

## PRODUCT INFORMATION

# LweI (SfaNI)

#ER1622 500 U

Lot: \_\_\_\_\_ Expiry Date: \_\_

5'...G C A T C (N)<sub>5</sub>↓...3'

3'...C G T A G (N)<sub>9</sub>↑...5'

Concentration: 10 U/μL

Source: *E.coli* that carries the cloned *lweI*R gene from *Listeria welshimeri* RFL131

Supplied with: 1 mL of 10X Buffer Tango

Store at -20°C



BSA included

[www.thermoscientific.com/onebio](http://www.thermoscientific.com/onebio)

## RECOMMENDATIONS

**1X Thermo Scientific Tango Buffer** (for 100% LweI digestion)

33 mM Tris-acetate (pH 7.9), 10 mM magnesium acetate, 66 mM potassium acetate, 0.1 mg/mL BSA.

### Incubation temperature

37°C.

### Unit Definition

One unit is defined as the amount of LweI required to digest 1 μg of lambda DNA in 1 hour at 37°C in 50 μL of recommended reaction buffer.

### Dilution

Dilute with Dilution Buffer (#B19): 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA and 50% glycerol.

### Double Digests

Tango™ Buffer provided simplifies buffer selection for double digests. 98% of Thermo Scientific restriction enzymes are active in a 1X or 2X concentration of Tango Buffer. Please go to [www.thermoscientific.com/doubledigest](http://www.thermoscientific.com/doubledigest) to choose the best buffer for your experiments.

### Storage Buffer

LweI is supplied in: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25°C), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA and 50% glycerol.

## Recommended Protocol for Digestion

- Add:

nuclease-free water	16 $\mu$ L
10X Buffer Tango	2 $\mu$ L
DNA (0.5-1 $\mu$ g/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Lwel	0.5-2 $\mu$ L
- Mix gently and spin down for a few seconds.
- Incubate at 37°C for 1-2 hours.

The digestion reaction may be scaled either up or down.

## Recommended Protocol for Digestion of PCR Products Directly after Amplification

- Add:

PCR reaction mixture	10 $\mu$ L (~0.1-0.5 $\mu$ g of DNA)
nuclease-free water	18 $\mu$ L
10X Buffer Tango	2 $\mu$ L
Lwel	1-2 $\mu$ L
- Mix gently and spin down for a few seconds.
- Incubate at 37°C for 1-16 hours.

## Thermal Inactivation

Lwel is inactivated by incubation at 65°C for 20 min.

## ENZYME PROPERTIES

### Enzyme Activity in Thermo Scientific REase Buffers, %

B	G	O	R	Tango	2X Tango
0-20	0-20	0-20	20-50	100	20-50

### Methylation Effects on Digestion

Dam: never overlaps – no effect.  
Dcm: never overlaps – no effect.  
CpG: may overlap – cleavage impaired.  
EcoKI: never overlaps – no effect.  
EcoBI: may overlap – effect not determined.

### Stability during Prolonged Incubation

A minimum of 0.2 units of the enzyme is required for complete digestion of 1  $\mu$ g of lambda DNA in 16 hours at 37°C.

### Number of Recognition Sites in DNA

$\lambda$	$\Phi$ X174	pBR322	pUC57	pUC18/19	pTZ19R/U	M13mp18/19
169	12	22	9	8	4	7

### Note

- At least two copies of Lwel recognition site are required for efficient cleavage.
- Lwel may remain associated with the cleaved DNA. This may cause DNA band shifting during electrophoresis. To avoid atypical DNA band patterns, use the 6X DNA Loading Dye&SDS Solution (#R1151) for sample preparation or heat the digested DNA in the presence of SDS prior to electrophoresis.

For **CERTIFICATE OF ANALYSIS** see back page

# CERTIFICATE OF ANALYSIS

## Overdigestion Assay

No detectable change in the specific fragmentation pattern is observed after a 160-fold overdigestion with Lwel (10 U/ $\mu$ g lambda DNA x 16 hours).

## Ligation and Recleavage (L/R) Assay

The ligation and recleavage assay was replaced with LO test after validating experiments showed LO test ability to trace nuclease and phosphatase activities with sensitivity that is higher than L/R by a factor of 100.

## Labeled Oligonucleotide (LO) Assay

No detectable degradation of single-stranded or double-stranded labeled oligonucleotides occurred during incubation with 10 units of Lwel for 4 hours.

Quality authorized by:



Jurgita Zilinskiene

## **PRODUCT USE LIMITATION**

This product is developed, designed and sold exclusively *for research purposes and in vitro use only*. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals.

Please refer to [www.thermoscientific.com/onebio](http://www.thermoscientific.com/onebio) for Material Safety Data Sheet of the product.

© 2012 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

**ER1621 Lwel (SfaNI)**  
**Packaging Lot: 2808217**  
 Expiry Date: 31.10.2025 (DD.MM.YYYY)  
 Storage: at -20±5°C

### Filling lots for components in package:

Lot	Quantity	Description
2808217	0.1 kU	Lwel (SfaNI)
2782304	1 mL	10x Buffer Tango

### QUALITY CONTROL

Parameter	Method	Requirement	Result
Concentration	One unit is defined as the amount of enzyme required to digest 1 µg of lambda DNA in 1 hour at 37 °C in 50 µL of the assay buffer.	10 - 12 U/µL	Conforms
Endo-exodeoxyribonucleases and phosphatases	Incubation of single stranded and double stranded labeled oligonucleotides with appropriate amount of enzyme for 4 hour at 37 °C in assay buffer.	Not detectable	Conforms
Star Activity	After 160-fold overdigestion (10 U/µg lambda DNA for 16 hours at 37 °C in assay buffer) with enzyme the fragmentation pattern is analysed. No detectable changes compared to the theoretical fragmentation pattern are considered as absence of star activity.	Not detectable	Conforms

#### ISO CERTIFICATION

Manufactured by Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, in compliance with ISO 9001 and ISO 13485 certified quality management system.

Quality authorized by QC: **J. Žilinskienė**



## Capillary Array 50cm 3500 Dx

**REF**

4404684

**SN**

L512JA309



2013-10-05

TEST	SPECIFICATION	RESULT
<b>Capillary Leak Test</b> Each array is tested to assure absence of leaks.		
Leak Test	No Leaks	PASS
<b>Capillary Plug Test</b> Each array is tested to assure absence of plugged capillaries.		
Plug Test	No Plugged Capillaries	PASS
<b>Fluorescence Background Test</b> Each array is tested to assure background fluorescence is within specification.		
Fluorescence Background Test	Conforms to Specification	PASS
<b>Capillary Mapping Test</b> Each array is tested to verify that capillary inlet and outlet spatial positioning correspond.		
Mapping Test	Conforms to Specification	PASS

*When used with the 3500 Dx series systems, this device meets the requirements of Directive 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Devices and complies with QSR 21CFR820.*

**ISO13485:2003  
 REGISTERED**

Singapore



Quality Assurance Manager



Life Technologies Holdings Pte Ltd, Block 33, Marsiling Industrial Estate Road 3, #07-06,  
 Singapore 739256 Tel: (65) 6362 9300

For more information go to [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com) or email us at [cofarequest@lifetech.com](mailto:cofarequest@lifetech.com).

# 3500 Dx and 3500xL Dx Genetic Analyzers

Flexibility for clinical research applications with the Research Use Only (RUO) Mode

## Key features supporting RUO applications

- Advanced thermal system design improves temperature control for demanding DNA fragment analysis applications
- Superior signal uniformity in fragment sizing applications from instrument to instrument, run to run, and capillary to capillary
- Exceptional application flexibility—one array and one polymer are used for most applications
- No consumable-based instrument hard stops, giving you control of how much and how long consumables are utilized

## 3500 Dx Series system specifications for RUO applications

Applied Biosystems™ 3500 Dx and 3500xL Dx Genetic Analyzers can perform a number of sequencing and high-resolution fragment sizing applications for research use, including but not limited to STR/microsatellite analysis, loss of heterozygosity (LOH), and SNP confirmation and screening, as well as *de novo* sequencing and resequencing (mutation profiling).

A full range of applications may be run using a single polymer (Applied Biosystems™ POP-7™ Polymer) and the 50 cm capillary array. For even greater application versatility, Applied Biosystems™ POP-4™ and POP-6™ Polymers and the 36 cm capillary array are also available.

## Secondary analysis software for RUO applications

- Applied Biosystems™ Sequencing Analysis Software with KB™ Basecaller for sequence basecalling, editing, re-basecalling, reporting, and printing
- Applied Biosystems™ Variant Reporter™ Software for mutation detection, SNP discovery, comparative sequencing, resequencing, validation, and sequence confirmation
- Applied Biosystems™ SeqScape™ Software for resequencing applications with library identification
- Applied Biosystems™ GeneMapper™ Software for microsatellite, LOH, SNP, and t-RFLP analyses
- Applied Biosystems™ GeneMapper™ ID-X Software for analysis of human identification data using AmpF $\ell$ STR™ kits
- Applied Biosystems™ MicroSEQ™ ID Analysis Software for microbial sequence typing using MicroSEQ™ kits

Product	Cat. No.
Anode Buffer Container, CE-IVD	4393925
Capillary Array, 8-capillary, 36 cm, CE-IVD	4404682
Capillary Array, 24-capillary, 36 cm, CE-IVD	4404686
Capillary Array, 8-capillary, 50 cm, CE-IVD	4404684
Capillary Array, 24-capillary, 50 cm, CE-IVD	4404688
Cathode Buffer Container, CE-IVD	4408258
Conditioning Reagent, CE-IVD	4409543
POP-6 Polymer (960 samples), CE-IVD	4393711
POP-6 Polymer (384 samples), CE-IVD	4393716
POP-7 Polymer (960 samples), CE-IVD	4393713
POP-7 Polymer (384 samples), CE-IVD	4393709
POP-4 Polymer (960 samples)	4393710
POP-4 Polymer (384 samples)	4393715
Hi-Di Formamide (4 x 5 mL), CE-IVD	4404307
BigDye Terminator Sequencing Standard v1.1, CE-IVD	4462113
BigDye Terminator Sequencing Standard v3.1, CE-IVD	4404310
BigDye Terminator v3.1 Matrix Standards Kit, 3500/3500xL	4336974
BigDye Terminator v1.1 Matrix Standards Kit, 31xx and 3500	4336824
DS-33 Matrix Standard Kit (5-dye), CE-IVD	A25775
DS-33 GeneScan Install Standards, CE-IVD	A25793
DS-02 Matrix Standard Kit (5-dye, E5 dye set)	4323014
DS-32 Matrix Standard Kit (4-dye)	4345831
DS-36 Matrix Standard Kit (6-dye)	4425042
GeneScan 120 LIZ Size Standard	4322362
GeneScan 500 ROX Size Standard	401734
GeneScan 600 LIZ Size Standard v2.0, CE-IVD	A25794
GeneScan 1200 LIZ Size Standard	4379950



Table 1. Sequencing modules for RUO applications.

Run modules	Throughput <sup>1</sup>			Configuration		Performance		
	Average run time (minutes)	Average throughput, 3500xL Dx (samples/day)	Average throughput, 3500 Dx (samples/day)	Array separation distance (cm)	Polymer type	Resolution range in ≥90% of samples	Bases collected in 90% of samples	QV20 CRL <sup>2</sup> in ≥90% of samples
ShortReadSeq50_POP7 <sup>3</sup>	≤30	≥1,104	≥368	50	POP-7	40–400	≥325	≥300
RapidSeq50_POP7	≤40	≥840	≥280	50	POP-7	40–550	≥600	≥500
FastSeq50_POP7	≤65	≥504	≥168	50	POP-7	40–600	≥750	≥700
StdSeq50_POP7	≤125	≥264	≥88	50	POP-7	40–700	≥1,000	≥850
BDxShortReadSeq50_POP7	≤30	≥1,104	≥368	50	POP-7	40–400	≥325	≥300
BDxRapidSeq50_POP7	≤40	≥840	≥280	50	POP-7	40–550	≥600	≥500
BDxFastSeq50_POP7	≤65	≥504	≥168	50	POP-7	40–600	≥750	≥700
BDxStdSeq50_POP7	≤125	≥264	≥88	50	POP-7	40–700	≥1,000	≥850
RapidSeq50_POP6	≤65	≥504	≥168	50	POP-6	20–500	≥450	≥450
FastSeq50_POP6	≤90	≥368	≥122	50	POP-6	20–550	≥600	≥600
StdSeq50_POP6	≤135	≥240	≥80	50	POP-6	20–600	≥700	≥600
BDxRapidSeq50_POP6	≤65	≥504	≥168	50	POP-6	20–500	≥450	≥450
BDxFastSeq50_POP6	≤90	≥368	≥122	50	POP-6	20–550	≥600	≥600
BDxStdSeq50_POP6	≤140	≥240	≥80	50	POP-6	20–600	≥700	≥600
MicroSEQ ID 50_POP6	≤135	≥240	≥80	50	POP-6	20–600	≥700	≥600
FastMicroSEQ ID 50_POP6	≤105	≥312	≥104	50	POP-6	20–500	≥450	≥425

The specifications are reported using the BigDye Terminator v3.1 Sequencing Standard. BDx classified run modules are optimized with the 3500 Dx Series systems to obtain more usable data when sequencing reactions are purified using the BigDye XTerminator Purification Kit.

- Throughput (samples/day) is determined by the total number of samples that can be run in 23 hours (allows time for sample preparation, instrument maintenance, and warm-up).
- QV20 CRL is defined as the longest uninterrupted segment of bases with an average of QV ≥20, calculated over a sliding window of 21 base pairs.
- The fast ShortReadSeq module collects 300 bp in 30 minutes for operations requiring short verification of sequence content (e.g., clone QC verification).

Table 2. Fragment analysis modules for RUO applications.

Module name	Throughput <sup>1</sup>			Configuration		Performance							
	Average run time (minutes)	Average throughput, 3500xL Dx (samples/day)	Average throughput, 3500 Dx (samples/day)	Array length (cm)	Polymer type	General		Sizing precision <sup>3</sup> of 100% of alleles in ≥90% of samples			Multirun sizing <sup>4</sup> of 100% of alleles in ≥90% of samples		
						Resolution range <sup>2</sup> in ≥90% of samples	Largest fragment collected in ≥90% of samples	50–400 bp	401–600 bp	601–1,200 bp	50–400 bp	401–600 bp	601–1,200 bp
FragmentAnalysis36_POP7	≤30	≥1,104	≥368	36	POP-7	60–400	>420	<0.15	NA	NA	<1 bp	NA	NA
Fragment Analysis36_POP4	≤35	≥936	≥312	36	POP-4	60–400	>420	<0.15	NA	NA	<1 bp	NA	NA
FragAnalysis50_POP7	40	≥840	≥280	50	POP-7	40–520	≥600	<0.15	<0.30	NA	<1 bp	<2 bp	NA
FragAnalysis50_POP6	100	≥336	≥112	50	POP-6	20–550	≥600	<0.15	<0.30	NA	<1 bp	<2 bp	NA
LongFragAnalysis50_POP7	125	≥264	≥88	50	POP-7	40–700	≥1,200	<0.15	<0.30	<0.45	<1 bp	<2 bp	<3 bp
HID36_POP4	35	≥936	≥312	36	POP-4	60–400	≥420	<0.15	NA	NA	<1 bp	NA	N/A
SNaPshot50_POP7	30	≥1,104	≥376	50	POP-7	40–120	≥120	<0.50	NA	NA	<1 bp	NA	NA

NA = specification not applicable for this parameter.

- Throughput (samples/day) is determined by the total number of samples that can be run in 23 hours (allows time for sample preparation, instrument maintenance, and warm-up).
- Resolution range is defined as the range of bases over which the peak spacing interval divided by the peak width at half peak height is greater than 1.
- Sizing precision is the standard deviation of sizes for a given allele size across all capillaries in the same run.
- Multirun sizing is a measure of the precision of the 3500 Series across multiple runs. For example, it would be expected that a 200 bp allele across 3 runs would have an average deviation of <1 bp in 90% of all samples.

Find out more at [thermofisher.com/3500dx](http://thermofisher.com/3500dx)

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

**A46113 PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix**  
**Packaging Lot: 2812318**  
 Expiry Date: 30.09.2025 (DD.MM.YYYY)  
 Storage: at -20±5°C in the dark  
 Note: **For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.**

### Filling lots for components in package:

Lot	Quantity	Description
2811448	50 mL	PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix
2803068	4 x 1.25 mL	40X Yellow Sample Buffer

### QUALITY CONTROL

Parameter	Method	Requirement	Result
Functional Test	The product is functionally tested by qPCR analysis. It must demonstrate functional performance using a target concentration of plasmid DNA.	Average Ct for the target concentration is between 20 and 23	Pass
dNTP Concentrations	Determined by analytical method.	Within range of target concentration	Pass
Mg <sup>2+</sup> Concentration	Determined by analytical method.	Within range of target concentration	Pass
K <sup>+</sup> Concentration	Determined by analytical method.	Within range of target concentration	Pass
RNase Activity	Determined by analytical method.	No detectable activity level	Pass
DNase Activity	Determined by analytical method.	No detectable activity level	Pass
E. coli DNA Level	Determined by analytical method.	No detectable level	Pass

#### ISO CERTIFICATION

Manufactured by Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, in compliance with ISO 9001 and ISO 13485 certified quality management system.

Quality authorized by QC: **J. Žilinskienė**





# PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix

Master mix with a two-dye tracking system for real-time PCR workflows

Catalog Numbers A46012, A46109, A46110, A46111, A46112, A46113

Pub. No. MAN0018826 Rev. B.0

**Note:** For safety and biohazard guidelines, see the “Safety” appendix in the *PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix User Guide* (Pub. No. MAN0018825). Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

This Quick Reference is intended as a benchtop reference for experienced users of PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix. For detailed instructions, supplemental procedures, and troubleshooting, refer to the *PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix User Guide* (Pub. No. MAN0018825).

## Guidelines

### Requirements for input DNA

Use 1–10 ng of cDNA or 10–100 ng of gDNA per reaction.

### Guidelines for PCR reactions

- Four replicates of each reaction are recommended.
- Reaction mixes can be prepared depending upon experimental requirements. Scale the components according to the number of reactions and include 10% overage.
- If using smaller reaction volumes, scale all components proportionally. Reaction volumes <10 µL are not recommended.
- The recommended final primer concentration for primers with a T<sub>m</sub> of 55°C is 400 nM.

### Guidelines for no-template control reactions

No-template control (NTC) reactions can be used to identify PCR contamination. NTC reactions contain all of the reaction components except for the sample.

## Methods

### Set up the plate document or plate file

Configure the plate document or plate file.

See the appropriate instrument user guide for detailed instructions.

### Prepare the reagents

- Thaw the master mix.
- Once the master mix is thawed, swirl it to mix thoroughly.
- Thaw the DNA samples and primers on ice, vortex to mix, then centrifuge briefly.
- Vortex the Yellow Sample Buffer prior to use.

### Prepare the PCR reactions

**Note:** The Yellow Sample Buffer is optional for the real-time PCR.

The Yellow Sample Buffer is supplied at a 40X concentration. It is added to the DNA template. The concentration of Yellow Sample Buffer in the final PCR must be 1X. It is recommended that the DNA template is 10–20% of the volume of the final PCR.

1. (Optional) Add the Yellow Sample Buffer (40X) to the amount of DNA that is used in the PCR.

Final reaction volume	Amount of Yellow Sample Buffer
20 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
10 $\mu$ L	0.25 $\mu$ L

The Yellow Sample Buffer is diluted to 1X in the final reaction. See the following tables.

2. (Optional) Vortex, then centrifuge the DNA and Yellow Sample Buffer.
3. Combine the master mix, the primers, and nuclease-free water according to the following tables.
4. Combine the master mix, the primers, and nuclease-free water with the DNA and Yellow Sample Buffer according to the following tables.

**Note:** If the Yellow Sample Buffer is not used, add nuclease-free water to achieve the total PCR volume.

**Table 1 20- $\mu$ L reaction**

Component	Stock concentration	Final concentration	Volume for 1 reaction (20- $\mu$ L reaction)	Volume for 4 reactions with 10% coverage (20- $\mu$ L reaction) <sup>[1]</sup>
<b>Yellow Sample Buffer and DNA (step 1)</b>				
DNA <sup>[2]</sup>	5 ng/ $\mu$ L	0.5 ng/ $\mu$ L	2 $\mu$ L <sup>[3]</sup>	8.8 $\mu$ L
Yellow Sample Buffer	40X	1X	0.5 $\mu$ L	2.2 $\mu$ L
<b>Master mix, primers, and nuclease-free water (step 3)</b>				
PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix	2X	1X	10 $\mu$ L	44.0 $\mu$ L
Forward and reverse primers <sup>[4]</sup>	8,000 nM	400 nM	1 $\mu$ L	4.4 $\mu$ L
Nuclease-free water	—	—	6.5 $\mu$ L	28.6 $\mu$ L
<b>Total PCR volume</b>	—	—	<b>20 <math>\mu</math>L</b>	<b>88 <math>\mu</math>L</b>

<sup>[1]</sup> 10% coverage is recommended for pipetting variations.

<sup>[2]</sup> Use 1–10ng of cDNA.

<sup>[3]</sup> Does not exceed 8.5  $\mu$ L.

<sup>[4]</sup> The final primer concentration can vary from 300–800 nM. A final concentration of 400 nM is recommended for primers with a T<sub>m</sub> of 55°C.

**Table 2 10- $\mu$ L reaction**

Component	Stock concentration	Final concentration	Volume for 1 reaction (10- $\mu$ L reaction)	Volume for 4 reactions with 10% coverage (10- $\mu$ L reaction) <sup>[1]</sup>
<b>Yellow Sample Buffer and DNA (step 1)</b>				
DNA <sup>[2]</sup>	5 ng/ $\mu$ L	0.5 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L <sup>[3]</sup>	4.4 $\mu$ L
Yellow Sample Buffer	40X	1X	0.25 $\mu$ L	1.1 $\mu$ L
<b>Master mix, primers, and nuclease-free water (step 3)</b>				
PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix	2X	1X	5 $\mu$ L	22.0 $\mu$ L
Forward and reverse primers <sup>[4]</sup>	8,000 nM	400 nM	0.5 $\mu$ L	2.2 $\mu$ L
Nuclease-free water	—	—	3.25 $\mu$ L	14.3 $\mu$ L
<b>Total PCR volume</b>	—	—	<b>10 <math>\mu</math>L</b>	<b>44 <math>\mu</math>L</b>

<sup>[1]</sup> 10% coverage is recommended for pipetting variations.

<sup>[2]</sup> Use 1–10ng of cDNA.

<sup>[3]</sup> Does not exceed 4.25  $\mu$ L.

<sup>[4]</sup> The final primer concentration can vary from 300–800 nM. A final concentration of 400 nM is recommended for primers with a T<sub>m</sub> of 55°C.

**IMPORTANT!** The reaction turns green due to the Yellow Sample Buffer added to the DNA and the inert blue dye in the master mix.

5. Mix the components thoroughly, then centrifuge briefly to collect the contents at the bottom of the tube.
6. Transfer the appropriate volume of each reaction to each well of an optical plate.
7. Seal the plate with an optical adhesive cover, then centrifuge briefly to collect the contents at the bottom of each well and eliminate any air bubbles.

PCR can be performed on the reaction plate up to 8 hours after completing the set-up, when stored at room temperature protected from light.

### Set up and run the real-time PCR instrument

1. Set up the thermal protocol according to one of the following tables.

**Note:** Standard cycling conditions are recommended for genomic DNA templates or long amplicons.

**Table 3 Fast cycling mode**

Step	Temperature	Duration	Cycles
Enzyme activation	95°C	2 minutes	1
Denature	95°C	5 seconds	40
Anneal/extend	60°C	30 seconds	

**Table 4 Standard cycling mode**

Step	Temperature	Duration	Cycles
Enzyme activation	95°C	2 minutes	1
Denature	95°C	15 seconds	40
Anneal/extend	60°C	60 seconds	

2. Set the instrument to perform a default dissociation step, according to one of the following tables.

**Table 5 Fast cycling mode**

Step	Ramp rate <sup>[1]</sup>	Temperature	Time
1	1.99°C/second	95°C	15 seconds
2	1.77°C/second	60°C	1 minute
3 (Dissociation)	0.075°C/second	95°C	15 seconds

<sup>[1]</sup> Use the default ramp rate for the StepOnePlus™ Instrument.

**Table 6 Standard cycling mode**

Step	Ramp rate <sup>[1]</sup>	Temperature	Time
1	1.6°C/second	95°C	15 seconds
2	1.6°C/second	60°C	1 minute
3 (Dissociation)	0.075°C/second	95°C	15 seconds

<sup>[1]</sup> Use the default ramp rate for the StepOnePlus™ Instrument.

**Note:** A dissociation step must be performed immediately after the real-time PCR run with PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix.

3. Set up the options.
  - Experiment type: Standard curve
  - Reagent: SYBR™ Green reagents
  - Reporter: SYBR™ Green
  - Quencher: None
  - Passive reference dye: ROX™ dye
  - Ramp speed: Standard or fast
  - Melt curve ramp increment (all instruments, except StepOnePlus™ instrument): Continuous

(StepOnePlus™ only): Step and hold

4. Set the reaction volume appropriate for the reaction plate.
5. Load the reaction plate into the real-time PCR instrument.
6. Start the run.

## Analyze the results

1. View the amplification plots.
2. Determine the baseline and threshold cycles ( $C_q$ ) for the amplification curves using the instrument software.
3. Check for nonspecific amplification using melt curves.
4. Perform relative or absolute quantitation.

Option	Description
Relative quantitation	The target is compared to an internal standard, using either the standard curve or comparative $C_q$ method.
Absolute quantitation	The $C_q$ of the unknown samples is compared against a standard curve with known copy numbers.



Thermo Fisher Scientific Baltics UAB | V.A. Graiciuno 8, LT-02241 | Vilnius, Lithuania

For descriptions of symbols on product labels or product documents, go to [thermofisher.com/symbols-definition](https://www.thermofisher.com/symbols-definition).

The information in this guide is subject to change without notice.

**DISCLAIMER:** TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

**Revision history:** Pub. No. MAN0018826

Revision	Date	Description
B.0	29 July 2022	The volumes for preparing the PCR reactions were corrected (Table 1 on page 2 and Table 2 on page 2).
A.0	30 January 2020	New document.

**Important Licensing Information:** This product may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of this product, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

©2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

# PowerTrack SYBR Green Master Mix



## Easy-to-use and flexible gene expression master mix for real-time PCR

Applied Biosystems™ PowerTrack™ SYBR Green Master Mix is a preformulated, optimized, universal 2X master mix for real-time PCR. Building on over 25 years of innovation and product excellence in qPCR, our PowerTrack SYBR Green Master Mix is designed for superior performance and ease of use with a two-color tracking dye system for the most common real-time PCR applications.

### Features include:

- Built-in two-color tracking dye system where pipetting has occurred
- Broad primer  $T_m$  and primer concentration compatibility allows flexibility in qPCR reaction setup with minimal optimization
- Superior specificity and tight reproducibility in  $C_t$  values over a broad dynamic range improve data quality
- Compatible with Invitrogen™ SuperScript™ IV VILO™ Master Mix reverse transcription for fast, reproducible results
- Formulated with UNG and dUTP to prevent contamination of downstream reactions by carryover PCR products
- Broad instrument compatibility

### Built-in visual indicator to aid in reaction setup

PowerTrack SYBR Green Master Mix is designed to provide ease in visualization of sample addition to the master mix. The master mix contains an inert blue dye and a separate, optional yellow sample buffer. The yellow sample buffer is added separately to indicate that sample has been added to the reaction, based on a visual color change of the reaction mix from blue to green. The benefit of using the tracking dye is to provide convenience via visualization of the color change chemistry and avoid errors that can occur due to pipetting mistakes. The yellow sample buffer is provided to aid in reaction setup for your own peace of mind but is not required to obtain superior results with PowerTrack SYBR Green Master Mix.

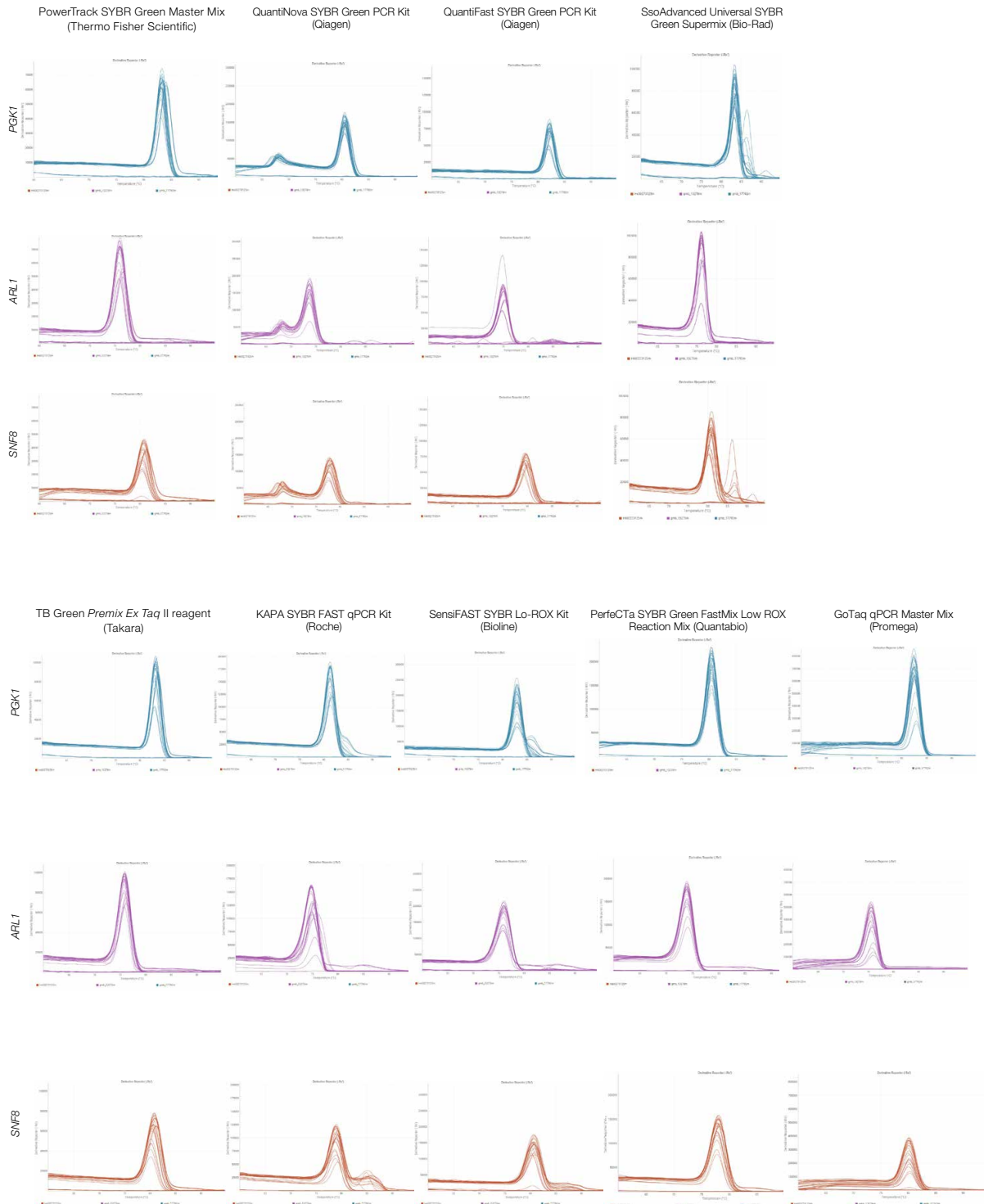
### Formulated for maximum specificity and reproducibility

PowerTrack SYBR Green Master Mix uses an antibody-mediated hot-start mechanism to provide tight control over *Taq* enzyme activation and help prevent early activity of the polymerase at low temperatures that can lead to nonspecific amplification.

## High specificity

In an evaluation of 24 different primer sets used with PowerTrack SYBR Green Master Mix, a single melt curve was obtained in 100% of reactions. In contrast, nonspecific amplification was observed for some of the same targets with several master mixes from other suppliers, as shown

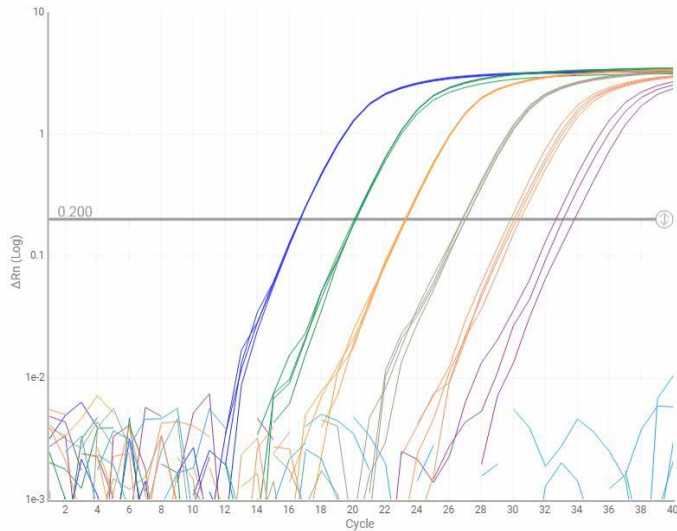
by multiple peaks in the melt curves (Figure 1). Verification of primer specificity in SYBR Green reactions is essential to data quality and validity [1]. The high specificity enabled by PowerTrack SYBR Green Master Mix allows you to spend less time optimizing and redesigning primers to get high-quality data.



**Figure 1. Target specificity.** Real-time PCR was performed using universal human reference (UHR) cDNA and primers targeting *PGK1* (phosphoglycerate kinase 1), *ARL1* (ADP-ribosylation factor-like protein 1), and *SNF8* (vacuolar-sorting protein). Reactions (10  $\mu$ L) were run in quadruplicate using the indicated master mixes on the Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System. Several master mixes from other suppliers show a second peak in the melt curve analysis attributed to amplification of nonspecific product.

## PowerTrack SYBR Green Master Mix powers through traditionally difficult targets

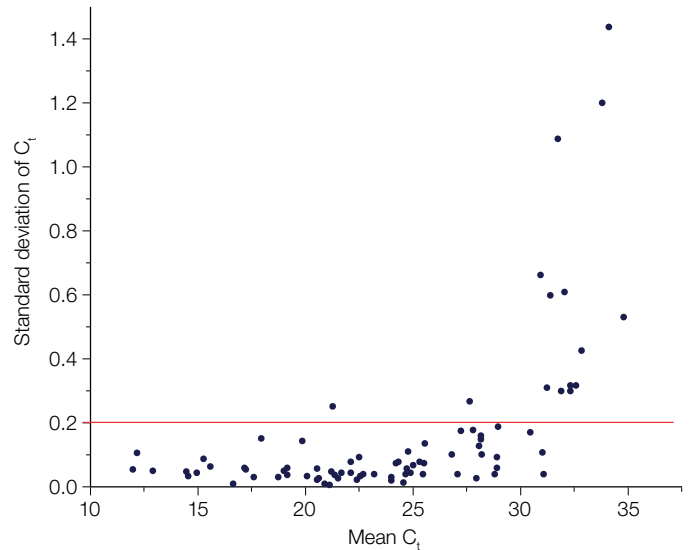
Amplification curves were obtained for *PGK1* over a 6-log dilution series of UHR cDNA. PowerTrack SYBR Green Master Mix delivers accurate results over a wide dynamic range of concentrations as shown by tight curves between replicates and superior PCR efficiency (Figure 2).\*



**Figure 2. Linear dynamic range.** PowerTrack SYBR Green Master Mix enables reliable results across a range of cDNA concentrations. Amplification curves were obtained for *PGK1* over a dilution series (10 ng to 100 fg and no template control (NTC)) of UHR cDNA. Reactions were run in quadruplicate on the QuantStudio 5 Real-Time PCR System using 60°C as the annealing  $T_m$  for primers.

## Excellent reproducibility

Reproducibility is another important measure of data quality in real-time PCR, and reproducibility is often affected at low template concentrations, where the effects of variability are exacerbated. However, PowerTrack SYBR Green Master Mix demonstrated excellent reproducibility over a wide dynamic range with a variety of targets and reverse transcription (RT) kits tested (Figure 3). Tighter reproducibility allows for greater statistical significance when analyzing low-abundance transcripts and smaller fold changes.



**Figure 3. Reproducibility of data.** PowerTrack SYBR Green Master Mix shows reproducibility over a wide dynamic range. Six assays (*PGK1*, *ARL1*, *SNF8*, *DF*, *GAPDH*, and *Corf1*) were run in quadruplicate with UHR cDNA generated from four different RT kits (SuperScript IV VILO Master Mix, Applied Biosystems™ High-Capacity RNA-to-cDNA Kit, iScript™ cDNA Synthesis Kit, and QuantiTect™ RT Kit) run with a 6-fold dilution series and 400 nM primer concentration. Assays were performed on the QuantStudio 5 Real-Time PCR System.

\* Besides the master mix, other assay conditions and reagent concentrations may affect dynamic range; individual results may vary.

## Broad instrument compatibility

PowerTrack SYBR Green Master Mix can be used in either standard or fast cycling mode and is compatible with all Applied Biosystems™ real-time PCR instruments. It is also compatible with the Bio-Rad CFX96™, CFX384™, and iQ™5 instruments, as well as the Roche LightCycler™ 480 and Agilent Mx3005P™ instruments.

## Why ROX dye matters

ROX™ dye is an inert reference dye used in RT-qPCR, often added to a master mix. It is effective in normalizing fluorescence across all samples. ROX dye removes fluorescence variations, such as those caused by bubbles in the reactions. Applied Biosystems™ master mixes contain a proprietary ROX dye, specifically formulated for a wide range of PCR instruments and for compatibility with a wide range of differing instrument light sources and filter sets. Most other manufacturers use a ROX dye that contains

only a single excitation peak. These manufacturers may require a ROX dye to be spiked into the reaction at a concentration appropriate to the instrument. Alternatively, they may require selection of either a “low ROX” or “high ROX” master mix, depending on the concentration.

## Heat-labile UNG for carryover contamination control

Contamination is a major concern in labs that routinely run PCR due to the potential for false-positive results. The inclusion of UNG and dUTP in the PowerTrack SYBR Green Master Mix allows any previously amplified PCR products to be degraded and helps prevent contamination of subsequent qPCR reactions.

## Reference

1. Bustin SA, Benes V, Garson JA et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611–622.

## Ordering information

Product	Quantity	Cat. No.
PowerTrack SYBR Green Master Mix, Mini Pack (1 mL)	100 reactions	A46012
PowerTrack SYBR Green Master Mix, 1-Pack (1 x 5 mL)	500 reactions	A46109
PowerTrack SYBR Green Master Mix, 2-Pack (2 x 5 mL)	1,000 reactions	A46110
PowerTrack SYBR Green Master Mix, 5-Pack (5 x 5 mL)	2,500 reactions	A46111
PowerTrack SYBR Green Master Mix, 10-Pack (10 x 5 mL)	5,000 reactions	A46112
PowerTrack SYBR Green Master Mix, Bulk Pack (1 x 50 mL)	5,000 reactions	A46113

Find out more at [thermofisher.com/sybr](https://thermofisher.com/sybr)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

**For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.** © 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. CFX96, CFX384, iQ, SsoAdvanced, and iScript are trademarks of Bio-Rad Laboratories. LightCycler is a trademark of Roche Diagnostics. PerfeCTa and FastMix are trademarks of Quantabio. GoTaq is a trademark of Promega Corporation. QuantiNova, QuantiFast, and QuantiTect are trademarks of Qiagen. Mx3005P is a trademark of Agilent Technologies. TB Green and *Premix Ex Taq* are trademarks of Takara. SensiFAST is a trademark of Bioline Reagents.

COL33396 0220





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ  
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 10 июля 2017 года № РЗН 2017/5961

На медицинское изделие

**Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора некроза опухолей-альфа в сыворотке крови (альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ) по ТУ 9398-558-23548172-2016**

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

**Акционерное общество "Вектор-Бест" (АО "Вектор-Бест"), Россия, 630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, Научно-производственная зона, корпус 36, комната 211**

Производитель

**Акционерное общество "Вектор-Бест" (АО "Вектор-Бест"), Россия, 630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, Научно-производственная зона, корпус 36, комната 211**

Место производства медицинского изделия  
**см. приложение**

Номер регистрационного досье № РД-11624/31010 от 02.06.2016

Вид медицинского изделия **335190**

Класс потенциального риска применения медицинского изделия **2б**

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности **21.10.60.196**

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 10 июля 2017 года № 6226  
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

**Руководитель Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения**



**М.А. Мурашко**

**0024979**

**ПРИЛОЖЕНИЕ**  
**К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ**  
**НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 10 июля 2017 года

№ РЗН 2017/5961

Лист 1

На медицинское изделие

**Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора некроза опухолей-альфа в сыворотке крови (альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ) по ТУ 9398-558-23548172-2016**

I. Состав:

- планшет разборный, готовый для использования - 1 шт.;
- калибровочные образцы, лиофилизированные - 6 флаконов;
- контрольный образец, лиофилизированный - 1 флакон;
- конъюгат № 1, готовый для использования - 1 флакон (13 мл);
- конъюгат № 2, готовый для использования - 1 флакон (13 мл);
- раствор для восстановления калибровочных и контрольного образцов (РВО) - 1 флакон (7,0 мл);
- раствор для разведения образцов (РРО) - 1 флакон (13 мл);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Тх25) - 2 флакона (по 28 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования - 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования - 1 флакон (12 мл).

II. Принадлежности:

- пленка для заклеивания планшета - 3 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика - 1 шт.;
- ванночка для реагента - 4 шт.;
- наконечники для дозатора на 2-200 мкл - 32 шт.

III. Место производства:

1. АО "Вектор-Бест", Россия, 630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, Научно-производственная зона, корпус 36.
2. АО "Вектор-Бест", Россия, 630117, г. Новосибирск, ул. Пасечная, д. 3.

*Z*

Руководитель Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения



М.А. Мурашко

0038270

**A-8756****альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ**

Набор реагентов

для иммуноферментного определения концентрации фактора некроза  
опухолей-альфа в сыворотке крови

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Утверждена 13.06.2017.

**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора некроза опухолей-альфа в сыворотке крови «альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для определения концентрации фактора некроза опухолей-альфа (альфа-ФНО) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Фактор некроза опухолей-альфа (альфа-ФНО) является провоспалительным цитокином и стимулирует в других клетках продукцию ИЛ-1 и ИЛ-6, адгезию, индукцию апоптоза, антителообразование В-клетками, продукцию колониеобразующих факторов эндотелиальными клетками и фибробластами, которые участвуют в процессе ангиогенеза, обладает общим цитотоксическим действием.

**1.3.** Количественное определение содержания альфа-ФНО в сыворотке крови может быть использовано для диагностики и мониторинга терапии ряда заболеваний, в том числе таких заболеваний как бактериальная пневмония, гепатиты, сепсис, паразитарные.

**1.4.** Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного, 6 калибровочных образцов, 1 контрольного образца, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

**2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА****2.1. Принцип метода**

Метод определения основан на «сэндвич»- варианте твердофазного иммуноферментного анализа с применением моно- и поликлональных антител к альфа-ФНО.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованными моноклональными антителами. Имеющийся в образцах альфа-ФНО связывается с иммобилизованными антителами. Связавшийся альфа-ФНО на второй стадии взаимодействует при инкубации с конъюгатом №1 (поликлональные антитела к альфа-ФНО человека с биотином). На третьей стадии связавшийся конъюгат №1 взаимодействует при инкубации с конъюгатом №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена).

Количество связавшегося конъюгата №2 определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна концентрации содержащегося в образце альфа-ФНО.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация альфа-ФНО в анализируемых образцах.

**2.2. Состав набора**

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилучных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к альфа-ФНО, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества альфа-ФНО – 0; 5; 15; 40; 100; 250 пг/мл; аттестованные относительно WHO International Standard TUMOUR NECROSIS FACTOR ALPHA NIBSC code: 88/786; концентрации альфа-ФНО в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, лиофилизированные – 6 флаконов;
- контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека с известным содержанием альфа-ФНО, аттестованный относительно WHO International Standard TUMOUR NECROSIS FACTOR ALPHA NIBSC code: 88/786; лиофилизированный – 1 флакон;
- конъюгат №1 (биотинилированные поликлональные антитела к альфа-ФНО), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- конъюгат №2 (стрептавидин-пероксидаза хрена), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- раствор для восстановления калибровочных и контрольного образцов (РВО) – 1 флакон (7,0 мл);
- раствор для разведения образцов (РРО) – 1 флакон (13 мл);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 флакона (по 28 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Принадлежности:

- пленка для заклеивания планшета – 3 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночка для реагента – 4 шт.;

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**3.1. Специфичность.** Не обнаружено перекрестной реакции используемых в наборе антител к альфа-ФНО со следующими цитокинами: ИЛ-1бета, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-18, гамма-ИНФ, альфа-ИНФ.

**3.2.\* Воспроизводимость.** Коэффициент вариации результатов определения концентрации альфа-ФНО в лунках, содержащих контрольный образец, не превышает 8%.

**3.3.\* Линейность.** Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчетной величины концентрации альфа-ФНО при разведении калибровочных образцов, содержащих 250; 100; 40 пг/мл, в 2 раза и калибровочного образца, содержащего 15 пг/мл, в 3 раза. Процент «линейности» составляет 90–110%.

**3.4.\* Точность.** Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации альфа-ФНО предписанной в образце, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 15 пг/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

**3.5.\* Чувствительность.** Минимально определяемая концентрация альфа-ФНО, рассчитанная на основании среднего арифметического значения из десяти измерений оптической плотности калибровочного образца  $B_0$  (0 пг/мл) плюс  $2\sigma$  ( $\sigma$  – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения), не превышает 1,0 пг/мл.

**3.6. Клиническая проверка.** Концентрацию альфа-ФНО измеряли в сыворотке крови, взятой у 185 здоровых мужчин и женщин в возрасте 20–50 лет. Уровень альфа-ФНО не превышал 6 пг/мл.

**3.7.** Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации альфа-ФНО, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**4.1.** Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 №4н).

**4.2.** Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

**4.3.** При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаниях МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998.

**4.4.** При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

**4.5.** Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

**4.6.** Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

**4.7.** Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор ( $H_2O_2$ , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

**4.8.** При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

### 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре  $37\pm 1^\circ C$  и 600–800 об/мин;
- промывочное устройство для планшетов;
- таймер;
- холодильник бытовой;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками

- ками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- дозатор полуавтоматический многоканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкостей от 5 до 350 мкл;
  - цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
  - вода дистиллированная;
  - перчатки медицинские диагностические одноразовые;
  - бумага фильтровальная лабораторная;
  - дезинфицирующий раствор.

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

**6.1.** Для проведения анализа использовать сыворотку крови.

**6.2.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови.

**6.3.** Для проведения анализа возможно использование образцов сыворотки крови как свежеприготовленных, так и хранившихся при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 месяцев или до 12 месяцев при температуре не выше минус 40°C. Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки крови не допускается. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

**6.4.** Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10–15 мин при температуре от 18 до 25°C.

## 7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

**7.1.** Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сывороток крови следует выдержать при температуре от 18 до 25°C в течение времени не менее 30 мин.

### 7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка, установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с осушителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

*Хранение: при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.*

### 7.3. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

*Хранение: при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.*

### 7.4. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца

В каждый флакон с калибровочными образцами и контрольным образцом внести по 0,7 мл раствора для восстановления калибровочных и контрольного образцов (РВО). Выдержать при температуре от 18 до 25°C в течение 10 мин. Тщательно перемешать, избегая образования пены.

*Хранение: в плотно закрытых флаконах при температуре минус 20°C и ниже – в течение всего срока годности набора. Допускается шестикратное замораживание и размораживание образцов. После размораживания образцы тщательно перемешать, избегая образования пены.*

### 7.5. Подготовка конъюгата №1

*Конъюгат №1 готов к использованию.*

Необходимое количество конъюгата №1 отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА конъюгат №1 утилизировать (**не сливать во флакон с исходным конъюгатом**).

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

*Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.*

### 7.6. Подготовка конъюгата №2

*Конъюгат №2 готов к использованию.*

Необходимое количество конъюгата №2 отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА конъюгат №2 утилизировать (**не сливать во флакон с исходным конъюгатом**).

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

*Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.*

### 7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс

*Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) готов к использованию.*

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор ТМБ плюс утилизировать (*не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс*).

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина плюс.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

*Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.*

**Внимание!** Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

**7.8. Стоп-реагент готов к использованию.**

*Хранение: после вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.*

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

**8.1.** Внести во все лунки по 100 мкл раствора для разведения образцов (РРО).

**8.2.** Внести в соответствующие лунки в дуб-лях по 100 мкл каждого калибровочного образца и по 100 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 100 мкл анализируемых образцов сывороток крови.

*Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15 мин.*

**8.3.** Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 120 мин при встряхивании на шейкере при температуре  $37\pm 1^\circ\text{C}$  и 700 об/мин.

**8.4.** По окончании инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (см п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 350 мкл промывочного раствора в процессе промывки каждого стрипа. *Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.* Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

**8.5.** Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата №1.

*Для внесения конъюгата №1 использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

**8.6.** Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре  $37\pm 1^\circ\text{C}$  и 700 об/мин.

**8.7.** По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз, как указано в п. 8.4.

**8.8.** Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата №2.

*Для внесения конъюгата №2 использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

**8.9.** Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре  $37\pm 1^\circ\text{C}$  и 700 об/мин.

**8.10.** По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз промывочным раствором так, как это указано в п. 8.4.

**8.11.** Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс и инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25°C.

*Для внесения раствора тетраметилбензидина плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

**8.12.** Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

**8.13.** Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

## 9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

**9.1.** Вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольный и анализируемые образцы.

**9.2.** Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации альфа-ФНО в калибровочных образцах (нг/мл).

**9.3.** Определить концентрацию альфа-ФНО в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

**9.4.** Если концентрация альфа-ФНО в анализируемых образцах превышает 250 пг/мл, образец следует дополнительно развести раствором для разведения образцов в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения образцов), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

**9.5.** Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации альфа-ФНО в контрольном образце соответствует указанному диапазону концентраций на этикетке флакона.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации альфа-ФНО в сыворотке крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

## **10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА**

**10.1.** Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток.

**10.2.** Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

**10.3.** Срок годности набора – 18 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

**10.4.** Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- конъюгат №1, конъюгат №2, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для восстановления калибровочных и контрольного образцов, раствор для разведения образцов, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- приготовленные калибровочные образцы и контрольный образец хранить в плотно закрытых флаконах при температуре минус 20°C и ниже – в течение всего срока годности набора. Допускается шестикратное замораживание и оттаивание образцов;
- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.

**10.5.** Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации альфа-ФНО в контрольном образце.

**10.6.** Для представления результатов измерений концентрации альфа-ФНО в МЕ/мл, следует использовать коэффициент пересчета 0,05 (альфа-ФНО (МЕ/мл) = 0,05 альфа-ФНО (пг/мл)).

**10.7.** При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (раствор ТМБ плюс, ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

**10.8.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

## **11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА**

**11.1.** Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

**11.2.** Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

**11.3.** Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

**По вопросам, касающимся качества набора  
«альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ»,  
следует обращаться в АО «Вектор-Бест»  
по адресу:**

630559, Новосибирская область,  
р.п. Кольцово, а/я 121,  
тел. (383) 363-20-60, 227-67-64,  
тел./факс (383) 363-35-55.  
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ**

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

### **1. Обеспечение получения правильных результатов анализа**

**Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:**

- не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;
- ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;
- избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;
- рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);
- никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;
- перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протереть конус дозатора (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение конъюгата может привести к контаминации всего содержимого флакона;
- используйте только одноразовые наконечники для дозаторов;
- не обрабатывайте дезинфицирующими растворами и моющими средствами посуду (ванночки), используемую для работы с конъюгатом и раствором ТМБ;
- в случае повторного использования посуды (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой;
- если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, внести в нее новый образец; такая лунка бракуется.

**Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:**

- Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.
- Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.
- Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.
- Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.
- Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

### **2. Условия правильности работы набора**

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

- соотношение оптических плотностей калибровочных образцов альфа-ФНО:  $ОП_0 < ОП_5 < ОП_{15} < ОП_{40} < ОП_{100} < ОП_{250}$ ;
  - $ОП_{250} \geq 1,0$  ед. опт. плотн. (о.е.);
  - вычисленное по калибровочному графику значение концентрации альфа-ФНО в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.
- $ОП_0, ОП_5, ОП_{15}, ОП_{40}, ОП_{100}$  и  $ОП_{250}$  – среднее значение оптической плотности калибровочных образцов 0, 5, 15, 40, 100 и 250 пг/мл соответственно.

### **3. Расчет результатов анализа**

По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности (ОП) в лунках с анализируемыми образцами.

Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации альфа-ФНО (ось абсцисс) в калибровочных образцах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

Для определения концентрации альфа-ФНО в анализируемых пробах на оси ординат отмечают зна-



чение оптической плотности анализируемого образца. Проводят прямую до пересечения с калибровочной кривой, от полученной точки пересечения опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Точка пересечения и является искомым значением концентрации альфа-ФНО в образце.

Результаты, полученные для образцов, разведенных предварительно в 20 раз, умножаются на 20 (п. 9.4.).

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

Уровни спонтанной и ФГА индуцированной продукции цитокинов клетками цельной крови и в сыворотке условно здоровых доноров (N=68) приведены в таблице 2.

#### 4. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ»

*Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!*

- Внести:** по 100 мкл РРО;  
по 100 мкл калибровочных и контрольного образцов в дублях;  
по 100 мкл анализируемых образцов в дублях.
- Инкубировать:** 120 мин, 700 об/мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором,  
350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата №1.
- Инкубировать:** 60 мин, 700 об/мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором,  
350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата №2.
- Инкубировать:** 30 мин, 700 об/мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором,  
350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

#### 5. Графические символы

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до ...		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 227-75-47.

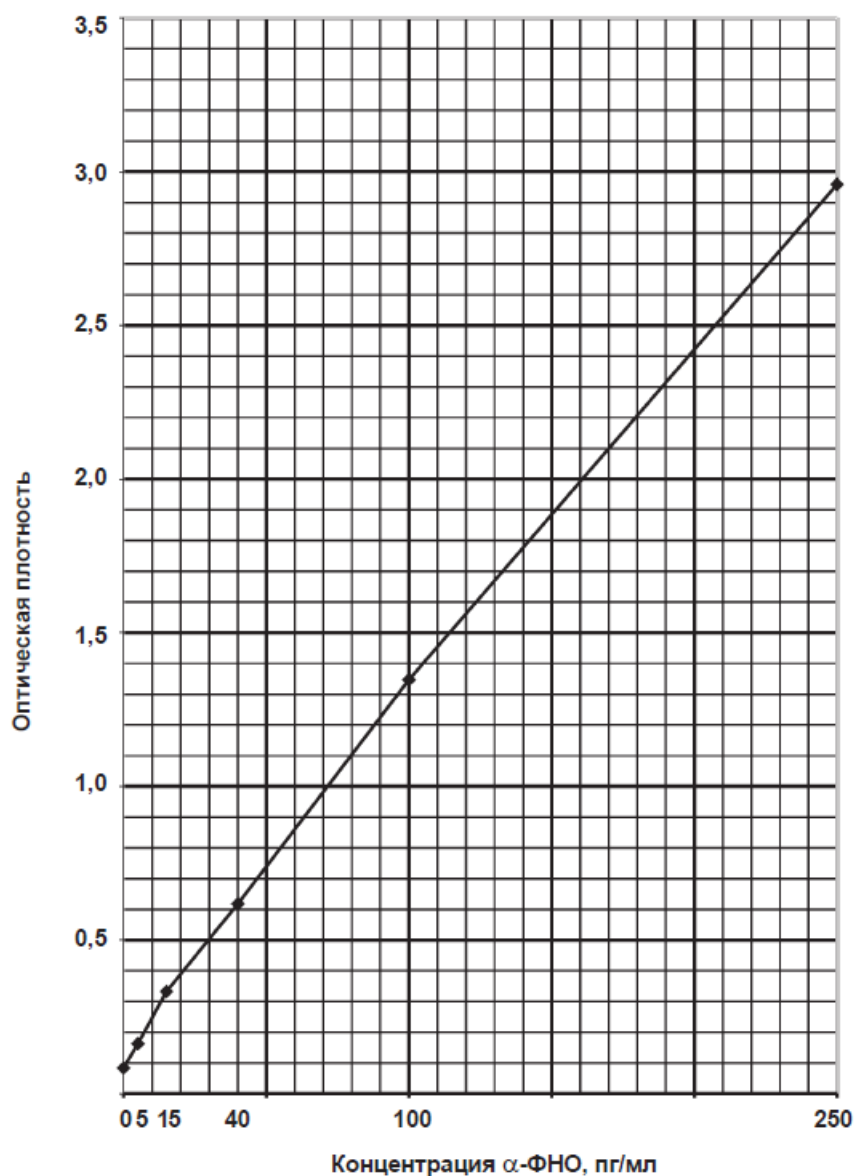


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации альфа-ФНО в калибровочных образцах.

\* по ГОСТ Р 51352-2013.

Таблица 1

Расход компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат №1, мл	Конъюгат №2, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистил. вода, мл			
2	4,0	до 100	2,0	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0	12,0

Таблица 2

Уровни спонтанной и ФГА индуцированной продукции цитокинов клетками цельной крови и в сыворотке условно здоровых доноров (N = 68).

Цитокины	Спонтанная		ФГА индуцированная		Сыворотки	
	среднее пг/мл	диапазон пг/мл	среднее пг/мл	диапазон пг/мл	среднее пг/мл	диапазон пг/мл
ИНФ-α	1	0–6	3	0–13	0	0–5
ИЛ-4	0	0–2,4	0,24	0–24	0,2	0–4
ИНФ-γ	4	0–14	1200	165–7450	2	0–15
ИЛ-1β	50	0–107	440	50–1200	1,6	0–11
ИЛ-18	50	23–115	50	12–120	370	104–650
ИЛ-6	12	0–90	8500	100–30700	2	0–10
ФНО-α	5	1–42	1150	391–2700	0,5	0–6
ИЛ-8	2200	24–4380	16900	550–82000	2	0–10
ИЛ-10	6	0–50	40	7–130	5	0–31
ИЛ-2	0,3	0–10	155	25–590	0	0–10

FOR RESEARCH USE ONLY  
NOT FOR USE IN CLINICAL DIAGNOSTIC PROCEDURES

12th Edition

## **[ INTENDED USE ]**

The kit is a sandwich enzyme immunoassay for in vitro quantitative measurement of GFAP in human serum, plasma, tissue homogenates, cell lysates, cell culture supernates and other biological fluids.

## **[ REAGENTS AND MATERIALS PROVIDED ]**

Reagents	Quantity	Reagents	Quantity
Pre-coated, ready to use 96-well strip plate	1	Plate sealer for 96 wells	4
Standard	2	Standard Diluent	1×20mL
Detection Reagent A	1×120μL	Assay Diluent A	1×12mL
Detection Reagent B	1×120μL	Assay Diluent B	1×12mL
TMB Substrate	1×9mL	Stop Solution	1×6mL
Wash Buffer (30 × concentrate)	1×20mL	Instruction manual	1

## **[ MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED ]**

1. Microplate reader with 450 ± 10nm filter.
2. Single or multi-channel pipettes with high precision and disposable tips.
3. Microcentrifuge Tubes.
4. Deionized or distilled water.
5. Absorbent paper for blotting the microplate.
6. Container for Wash Solution.
7. 0.01mol/L (or 1×) Phosphate Buffered Saline(PBS), pH7.0-7.2.

## **[ STORAGE OF THE KITS ]**

1. **For unused kit:** All the reagents should be kept according to the labels on vials. The **Standard, Detection Reagent A, Detection Reagent B** and the **96-well strip plate** should be stored at -20°C upon receipt while the others should be at 4°C.
2. **For used kit:** When the kit is used, the remaining reagents need to be stored according to the above storage condition. Besides, please return the unused wells to the foil pouch containing the desiccant pack, and zip-seal the foil pouch.

### **Note:**

It is highly recommended to use the remaining reagents within 1 month provided this is prior to the expiration date of the kit. For the expiration date of the kit, please refer to the label on the kit box. All components are stable up to the expiration date.



## [ **SAMPLE COLLECTION AND STORAGE** ]

**Serum** - Use a serum separator tube and allow samples to clot for two hours at room temperature or overnight at 4°C before centrifugation for 20 minutes at approximately 1,000×g. Assay freshly prepared serum immediately or store samples in aliquot at -20°C or -80°C for later use. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

**Plasma** - Collect plasma using EDTA or heparin as an anticoagulant. Centrifuge samples for 15 minutes at 1,000×g at 2-8°C within 30 minutes of collection. Remove plasma and assay immediately or store samples in aliquot at -20°C or -80°C for later use. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

**Tissue homogenates** - The preparation of tissue homogenates will vary depending upon tissue type.

1. Tissues were rinsed in ice-cold PBS to remove excess blood thoroughly and weighed before homogenization.
2. Minced the tissues to small pieces and homogenized them in fresh lysis buffer (catalog: IS007, different lysis buffer needs to be chosen based on subcellular location of the target protein) (w:v = 1:20-1:50, e.g. 1mL lysis buffer is added in 20-50mg tissue sample) with a glass homogenizer on ice (Micro Tissue Grinders woks, too).
3. The resulting suspension was sonicated with an ultrasonic cell disrupter till the solution is clarified.
4. Then, the homogenates were centrifuged for 5 minutes at 10,000×g. Collect the supernates and assay immediately or aliquot and store at  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .

**Cell Lysates** - Cells need to be lysed before assaying according to the following directions.

1. Adherent cells should be washed by cold PBS gently, and then detached with trypsin, and collected by centrifugation at 1,000×g for 5 minutes (suspension cells can be collected by centrifugation directly).
2. Wash cells three times in cold PBS.
3. Resuspend cells in fresh lysis buffer with concentration of  $10^7$  cells/mL. If it is necessary, the cells could be subjected to ultrasonication till the solution is clarified.
4. Centrifuge at 1,500×g for 10 minutes at 2-8°C to remove cellular debris. Assay immediately or aliquot and store at  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .

**Cell culture supernates and other biological fluids** - Centrifuge samples for 20 minutes at 1,000×g. Collect the supernates and assay immediately or store samples in aliquot at -20°C or -80°C for later use. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

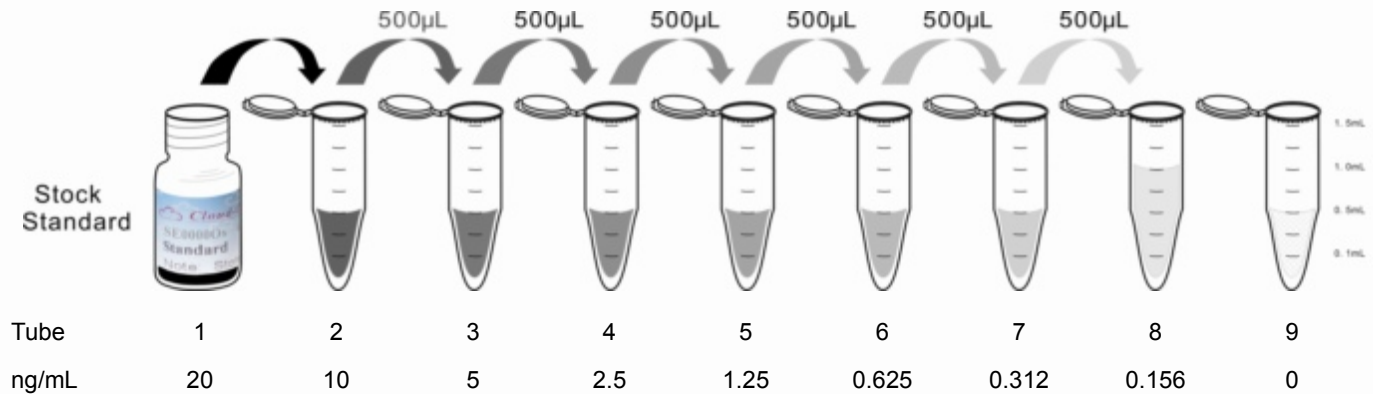
### **Note:**

1. Samples to be used within 5 days may be stored at 4°C, otherwise samples must be stored at -20°C ( $\leq 1$  month) or -80°C ( $\leq 2$  months) to avoid loss of bioactivity and contamination.
2. Sample hemolysis will influence the result, so hemolytic specimen should not be used.
3. When performing the assay, bring samples to room temperature.
4. It is highly recommended to use serum instead of plasma for the detection based on quantity of our in-house data.

## [ **REAGENT PREPARATION** ]

1. Bring all kit components and samples to room temperature (18-25°C) before use. If the kit will not be used up in one time, please only take out strips and reagents for present experiment, and leave the remaining strips and reagents in required condition.

2. **Standard** - Reconstitute the **Standard** with 1.0mL of **Standard Diluent**, kept for 10 minutes at room temperature, shake gently(not to foam). The concentration of the standard in the stock solution is 20ng/mL. Please firstly dilute the stock solution to 10ng/mL and the diluted standard serves as the highest standard (10ng/mL). Then prepare 7 tubes containing 0.5mL Standard Diluent and use the diluted standard to produce a double dilution series according to the picture shown below. Mix each tube thoroughly before the next transfer. Set up 7 points of diluted standard such as 10ng/mL, 5ng/mL, 2.5ng/mL, 1.25ng/mL, 0.625ng/mL, 0.312ng/mL, 0.156ng/mL, and the last EP tubes with **Standard Diluent** is the blank as 0ng/mL.



3. **Detection Reagent A and Detection Reagent B** - Briefly spin or centrifuge the stock Detection A and Detection B before use. Dilute them to the working concentration 100-fold with **Assay Diluent A and B**, respectively.
4. **Wash Solution** - Dilute 20mL of Wash Solution concentrate (30×) with 580mL of deionized or distilled water to prepare 600mL of Wash Solution (1×).
5. **TMB substrate** - Aspirate the needed dosage of the solution with sterilized tips and do not dump the residual solution into the vial again.

**Note:**

1. Making serial dilution in the wells directly is not permitted.
2. Prepare standards within 15 minutes before assay. Please do not dissolve the reagents at 37°C directly.
3. Please carefully reconstitute Standards or working Detection Reagent A and B according to the instruction, and avoid foaming and mix gently until the crystals are completely dissolved. To minimize imprecision caused by pipetting, use small volumes and ensure that pipettors are calibrated. It is recommended to suck more than 10µL for one pipetting.
4. The reconstituted Standards, Detection Reagent A and Detection Reagent B can be **used only once**.
5. If crystals have formed in the Wash Solution concentrate (30×), warm to room temperature and mix gently until the crystals are completely dissolved.
6. Contaminated water or container for reagent preparation will influence the detection result.

**[ SAMPLE PREPARATION ]**

1. We are only responsible for the kit itself, but not for the samples consumed during the assay. The user should calculate the possible amount of the samples used in the whole test. Please reserve sufficient samples in advance.
2. Please predict the concentration before assaying. If values for these are not within the range of the standard curve, users must determine the optimal sample dilutions for their particular experiments. Sample should be diluted by PBS.

3. If the samples are not indicated in the manual, a preliminary experiment to determine the validity of the kit is necessary.
4. Tissue or cell extraction samples prepared by chemical lysis buffer may cause unexpected ELISA results due to the impacts from certain chemicals.
5. Due to the possibility of mismatching between antigen from other origin and antibody used in our kits (e.g., antibody targets conformational epitope rather than linear epitope), some native or recombinant proteins from other manufacturers may not be recognized by our products.
6. Influenced by the factors including cell viability, cell number or sampling time, samples from cell culture supernates may not be detected by the kit.
7. Fresh samples without long time storage is recommended for the test. Otherwise, protein degradation and denaturalization may occur in those samples and finally lead to wrong results.

## **[ ASSAY PROCEDURE ]**

1. Determine wells for diluted standard, blank and sample. Prepare 7 wells for standard, 1 well for blank. Add 100µL each of dilutions of standard (read Reagent Preparation), blank and samples into the appropriate wells. Cover with the Plate sealer. Incubate for 1 hour at 37°C.
2. Remove the liquid of each well, don't wash.
3. Add 100µL of **Detection Reagent A** working solution to each well, cover the wells with the plate sealer and incubate for 1 hour at 37°C.
4. Aspirate the solution and wash with 350µL of 1× Wash Solution to each well using a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser or autowasher, and let it sit for 1~2 minutes. Remove the remaining liquid from all wells completely by snapping the plate onto absorbent paper. Totally wash 3 times. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against absorbent paper.
5. Add 100µL of **Detection Reagent B** working solution to each well, cover the wells with the plate sealer and incubate for 30 minutes at 37°C.
6. Repeat the aspiration/wash process for total 5 times as conducted in step 4.
7. Add 90µL of **Substrate Solution** to each well. Cover with a new Plate sealer. Incubate for 10 - 20 minutes at 37°C (Don't exceed 30 minutes). Protect from light. The liquid will turn blue by the addition of Substrate Solution.
8. Add 50µL of **Stop Solution** to each well. The liquid will turn yellow by the addition of Stop solution. Mix the liquid by tapping the side of the plate. If color change does not appear uniform, gently tap the plate to ensure thorough mixing.
9. Remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate and confirm there is no bubble on the surface of the liquid. Then, run the microplate reader and conduct measurement at 450nm immediately.

### **Note:**

1. **Assay preparation:** Keep appropriate numbers of wells for each experiment and remove extra wells from microplate. Rest wells should be resealed and stored at -20°C.



2. **Samples or reagents addition:** Please use the freshly prepared **Standard**. Please carefully add samples to wells and mix gently to avoid foaming. Do not touch the well wall. For each step in the procedure, total dispensing time for addition of reagents or samples to the assay plate should not exceed 10 minutes. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step, without interruption. Duplication of all standards and specimens, although not required, is recommended. To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of standards, samples, and reagents. Also, use separated reservoirs for each reagent.
3. **Incubation:** To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary. Do not allow wells to sit uncovered for extended periods between incubation steps. Once reagents are added to the well strips, DO NOT let the strips DRY at any time during the assay. Incubation time and temperature must be controlled.
4. **Washing:** The wash procedure is critical. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Solution by aspirating or decanting and remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate. Insufficient washing will result in poor precision and false elevated absorbance reading.
5. **Controlling of reaction time:** Observe the change of color after adding **TMB Substrate** (e.g. observation once every 10 minutes), if the color is too deep, add **Stop Solution** in advance to avoid excessively strong reaction which will result in inaccurate absorbance reading.
6. **TMB Substrate** is easily contaminated. Please protect it from light.
7. The environment humidity which is less than 60% might have some effects on the final performance, therefore, a humidifier is recommended to be used at that condition.

## **[ TEST PRINCIPLE ]**

The microplate provided in this kit has been pre-coated with an antibody specific to GFAP. Standards or samples are then added to the appropriate microplate wells with a biotin-conjugated antibody specific to GFAP. Next, Avidin conjugated to Horseradish Peroxidase (HRP) is added to each microplate well and incubated. After TMB substrate solution is added, only those wells that contain GFAP, biotin-conjugated antibody and enzyme-conjugated Avidin will exhibit a change in color. The enzyme-substrate reaction is terminated by the addition of sulphuric acid solution and the color change is measured spectrophotometrically at a wavelength of  $450\text{nm} \pm 10\text{nm}$ . The concentration of GFAP in the samples is then determined by comparing the O.D. of the samples to the standard curve.

## **[ CALCULATION OF RESULTS ]**

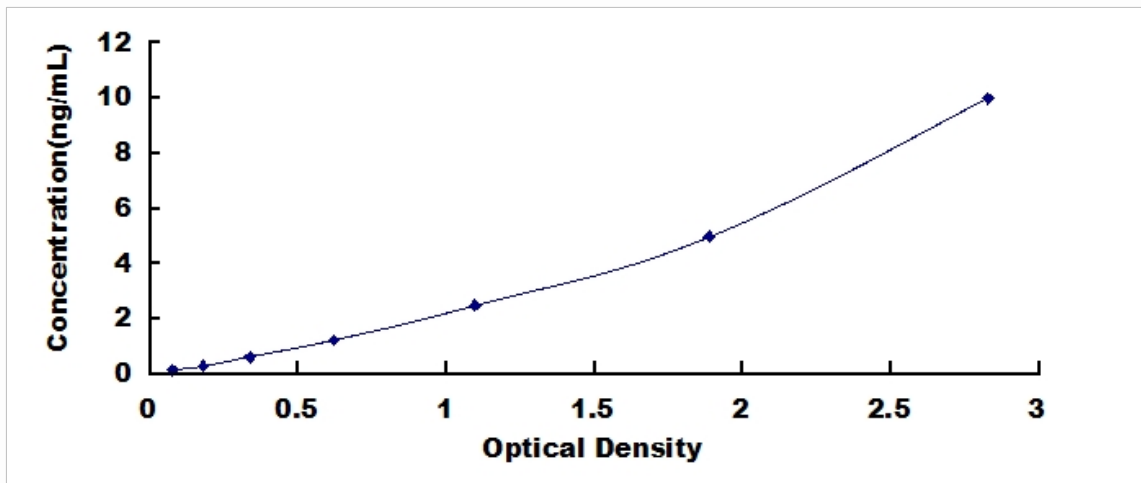
Average the duplicate readings for each standard, control, and samples and subtract the average zero standard optical density. Construct a standard curve by plotting the mean O.D. and concentration for each standard and draw a best fit curve through the points on the graph or create a standard curve on log-log graph paper with GFAP concentration on the y-axis and absorbance on the x-axis. Using some plot software, for instance, curve expert 1.30, is also recommended. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

## **[ TYPICAL DATA ]**

In order to make the calculation easier, we plot the O.D. value of the standard (X-axis) against the known concentration of the standard (Y-axis), although concentration is the independent variable and O.D. value is the



dependent variable. However, the O.D. values of the standard curve may vary according to the conditions of assay performance (e.g. operator, pipetting technique, washing technique or temperature effects), plotting log of the data to establish standard curve for each test is recommended. Typical standard curve below is provided for reference only.



**Typical Standard Curve for GFAP, Human ELISA.**

### **[ DETECTION RANGE ]**

0.156-10ng/mL. The standard curve concentrations used for the ELISA's were 10ng/mL, 5ng/mL, 2.5ng/mL, 1.25ng/mL, 0.625ng/mL, 0.312ng/mL, 0.156ng/mL.

### **[ SENSITIVITY ]**

The minimum detectable dose of GFAP is typically less than 0.056ng/mL.

The sensitivity of this assay, or Lower Limit of Detection (LLD) was defined as the lowest protein concentration that could be differentiated from zero. It was determined by adding two standard deviations to the mean optical density value of twenty zero standard replicates and calculating the corresponding concentration.

### **[ SPECIFICITY ]**

This assay has high sensitivity and excellent specificity for detection of GFAP.

No significant cross-reactivity or interference between GFAP and analogues was observed.

#### **Note:**

Limited by current skills and knowledge, it is impossible for us to complete the cross- reactivity detection between GFAP and all the analogues, therefore, cross reaction may still exist.

### **[ RECOVERY ]**

Matrices listed below were spiked with certain level of recombinant GFAP and the recovery rates were calculated by comparing the measured value to the expected amount of GFAP in samples.

Matrix	Recovery range (%)	Average(%)
serum(n=5)	89-99	95
EDTA plasma(n=5)	80-94	88
heparin plasma(n=5)	90-102	96

## [ LINEARITY ]

The linearity of the kit was assayed by testing samples spiked with appropriate concentration of GFAP and their serial dilutions. The results were demonstrated by the percentage of calculated concentration to the expected.

Sample	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16
serum(n=5)	92-105%	82-98%	85-96%	78-91%
EDTA plasma(n=5)	81-90%	79-96%	87-104%	83-97%
heparin plasma(n=5)	96-106%	80-95%	93-102%	86-101%

## [ PRECISION ]

Intra-assay Precision (Precision within an assay): 3 samples with low, middle and high level GFAP were tested 20 times on one plate, respectively.

Inter-assay Precision (Precision between assays): 3 samples with low, middle and high level GFAP were tested on 3 different plates, 8 replicates in each plate.

$$CV(\%) = SD/mean \times 100$$

Intra-Assay: CV<10%

Inter-Assay: CV<12%

## [ STABILITY ]

The stability of ELISA kit is determined by the loss rate of activity. The loss rate of this kit is less than 5% prior to the expiration date under appropriate storage condition.

To minimize extra influence on the performance, operation procedures and lab conditions, especially room temperature, air humidity, incubator temperature should be strictly monitored. It is also strongly suggested that the assay is performed by the same operator from the beginning to the end.

## [ SAMPLE VALUE ]

**Serum/Plasma** - Twenty-three serum and plasma samples from apparently healthy volunteers were evaluated in this assay. Most samples measured less than the lowest GFAP standard.

**Cell Lysates** - Cell lysates prepared according to protocol shown in [ SAMPLE COLLECTION AND STORAGE ] section on page 2 were assayed for GFAP levels. Results are shown in the table below.

Samples	O.D. Range
MCF7 cells	0.43-0.75
A549 cells	0.52-0.86

**These data are our in-house data, only for reference.**

## **[ ASSAY PROCEDURE SUMMARY ]**

1. Prepare all reagents, samples and standards;
2. Add 100µL standard or sample to each well. Incubate 1 hour at 37°C;
3. Aspirate and add 100µL prepared Detection Reagent A. Incubate 1 hour at 37°C;
4. Aspirate and wash 3 times;
5. Add 100µL prepared Detection Reagent B. Incubate 30 minutes at 37°C;
6. Aspirate and wash 5 times;
7. Add 90µL Substrate Solution. Incubate 10-20 minutes at 37°C;
8. Add 50µL Stop Solution. Read at 450nm immediately.

## **[ IMPORTANT NOTE ]**

1. Limited by the current conditions and scientific technology, we can't completely conduct the comprehensive identification and analysis on the raw material provided by suppliers. So there might be some qualitative and technical risks to use the kit.
2. The final experimental results will be closely related to validity of the products, so the kit should be used prior to the expiration date. And please store the kits exactly according to the instruction.
3. Kits from different batches may be a little different in detection range, sensitivity and color developing time. Please perform the experiment exactly according to the instruction attached in kit while electronic ones from our website is only for reference.
4. Do not mix or substitute reagents from one kit lot to another. Use only the reagents supplied by manufacturer.
5. Protect all reagents from strong light during storage and incubation. All the bottle caps of reagents should be covered tightly to prevent the evaporation and contamination of microorganism. TMB Substrate should remain colorless till it is reacted with the enzyme which binds to the microplate.
6. There may be some foggy substance in the wells when the plate is opened at the first time. It will not have any effect on the final assay results. Do not remove microplate from the storage bag until needed.
7. Wrong operations during the reagents preparation and loading, as well as incorrect parameter setting for the plate reader may lead to incorrect results. A microplate reader with a bandwidth of 10nm or less and an optical density range of 0-3 O.D. at  $450 \pm 10$ nm wavelength is acceptable for use in absorbance measurement. Please read the instruction carefully and adjust the instrument prior to the experiment.
8. Variation in sample preparation and each step of experimental operation may cause different results. In order to get better reproducible results, the operation of each step in the assay should be controlled.
9. Each kit has been strictly passed Q.C test. However, results from end users might be inconsistent with our in-house data due to some unexpected transportation conditions or different lab equipments. Intra-assay variance among kits from different batches might arise from above factors, too.
10. Kits from different manufacturers with the same item might produce different results, since we haven't compared our products with other manufacturers.
11. The standard of the kit and immunogen used for antibody preparation are commonly recombinant proteins, as different fragments, expression systems, purification methods might be used in recombinant protein preparation, we can not guarantee the kit could detect recombinant protein from other companies. So, it is not recommended to use the kit for the detection of recombinant protein.



- 12. Please predict the concentration of target molecules in samples, or arrange a preliminary experiment, it is a good way to solve specific problem, e.g. the concentration of samples are beyond the detection range of the kit.
- 13. The kit might not be suitable for detection of samples from some special experiment, for instance, knock-out experiments, due to their uncertainty of effectiveness.
- 14. The instruction manual is also for the kit of 48T, but all reagents of 48T kit are reduced by half.
- 15. The kit is designed for research use only, we will not be responsible for any issue if the kit was used in clinical diagnostic or any other procedures.

**[ PRECAUTION ]**

The Stop Solution suggested for use with this kit is an acid solution. Wear eye, hand, face, and clothing protection when using this material.

**[ TROUBLE SHOOTING ]**

Problem	Possible Source	Correction Action
<b>Poor Standard Curve</b>	Improper standard curve preparation	Ensure accurate operation of the dilution
	Incomplete washing and aspiration	Adequate washing and adequate aspiration
	Inaccurate Pipetting	Check and Calibrate pipettes
<b>Poor Precision</b>	Incomplete washing of wells	Ensure sufficient washing
	Inadequate mixing and aspiration reagents	Adequate aspiration and mixing reagents
	Reused pipette tips, containers and sealers	Change and use new pipette tips, containers and sealers
	Inaccurate Pipetting	Check and Calibrate pipettes
<b>Low O.D Values</b>	Inadequate reagent volumes added to wells	Calibrate pipettes and Add adequate reagents
	Incorrect incubation times	Ensure sufficient incubation times
	Incorrect incubation temperature	Reagents balanced to room temperature
	Conjugate or substrate reagent failure	Mix conjugate & substrate, color should develop immediately
	No stop solution added	Follow the assay protocol in the kit manual
	Read beyond suggested reading time	Read within the time recommended in the manual
<b>Sample Values</b>	Improper Sample Storage	Store the sample properly and use the fresh sample
	Improper sample collection and preparation	Take proper sample collection and preparation method
	Low quantity of analyte in samples	Use new sample and repeat assay

Certificate CN09/21757

The management system of

# Cloud-Clone Corp. Wuhan

Business Registration Address: Export Processing Zone, Economic & Technological Development Zone, Wuhan City, Hubei Province, P.R. China  
Business Operation Address: Export Processing Zone, Economic & Technological Development Zone, Wuhan City, Hubei Province, P.R. China

Unified Social Credit Code 914201006888364894

has been assessed and certified as meeting the requirements of

## ISO 9001:2015

For the following activities

**Research, Development and Manufacture of Recombinant Protein, Antibody and ELISA Kits, used for Medical Purpose**

This certificate is valid from 8 December 2021 until 29 October 2024 following a re-certification audit on 15 September 2021 and remains valid subject to satisfactory surveillance audits. Re-certification audit due a minimum of 60 days before the expiration date. Issue 5. This certificate was previously valid from 16 September 2018 until 29 October 2021

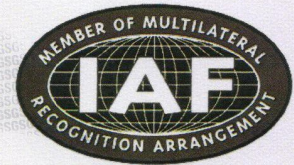
Authorised by

SGS United Kingdom Ltd  
Rossmore Business Park Ellesmere Port Cheshire CH65 3EN UK  
t +44 (0)151 350-6666 f +44 (0)151 350-6600 [www.sgs.com](http://www.sgs.com)

The certification information can be verified on the web site of Certification and Accreditation Administration of the People's Republic of China [www.cnca.gov.cn](http://www.cnca.gov.cn)

HC SGS 9001 2015 0118 M1

Page 1 of 1



0005

