočítávány jako >(40 x diluční faktor) ng/mL, resp. <(0,5 x diluční faktor) ng/mL. Tyto vzorky by měly být přeměřeny ve vyšších, resp. nižších ředěních (pro vzorky s vysokou, resp. nízkou absorbancí). Nové diluční faktory by měly být odhadnuty tak, aby výsledné hodnoty absorbance ležely v rozmezí kalibrační křivky; neměla by však být používána ředění nižší než 1/20

**Sestavení kalibrační křivky**

Střední hodnoty absorbance pro kalibrátory o obsahu 40 ng/mL by měly být >1,5. Střední hodnota absorbance každého dalšího MBL kalibrátoru by měla být vyšší než hodnota pro předešlý MBL kalibrátor, např. absorbance (10 ng/mL MBL) > absorbance (5 ng/mL MBL). Kalibrační křivka by měla být lehce konvexní doleva pokud jsou výsledky vynášeny na lineární osy.

Hodnoty kalibrátorů ležící mimo rozmezí: Jeden nebo více jednotlivých kalibrátorů může vykazovat abnormální hodnoty absorbance. Jedna nebo obě hodnoty dubletu mohou být mimo rozmezí, a průměr hodnot dubletů může být mimo rozmezí. Tato chyba je významná, pokud ovlivňuje uspokojivé vytvoření kalibrační křivky pomocí 4-parametrové funkce, která je následkem abnormální hodnoty odchýlena od ostatních vnesených hodnot kalibrátorů, které jsou ve skutečnosti správné. Správnost vnesených hodnot kalibrátorů a vytvořená křivka by měly být před jakýmkoliv kalkulací koncentrací vždy prověřeny. Špatně vytvořená křivka se také projevuje vysokou hodnotou R2. Je-li ovlivněn pouze jeden kalibrátor (a není-li nejvyšším kalibrátorem), existují 2 možnosti:

i) Z bodů tvořících křivku by měla být eliminována nesprávná hodnota, a ostatní zbývající hodnoty použity k vytvoření nové křivky 4-parametrovou funkcí. Je-li dosaženo uspokojivého výsledku, mohou z ní být provizorně odvozeny koncentrace vzorků.

ii) Jestliže není možno tímto způsobem získat uspokojivou křivku, ale křivka je jinak konzistentní, mohou být prozatímní výsledky

získány z přímých úseček vedených průměry dubletů s vynecháním nesprávného bodu.

Jestliže jsou špatné hodnoty dvou nebo více kalibrátorů, mělo by být měření zopakováno.

Odišný výsledek u některého z kalibrátorů může být následkem chyby laboranta nebo vadného kalibrátoru. Jestliže jsou obě hodnoty měření v dubletu opakovaně mimo linii hodnot, je kalibrátor vadný a měl by být vynechán.

**Návaznost kalibrátoru**

Stanovení hodnoty koncentrace MBL kalibrátoru bylo zajištěno pomocí ELISA stanovení v návaznosti na interní standardy v Statens Serum Institutu (Dánsko).

**Kontrola kvality**

Laboratoře provádějící tuto metodu opakovaně by měly vyrobit svá vlastní kontrolní séra s nízkou absorbancí (méně než 100 ng/mL) a vysokou absorbancí (více než 1000 ng/mL) a uchovávat je v alikvotních množstvích cca 50 µL při teplotě -20°C nebo nižší. Alikvotní množství každého kontrolního séra by mělo být rozmrazeno a změřeno při každém jednotlivém měření a záznam o tom uschován. To slouží jako kontrola kvality testu, neporušenosti testu a věrohodnosti laboranta. Výsledky by měly být přešetřeny na posun (tendence následných výsledků růst nebo klesat), nebo významné kolísání od průměrů předchozích měření. Výsledky neodchylující se o více než 20% od průměrů předchozích měření mohou být považovány za indikátory přijatelnosti testu. Uschovaná alikvotní množství kontrolních sér by neměla být opakovaně rozmrazována pro opakovaná měření, byla-li již jednou zmrazena. Jestliže je prováděno nové měření, měly by být použity čerstvé vzorky kontrol a čerstvá ředění vzorků.

**Odpovědnost**

Tato ELISA souprava je určena pouze pro in vitro stanovení MBL v lidském séru nebo heparinované plazmě.

Tato ELISA souprava je určena k použití pouze kvalifikovaným personálem provádějícím výzkumné činnosti. Pokud příjemce tohoto testu předá soupravu jakýmkoli způsobem třetí straně, musí být tato instrukce přiložena a uvedený příjemce na své vlastní riziko zajistí ve prospěch společnosti ThermoFisher Scientific všechna zde uvedená omezení odpovědnosti.

změna: IFU-0080 v.03 KIT029RUO -en-cz





Katalogové číslo



Použitelné do



Biologicky  
nebezpečné



Číslo šarže



Chraňte před slunečním  
světlem



Nepoužívejte, je-li obal poškozen



Viz návod k použití



Teplotní omezení



Pro jednorázové použití



Konzentrát promývacího roztoku. Před použitím  
zřed'te.



Výrobce



Upozornění viz příložená  
dokumentace

**invitrogen**  
by Thermo Fisher Scientific



Thermo Fisher Scientific 3747 N. Meridian Rd., Rockford IL 61101, USA  
www.thermofisher.com