

## Souprava Human MBL Oligomer ELISA

Enzymově vázaný imunisorbční test pro kvantitativní detekci lidského MBL oligomeru

Katalogové číslo BMS2329

Publ. č. MAN0028015 Rev. A.0 (30)

**UPOZORNĚNÍ!** Přečtěte si bezpečnostní listy (SDS) a dodržujte pokyny pro manipulaci. Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. Bezpečnostní listy (SDS) jsou k dispozici na adrese [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).

### Popis výrobku

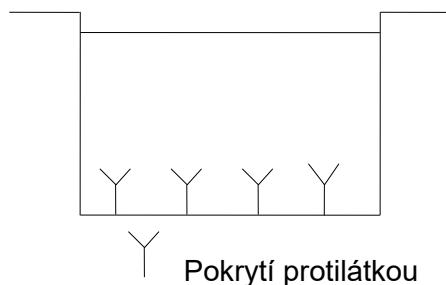
Souprava Invitrogen™ Human MBL Oligomer ELISA je enzymově vázaný imunisorbční test pro kvantitativní detekci lidského lektinu vázajícího mannan (MBL; nazývaného také lektin vázající manózu nebo protein) v lidském séru nebo všech typech plazmy.

### Shrnutí

MBL je multimerní protein vázající sacharidy, který je produkován v játrech a vylučován do krve, kde tvoří důležitý prvek vrozené imunitní obrany proti napadajícím mikroorganismům. Jeho normálně oligomerizované formy jsou spojeny se specifickými serinovými proteázami (MASP), které se aktivují, když se MBL váže na mikrobiální sacharidové povrchy, které následně aktivují komplement prostřednictvím MBL nebo lektinové cesty.

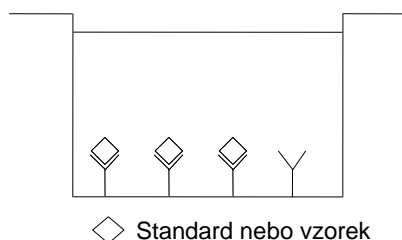
### Princip testu

Protilátka proti lidské monoklonální protilátce detekující doménu vázající sacharidy MBL se adsorbuje na mikrojamky.



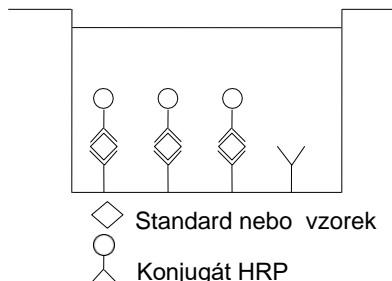
Obr. 1 Pokrytá mikrojamka

Lidský MBL přítomný ve vzorku nebo standardu se váže na protilátky adsorbované na mikrojamkách.



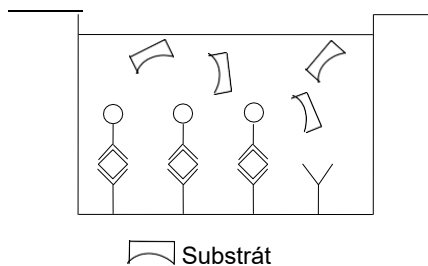
Obr. 2 První inkubace

Po inkubaci se během promývacího kroku odstraní nenavázané biologické složky a poté se přidá protilátka anti-MBL konjugovaná s HRP, která se váže na lidský MBL zachycený první protilátkou.



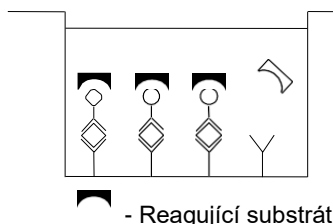
Obr. 3 Druhá inkubace

Po inkubaci se během promývacího kroku odstraní nenavázaná protilátka proti MBL konjugovaná s HRP a poté se do jamek přidá roztok substrátu, který reaguje s HRP.



Obr. 4 Třetí inkubace

Úměrně množství lidského MBL přítomného ve vzorku nebo standardu se vytvoří barevný produkt. Reakce se ukončí přidáním kyseliny a absorbance se měří při 450 nm. Ze 7 standardních ředění lidského MBL se připraví standardní křivka a stanoví se koncentrace lidského MBL.



Obr. 5 Zastavení reakce

### Dodané reagensie

1 hliníkový sáček s mikrotitrační destičkou (12 proužků po 8 jamkách) pokrytou monoklonální protilátkou vůči lidskému MBL.

1 lahvička (120 µl) konjugátu HRP monoklonální protilátky proti MBL  
2 lahvičky standardního lidského MBL lyofilizovaného, 80 ng/ml po rekonstituci

1 lahvička (50 ml) 20 x koncentrátu pufru pro test (PBS s 1% detergentem Tween™ 20, 10% BSA)

1 lahvička (50 ml) 20 x koncentrátu promývacího pufru (PBS s 1% detergentem Tween™ 20, 10% BSA)

1 lahvička (15 ml) roztoku substrátu (tetrametylbenzidin)

1 lahvička (15 ml) zastavovacího roztoku (2M kyselina chlorovodíková)

4 lepicí fólie

## Pokyny pro skladování soupravy ELISA

Reagencie soupravy skladujte při teplotě 2 °C až 8 °C. Promývací pufr je po naředění stabilní po dobu 12 týdnů. Reagencie uchovávejte mimo dosah tepla a přímého slunečního záření. Ihned po použití by se měly zbývající reagencie vrátit do chladničky (2 °C až 8 °C). Zkontrolujte datum expirace na obalu.

Expiraci složek soupravy lze zaručit pouze tehdy, pokud jsou složky správně skladovány a pokud v případě opakovaného použití jedné složky nedojde ke kontaminaci reagencie při první manipulaci.

## Pokyny pro odběr a skladování vzorků

Pro stanovení MBL jsou preferovanými maticemi vzorků sérum nebo všechny typy plazmy. Všechny vzorky se předem ředí v poměru 1:100 testovacím pufrům. Proto lze 10 µl vzorku naředit 990 µl testovacího pufru. Vzorky obsahující viditelnou sraženinu je třeba před použitím vyčistit. Nepoužívejte hrubě hemolyzované nebo lipemické vzorky.

Vzorky by měly být alikvotovány a musí být uchovávány zmrazené při -20 °C. Vyhněte se opakovaným cyklům zmrazování a rozmrazování. Zmrazené vzorky pomalu rozmrazujte při pokojové teplotě a před použitím je opatrně promíchejte.

## Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

- odměrné pipety 5 ml a 10 ml
- nastavitelné jednorázové mikropipety 5 µl až 1000 µl s jednorázovými špičkami
- nastavitelné vícekanálové mikropipety 50 µl až 300 µl s jednorázovými špičkami
- Zásobník na vícekanálové mikropipety
- Kádinky, baňky a válce pro přípravu reagentů
- Zařízení pro podávání promývacího roztoku (vícekanálová promývací láhev nebo automatický promývací systém)
- Čtečka proužků s mikrojamkami schopná odečítat při vlnové délce 450 nm (620 nm jako volitelná referenční vlnová délka)
- Voda destilovaná ve skleněné nádobě nebo deionizovaná voda
- Statistická kalkulačka s programem pro provádění regresní analýzy

## Bezpečnostní opatření pro použití

- Všechny reagencie je třeba považovat za potenciálně nebezpečné. Proto doporučujeme, aby s tímto produktem manipulovaly pouze osoby, které byly vyškoleny v laboratorních technikách, a aby byl používán v souladu se zásadami správné laboratorní praxe. Používejte vhodný ochranný oděv, například laboratorní plášť, ochranné brýle a rukavice. Je třeba dbát na to, aby nedošlo ke kontaktu s kůží nebo očima. V případě kontaktu s kůží nebo očima je okamžitě omyjte vodou. Konkrétní pokyny naleznete v bezpečnostním listu (listech) a/nebo v bezpečnostních pokynech.
- Reagencie jsou určeny pouze pro výzkumné použití a nejsou určeny k použití v diagnostických nebo terapeutických postupech.
- Reagencie nemíchejte ani nezaměňujte s reagenty z jiných šarží nebo jiných zdrojů.
- Nepoužívejte reagencie soupravy po datu expirace uvedeného na štítku.
- Během skladování nebo inkubace nevystavujte reagencie soupravy silnému světlu.
- Nepipetujte ústy.
- Nejezte a nekuřte v místech, kde se manipuluje s reagenty soupravy nebo vzorky.
- Zabraňte kontaktu kůže nebo sliznic s reagenty soupravy nebo vzorky.
- Při manipulaci s reagenty soupravy nebo vzorky používejte gumové nebo jednorázové latexové rukavice.
- Zabraňte kontaktu roztoku substrátu s oxidačními činidly a kovy.
- Zabraňte rozstříku nebo vzniku aerosolů.
- Aby se zabránilo mikrobiální kontaminaci nebo křížové kontaminaci reagentů nebo vzorků, která by mohla znehodnotit test, používejte jednorázové pipetovací špičky a/nebo pipety.

- Pro dávkování konjugátu a substrátové reagentie používejte čisté, k tomu určené zásobníky na reagentie.
- Působením kyseliny se konjugát inaktivuje.
- Pro přípravu činidla se musí používat voda destilovaná ve skleněné nádobě nebo deionizovaná voda.
- Roztok substrátu musí mít před použitím pokojovou teplotu.
- Dekontaminujte a zlikvidujte vzorky a všechny potenciálně kontaminované materiály, jako by mohly obsahovat infekční agens. Preferovanou metodou dekontaminace je autoklavování po dobu nejméně 1 hodiny při teplotě 121,5 °C.
- Kapalné odpady neobsahující kyseliny a neutralizované odpady lze smíchat s chlornanem sodným v takovém objemu, aby výsledná směs obsahovala 1,0 % chlornanu sodného. Pro účinnou dekontaminaci vyčkejte 30 minut. Kapalný odpad obsahující kyselinu musí být před přidáním chlornanu sodného neutralizován.
- Po zahájení testu by měly být všechny kroky dokončeny bez přerušení.
- Absorbance je funkcí inkubační doby a teploty. Před zahájením testu se doporučuje, aby byly připraveny všechny reagencie, odstraněna víčka, všechny potřebné jamky zajištěny v držáku atd. Tím se zajistí stejný čas pro každý krok pipetování bez přerušení.
- Obecně platí, že enzymatická reakce je lineárně úměrná času a teplotě.
- Dodržujte inkubační doby uvedené v této uživatelské příručce.
- Doporučujeme provádět kalibrační testy, kontroly a testy vzorků alespoň ve dvou opakováních (minimálně).
- Pro každý test musí být vytvořena kalibrační křivka.

## Než začnete

- Před zahájením testovacího postupu uveďte pufrové koncentráty na pokojovou teplotu a poté je zředte.
- Pokud se v pufrových koncentrátech vytvořily krystaly, zahřívajte je opatrně, dokud se zcela nerozpustí.

## Příprava reagentů

### Příprava promývacího pufru (1x)

1. Celý obsah (50 ml) koncentrovaného promývacího pufru (20x) nalijte do čistého odměrného válce o objemu 1000 ml a poté doplňte destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 1000 ml. Jemně promíchejte, abyste zabránili tvorbě pěny.

Promývací pufr (1x) lze také připravit podle potřeby podle následující tabulky:

Počet proužků	Koncentrát promývacího pufru (20x)	Destilovaná voda (ml)
1-6	25	475
1-12	50	950

2. Přeneste do čisté promývací láhve a skladujte při teplotě 2 °C až 25 °C.

Poznámka: Promývací pufr (1x) je stabilní po dobu 30 dnů.

### Příprava testovacího pufru (1x)

1. Nalijte celý obsah (5 ml) koncentrátu testovacího pufru (20x) do čistého odměrného válce o objemu 100 ml, poté je doplňte destilovanou vodou na konečný objem 100 ml. Jemně promíchejte, abyste zabránili tvorbě pěny.

Testovací pufr (1x) lze také připravit podle potřeby podle následující tabulky:

Počet proužků	Koncentrát testovacího pufru (20x)	Destilovaná voda (ml)
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

2. Skladujte při teplotě 2 až 8 °C.

Poznámka: Testovací pufr (1x) je stabilní po dobu 30 dnů.  
Příručka uživatele k soupravě Human MBL Oligomer ELISA

## Příprava konjugátu HRP

Konjugát HRP připravte do 30 minut použití.

Roztok konjugátu HRP zředte v poměru 1:100 testovacím pufr (1x) v čisté plastové zkumavce podle následující tabulky:

Počet proužků	Konjugát HRP (ml)	Testovací pufr (1x) (ml)
1-6	0,06	5,94
1-12	0,12	11,88

## Příprava lidského standardu MBL

1. Rekonstituujte lidský standard MBL přidáním destilované vody. Poznámka: Objem pro rekonstituci je uveden na štítku lahvičky se standardem. Koncentrace rekonstituovaného standardu je 80 ng/ml.
2. Jemně promíchejte, abyste zajistili úplnou a homogenní solubilizaci.
3. Nechte standard rekonstituovat po dobu 10-30 minut a poté jej před ředěním dobře promíchejte. Přistupte k přípravě standardních roztoků na mikrotitrační destičce nebo ve zkumavkách.

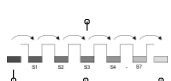
Po použití nelze zbývající standard skladovat a musí se zlikvidovat.

## Příprava - ředění externího standardu

Označte 7 zkumavek, jednu pro každý standardní bod: S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7.

1. Připravte sériová ředění 1:3 pro standardní křivku. Do zkumavky S1 napipetujte 200 µl testovacího pufru (1x).
2. Do zkumavek S2–S7 napipetujte 250 µl testovacího pufru (1x).
3. Pipetujte 200 µl rekonstituovaného standardu (koncentrace = 80 ng/ml) do první zkumavky označené S1 a promíchejte (koncentrace standardu 1 = 40 ng/ml).
4. Do druhé zkumavky označené S2 odpipetujte 125 µl tohoto roztoku a před dalším přenosem důkladně promíchejte.
5. Sériové ředění opakujte ještě pětkrát, abyste vytvořili body standardní křivky (viz Obrázek 6).

Testovací pufr (1x) slouží jako slepý pokus.



- ① 1:2 Zředěný lidský standard MBL (S1, 40 ng/ml)
- ② Testovací pufr (1x) 250 µl
- ③ Přenos 125 µl
- ④ Odstranění 125 µl

Obr. 6 Zředěné standardy - zkumavky

## Spusťte protokol testu

Pro optimální provedení testu je povinné protřepání.

1. Před zahájením testovacího postupu vzorky předem naředte testovacím pufr (1x) podle následujícího schématu:  
10 µl vzorku + 990 µl testovacího pufru (1x)
2. Dvakrát promyjte proužky s mikrojamkami přibližně 400 µl promývacího pufru na jamku. Před odsátím nechte promývací pufr v jamkách působit asi 10-15 sekund.

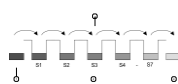
**DŮLEŽITÉ!** Dbejte na to, abyste nepoškrábali povrch mikrojamek.

3. Po posledním promývacím kroku jamky vyprázdněte a poklepejte s proužky na savou podložku nebo papírový ubrousek, abyste odstranili přebytečný promývací pufr. Proužky s mikrojamkami použijte ihned po promytí. Alternativně lze proužky s mikrojamkami položit dnem vzhůru na vlhký savý papír na dobu ne delší než 15 minut. Nenechte jamky vyschnout.

4. Standardní roztok na mikrotitrační destičce (alternativně lze standardní roztok připravit ve zkumavkách, viz „Příprava externího standardního roztoku“ na straně 3).

Do standardních jamek A1 a A2 přidejte dublicitně 75 µl testovacího pufru. Do standardních jamek B1/2- G1/2 přidejte dublicitně 100 µl testovacího pufru. Pipetujte 75 µl rekonstituovaného standardu (viz „Příprava lidského standardu MBL“ na straně 3) dublicitně do jamek A1 a A2 (viz Tabulka 1). Obsah jamek A1 a A2 promíchejte opakovaným nasátím a vypuštěním (koncentrace standardu 1, S1 = 40 ng/ml), poté přeneste 50 µl do jamek B1 a B2. Dbejte na to, abyste nepoškrábali vnitřní povrch mikrojamek.

Tento postup opakujte pětkrát, čímž vytvoříte dvě řady standardních ředění lidského MBL v rozmezí 40 až 0,05 ng/ml. Odstraňte 50 µl obsahu z posledních použitých mikrojamek (G1, G2).



- ① 1:2 Zředěný lidský standard MBL (S1, 40 ng/ml)
- ② Testovací pufr 100 µl
- ③ Přenos 50 µl
- ④ Odstranění 50 µl

Obr. 7 Zředěné standardy - mikrotitrační destička

Tabulka 1 Příklad uspořádání slepých vzorků, standardů a vzorků v mikrojamkových proužcích.

	1	2	3	4
A	Standard 1 40,00 ng/ml	Standard 1 40,00 ng/ml	Vzorek 1	Vzorek 1
B	Standard 2 13,30 ng/ml	Standard 2 13,30 ng/ml	Vzorek 2	Vzorek 2
C	Standard 3 4,40 ng/ml	Standard 3 4,40 ng/ml	Vzorek 3	Vzorek 3
D	Standard 4 1,48 ng/ml	Standard 4 1,48 ng/ml	Vzorek 4	Vzorek 4
E	Standard 5 0,49 ng/ml	Standard 5 0,49 ng/ml	Vzorek 5	Vzorek 5
F	Standard 6 0,16 ng/ml	Standard 6 0,16 ng/ml	Vzorek 6	Vzorek 6
G	Standard 7 0,05 ng/ml	Standard 7 0,05 ng/ml	Vzorek 7	Vzorek 7
H	Blank	Blank	Vzorek 8	Vzorek 8

V případě externího standardního ředění napipetujte 100 µl těchto standardních ředění (S1 - S7) do standardních jamek podle Tabulky 1.

5. Do slepých jamek přidejte dublicitně 100 µl testovacího pufru (1x).
  6. Do jamek pro vzorky přidejte dublicitně 50 µl testovacího pufru (1x).
  7. Do jamek pro vzorky přidejte dublicitně 50 µl každého předředěného vzorku.
  8. Zakryjte je lepicí fólií a inkubujte při pokojové teplotě (18 °C až 25 °C) po dobu 2 hodin na třepače mikrodestiček nastavené na 400 otáček za minutu.
  9. Odstraňte lepicí fólii a vyprázdněte jamky. Čtyřikrát promyjte proužky s mikrojamkami přibližně 400 µl promývacího pufru na jamku, přičemž mezi jednotlivými promýváními důkladně odsajte obsah mikrojamek. Před odsátím nechte promývací pufr v jamkách působit asi 10-15 sekund. Dbejte na to, abyste nepoškrábali povrch mikrojamek.
- Po posledním promývacím kroku vyprázdněte jamky a poklepejte na proužky s mikrojamkami na absorpční podložce nebo papírovém ubrousku, abyste odstranili přebytečný promývací pufr. Proužky s mikrojamkami použijte ihned po promytí. Nenechte jamky vyschnout.
10. Připravte konjugát HRP (viz „Příprava konjugátu HRP“ na straně 3). Přidejte 100 µl připraveného konjugátu HRP do všech jamek.
  11. Zakryjte je lepicí fólií a inkubujte při pokojové teplotě (18 °C až 25 °C) po dobu 1 hodiny na třepače mikrodestiček nastavené na 400 otáček za minutu.
  12. Odstraňte lepicí fólii a vyprázdněte jamky. Promyjte proužky s mikrojamkami 4krát podle popisu (viz krok 9). Ihned přejděte k dalšímu kroku.
  13. Do všech jamek napipetujte 100 µl substrátového roztoku TMB.

14. Inkubujte proužky s mikrojamkami při pokojové teplotě (18 °C až 25 °C) ve tmě bez třepání po dobu 15 minut. Vyhněte se přímému působení intenzivního světla.

Vývoj barvy na destičce by měl být sledován a reakce substrátu by měla být zastavena (viz následující krok) dříve, než pozitivní jamky přestanou být správně zaznamenatelné. Stanovení ideální doby pro vývoj barvy je třeba provést individuálně pro každý test.

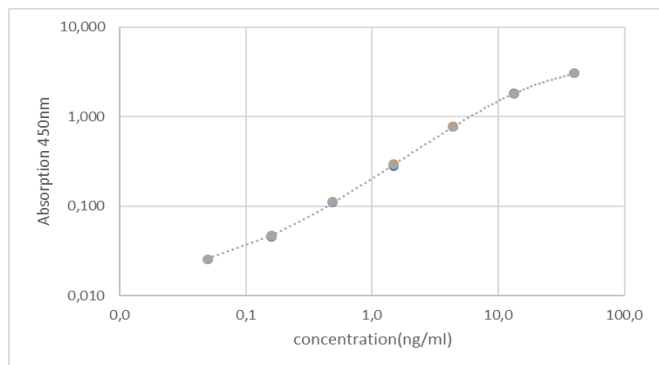
Doporučuje se přidat zastavovací roztok, když nejvyšší standard dosáhne tmavé barvy. Alternativně lze vývoj barvy sledovat pomocí čtečky ELISA při 620 nm.

15. Zastavte enzymovou reakci rychlým napipetováním 100 µl zastavovacího roztoku do každé jamky. Je důležité, aby byl zastavovací roztok rychle a rovnoměrně rozptýlen po celé jamce, aby se enzym zcela inaktivoval. Výsledky odečtete ihned po přidání zastavovacího roztoku nebo do jedné hodiny, pokud jsou proužky s mikrojamkami uloženy při teplotě 2 °C až 8 °C ve tmě.
16. Odečtete absorbanci každé mikrojamky na spektrofotometru s použitím 450 nm jako primární vlnové délky (případně 620 nm jako referenční vlnové délky; přijatelná je vlnová délka 610 nm až 650 nm). Vyčistěte čtečku destiček podle pokynů výrobce pomocí slepých jamek. Stanovte absorbanci vzorků i standardů.

## Výpočet výsledků

1. Vypočítejte střední hodnoty absorbance pro každou sadu duplicitních standardů a vzorků. Duplikáty by měly být v rozmezí 20 % průměrné hodnoty.
2. Vytvořte standardní křivku vynesením průměrné absorbance pro každou koncentraci standardu na ordinátu proti koncentraci lidského MBL na abscisu. Nakreslete křivku nejlepšího přizpůsobení bodům grafu (doporučuje se pětiparametrová křivka přizpůsobení).
3. Chcete-li určit koncentraci cirkulujícího lidského MBL pro každý vzorek, zjistěte nejprve střední hodnotu absorbance na ordinátě a protáhněte vodorovnou čáru ke standardní křivce. V bodě průsečíku protáhněte svislou čáru na abscisu a odečtete odpovídající koncentraci lidského MBL.
4. Každou koncentraci odečtenou ze standardní křivky vynásobte faktorem ředění vzorku. Pokud byly dodrženy pokyny v tomto protokolu a vzorky byly ředěny v poměru 1:200, vynásobte každou koncentraci číslem 200.
5. Doporučujeme, aby si každé testovací pracoviště stanovilo kontrolní vzorek o známé koncentraci lidského MBL a provedlo tuto dodatečnou kontrolu u každého testu. Pokud získané hodnoty nejsou v očekávaném rozmezí kontroly, mohou být výsledky testu neplatné.
6. Reprezentativní standardní křivka je znázorněna na Obrázku 8.

Poznámka: Tuto standardní křivku nepoužívejte k odvozování výsledků testu. Každá laboratoř si musí připravit standardní křivku pro každou skupinu testovaných proužků s mikrojamkami.



Obr. 8 Reprezentativní standardní křivka pro lidský MBL. Lidský MBL byl ředěn v sériových trojnásobných krocích v testovacím pufru (1x).

Tabulka 2 Typické údaje při použití testu ELISA na lidský oligomer MBL.

Vlnová délka měření: 450 nm

Referenční vlnová délka: 620 nm

Standard	Lidský MBL (ng/ml)	O.D. při 450 nm	Střední O.D. při 450 nm	C.V. (%)
1	40,00	3,093 3,092	3,093	0
2	13,30	1,815 1,801	1,808	1
3	4,40	0,761 0,776	0,769	1
4	1,48	0,277 0,300	0,288	6
5	0,49	0,111 0,114	0,112	1
6	0,16	0,046 0,047	0,047	2
7	0,05	0,025 0,026	0,026	1
Blank	0	0,012 0,014	0,013	11

Hodnoty OD standardní křivky se mohou lišit v závislosti na podmínkách provedení testu (např. operátor, technika pipetování, technika promývání nebo vliv teploty). Kromě toho může doba skladovatelnosti soupravy ovlivnit enzymatickou aktivitu, a tím i intenzitu barvy. Naměřené hodnoty jsou stále platné.

## Omezení

- Vzhledem k tomu, že přesné podmínky se mohou u jednotlivých testů lišit, musí být pro každý test stanovena standardní křivka.
- Bakteriální nebo plísňová kontaminace vzorků nebo reagensů nebo křížová kontaminace mezi reagensy může způsobit chybné výsledky.
- Upřednostňují se jednorázové pipetové špičky, baňky nebo skleněné nádoby, opakovaně použitelné skleněné nádoby se musí před použitím umýt a důkladně opláchnout od všech detergentů.
- Nesprávné nebo nedostatečné promytí v kterékoli fázi postupu vede k falešně pozitivním nebo falešně negativním výsledkům. Před dávkováním čerstvého promývacího roztoku jamky zcela vyprázdněte, naplňte je promývacím pufrům podle pokynů pro každý promývací cyklus a nenechávejte jamky delší dobu odkryté nebo suché.

## Výkonnostní charakteristiky

### Senzitivita

Mez detekce lidského MBL definovaná jako koncentrace analytu, která vede k absorbanci významně vyšší, než je absorbance ředícího média (průměr plus 2 směrodatné odchylky), byla stanovena na 102 pg/ml (průměr 3 nezávislých testů).

### Reprodukovatelnost

#### Intra-assay

Reprodukovatelnost byla hodnocena pomocí 6 opakování 8 různých vzorků obsahujících různé koncentrace lidského MBL oligomeru. Vypočtený celkový koeficient intra-assay byl 9,2 %.

#### Inter-assay

Reprodukovatelnost mezi testy v rámci jedné laboratoře byla hodnocena ve 3 nezávislých pokusech. Každý test byl proveden s 6 opakováními 8 různých vzorků obsahujících různé koncentrace lidského MBL oligomeru. Vypočtený celkový koeficient inter-assay byl 6,2%.

## Paralelnost ředění

Vzorky s různými hladinami lidského oligomeru MBL byly analyzovány v sériových trojnásobných ředěních po 2 opakováních.

Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 67-100 % s celkovou průměrnou výtěžností 81 %.

## Očekávané hodnoty

Na přítomnost lidského MBL byl testován panel 40 vzorků (sérum a plazma) od náhodně vybraných zjevně zdravých dárců (mužů a žen). Naměřené hodnoty se mohou lišit v závislosti na použitém odběru vzorků.

–	Počet vzorků	Průměrná koncentrace (ng/ml)
Sérum	40	4696
EDTA plazma	37	1109
Citrátová plazma	40	1314
Heparinová plazma	40	3427

## Přehled přípravy reagensů

### Promývací pufr (1x)

Přidejte koncentrát promývacího pufru 20x (50 ml) do 950 ml destilované vody.

Promývací pufr (1x) lze také připravit podle potřeby podle následující tabulky:

Počet proužků	Koncentrát promývacího pufru (20x)	Destilovaná voda (ml)
1-6	25	475
1-12	50	950

### Testovací pufr (1x)

Přidejte koncentrát testovacího pufru 20x (5 ml) do 95 ml destilované vody.

Testovací pufr (1x) lze také připravit podle potřeby podle následující tabulky:

Počet proužků	Koncentrát testovacího pufru (20x)	Destilovaná voda (ml)
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

### Konjugát HRP

1. Připravte roztok 1:100 konjugátu HRP v testovacím pufru (1x).
2. Roztok konjugátu HRP zředte v poměru 1:100 testovacím pufr (1x) v čisté plastové zkumavce podle následující tabulky:

Počet proužků	Konjugát HRP (ml)	Testovací pufr (1x) (ml)
1-6	0,06	5,94
1-12	0,12	11,88

### Standard lidského MBL

Rekonstituujte lyofilizovaný standard lidského MBL destilovanou vodou. (Objem pro rekonstituci je uveden na štítku lahvičky se standardem.)

### Souhrn protokolu testu

1. Předfďte vzorek testovacím pufr (1x) v poměru 1:100.
2. Určete počet potřebných proužků s mikrojamkami.

3. Standardní roztok na mikrotržiční destičce: Do standardních jamek A1 a A2 přidejte duplicitně 75 µl testovacího pufru (1x). Do standardních jamek B1/B2 - G1/G2 přidejte duplicitně 100 µl testovacího pufru (1x). Do prvních jamek napipetujte 75 µl rekonstituovaného standardu a vytvořte standardní ředění přenesením 50 µl z jamky do jamky. Z posledních jamek odstraňte 50 µl.  
Případně externí standardní ředění ve zkumavkách. Pipetujte 100 µl těchto standardních roztoků do proužků s mikrojamkami.
4. Do slepých jamek přidejte duplicitně 100 µl testovacího pufru (1x).
5. Do určených jamek pro vzorky přidejte duplicitně 50 µl testovacího pufru (1x).
6. Do určených jamek pro vzorky přidejte duplicitně 50 µl předředěného vzorku.
7. Zakryjte proužky s mikrojamkami a inkubujte při pokojové teplotě (18 °C až 25 °C) po dobu 2 hodin na třepačce mikrodestiček nastavené na 400 otáček za minutu.
8. Vyprázdněte a 4x promyjte proužky s mikrojamkami promývacím pufr (1x).
9. Příprava konjugátu HRP. Přidejte 100 µl připraveného konjugátu HRP do všech jamek.
10. Zakryjte proužky s mikrojamkami a inkubujte při pokojové teplotě (18 °C až 25 °C) po dobu 1 hodiny na třepačce mikrodestiček nastavené na 400 otáček za minutu.
11. Vyprázdněte a 4x promyjte proužky s mikrojamkami promývacím pufr (1x).
12. Do všech jamek napipetujte 100 µl substrátového roztoku TMB.
13. Inkubujte proužky s mikrojamkami při pokojové teplotě (18 °C až 25 °C) ve tmě bez třepání po dobu 15 minut.
14. Do všech jamek napipetujte 100 µl zastavovacího roztoku.
15. Vyprázdněte čtečku mikrojamek a změřte intenzitu barvy při 450 nm.

Poznámka: Protřepání je povinné. Pokud byly dodrženy pokyny v tomto protokolu a vzorky byly naředěny v poměru 1:200, pak je třeba koncentraci odečtenou ze standardní křivky vynásobit faktorem ředění (x 200).

## Zákaznická a technická podpora

Nejnovější informace o servisu a podpoře najdete na webu [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).

- Celosvětová kontaktní telefonní čísla
- Informace o podpoře produktu
  - Často kladené dotazy k produktu
  - Software, záplaty a aktualizace
  - Školení pro mnoho aplikací a přístrojů
- Objednávky a webová podpora
- Dokumentace k produktu
  - Uživatelské příručky, manuály a protokoly
  - Certifikáty analýzy
  - Bezpečnostní listy (SDS; známé také jako MSDS)

Poznámka: Pro získání bezpečnostních listů pro reagenty a chemikálie od jiných výrobců kontaktujte výrobce.

## Omezená záruka na výrobek

Společnost Life Technologies a/nebo její přidružené společnosti poskytují záruku na své produkty, jak je uvedeno ve Všeobecných podmínkách prodeje společnosti Life Technologies na [www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html](http://www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html). V případě jakýchkoli dotazů kontaktujte společnost Life Technologies na [www.thermofisher.com/support](http://www.thermofisher.com/support).



Historie revizí: Publ. č. MAN0028015

Revize	Datum	Popis
A.0 (30)	28. června 2022	Původní vydání.

Informace v této příručce se mohou změnit bez předchozího upozornění.

**ODMÍTNUTÍ ODPOVĚDNOSTI:** V ROZSAHU POVOLENÉM ZÁKONEM SPOLEČNOST THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. A/NEBO JEJÍ PŘIDRUŽENÉ SPOLEČNOSTI NENESOU ODPOVĚDNOST ZA ZVLÁŠTNÍ, NÁHODNÉ, NEPŘÍMÉ, SANKČNĚ NAHRAZOVANÉ, VÍCENÁSOBNÉ NEBO NÁSLEDNÉ ŠKODY V SOUVISLOSTI S TÍMTO DOKUMENTEM NEBO Z NĚJ VYPLÝVAJÍCÍ, VČETNĚ JEHO POUŽÍVÁNÍ.

Důležité licenční informace: Na tyto produkty se může vztahovat jedna nebo více licencí s omezeným použitím štítku. Používáním těchto produktů přijímáte podmínky všech platných licencí s omezeným použitím štítku.

©2022 Thermo Fisher Scientific Inc. Všechna práva vyhrazena. Všechny ochranné známky jsou majetkem společnosti Thermo Fisher Scientific a jejích dceřiných společností, pokud není uvedeno jinak. Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků.