

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ 11-ДЕГИДРО-ТРОМБОКСАНА В₂ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ ТКАНИ И МОЧЕ

ADI-900-092, 11-dehydro-TXB₂ ELISA

Каталог. № : ADI-900-092

Методика от 01-23-2015

Количество : 96

Производитель: Enzo Life
Sciences, (США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

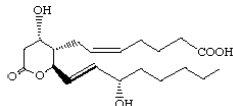
**Только для исследовательских целей.
Не применять для диагностики**

ОПИСАНИЕ

Набор ИФА 11-дегидро-ТХВ₂ – это конкурентный анализ для количественного определения 11-дегидро-Тромбоксана В₂ в культуральной среде ткани и моче. Пожалуйста, ознакомьтесь с инструкцией перед выполнением этого анализа. Набор для количественного определения 11-дегидро-Тромбоксана В₂ использует поликлональные антитела к 11-дегидро-ТХВ₂ для связывания, на конкурентной основе, с 11-дегидро-ТХВ₂ в образце или молекулой щелочной фосфатазы, с которой ковалентно связана 11-дегидро-ТХВ₂. После одновременной инкубации при комнатной температуре избыток реагентов вымывается и добавляется субстрат. После короткого времени инкубации ферментативную реакцию останавливают, и сгенерированный желтый цвет считывается на микропланшетном ридере при 405. Интенсивность связанного желтого цвета обратно пропорциональна концентрации 11-дегидро-ТХВ₂ как в стандартах так и в образцах. Полученная оптическая плотность используется для расчета концентрации 11-дегидро-ТХВ₂. Для дальнейшего объяснения принципов и практики иммунологических анализов см. отличные книги Chard¹ или Tijssen².

ВВЕДЕНИЕ

11-дегидро-ТХВ₂ является основным продуктом метаболизма Тромбоксана В₂ (ТХВ₂) в моче и плазме³⁻¹². Он производится дегидрированием спиртовой группы на позиции С11 ТХВ₂ ферментом 11-ОН-дегидрогеназы⁷. Обнаружение 11-дегидро-ТХВ₂ часто используется для измерения производства Тромбоксана *in vivo*^{3-4, 5, 8}. Мониторинг уровня этого метаболита является полезным инструментом в изучении нескольких болезней, таких как цирроз печени, кистозный фиброз, мастоцитоз⁶, системная красная волчанка⁸, заболевания тромбоза и других заболеваний, связанных с активацией тромбоцитов^{3, 10}. 11-дегидро-ТХВ₂ также используется при изучении диабета¹¹ и астмы¹².



11-dehydro-Thromboxane В₂

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

ТОЛЬКО ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЕЙ, НЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР.

1. Некоторые компоненты набора содержат азид, который может реагировать со свинцом или медью. При утилизации реагентов обязательно промойте их большим количеством воды, чтобы предотвратить скопление азидов.
2. Стоп-раствор является раствором тринатрийфосфата. Это едкое вещество. При работе с данным реагентом необходимо соблюдать меры предосторожности.
3. Активность конъюгата щелочной фосфатазы зависит от присутствия ионов Mg²⁺ и Zn²⁺ и подвержена влиянию хелаторов, например EDTA и EGTA, в концентрациях > 10 мМ
4. Характеристики метода были протестированы для различных типов образцов, однако возможно, что высокие концентрации влияющих веществ могут быть причиной вариабельности результатов анализа.
5. Со стандартом 11-дегидро-ТХВ₂, поставляемым в наборе, кат. № 80-0735, в буфере этанола при рН, оптимизированном для поддержания целостности 11-дегидро-ТХВ₂. Соблюдать

осторожность при работе с этим материалом из-за известных и неизвестных эффектов эйкозаноидов.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

1. **Козий анти-кролик IgG Микропланшет**, кат. № 80-0060 - 96-ячеечный микропланшет со сменными стрипами, покрытый козьими антителами к IgG кролика.
2. **11-дегидро-ТХВ₂ Конъюгат**, 6 мл, кат. № 80-0652 – раствор синего цвета щелочной фосфатазы, конъюгированный с 11-дегидро-ТХВ₂.
3. **11-дегидро-ТХВ₂ раствор антител**, 6 мл, кат. № 80-0831 Желтый раствор кроличьих поликлональных антител к 11-дегидро-ТХВ₂.
4. **Рабочий буфер**, 30 мл, кат. № 80-1546 Трис-буферный солевой раствор, содержащий белки и моющие средства, и азид натрия в качестве консерванта.
5. **Концентрат буфера для промывок**, 30 мл, кат. № 80-1286 Содержит Трис буфер с детергентами.
6. **Стандарт 11-дегидро-ТХВ₂**, 0,5 мл, кат. № 80-0735 Раствор 11-дегидро-ТХВ₂, 100,000 пг/мл.
7. **pNpp Субстрат**, 20 мл, кат. № 80-0075 Содержит p-Нитрофенилфосфат в буфере. Готов к использованию.
8. **Стоп-раствор**, 5 мл, кат. № 80-0247 Раствор тринатрийфосфата (TSP). Хранить тщательно закрытым. Предупреждение: едкое вещество.
9. **Схема постановки анализа 11-дегидро-ТХВ₂**, кат. № 30-0158 - 1 лист
10. **Пленки для накрывания микропланшета**, кат. № 30-0012 - 1 шт.

ХРАНЕНИЕ

Все компоненты набора, за исключением **Конъюгата** и **Стандарта**, стабильны при 4 °С до истечения срока годности набора. Стандарт **должен** храниться замороженным при температуре -20 °С.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Деионизированная или дистиллированная вода.
2. Калибровочные пипетки для нанесения объемов от 5 мкл до 1,000 мкл.
3. Дозаторы для внесения объемов 50 мкл и 200 мкл.
4. Одноразовая лабораторная посуда для разведения концентратов буферов.
5. Мерные цилиндры.
6. Микропланшетный шейкер.
7. Фильтровальная бумага.
8. Микропланшетный фотометр с длиной волны измерения 405 нм и фильтром сравнения между 570 и 590 нм.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Данный набор 11-дегидро-ТХВ₂ ELISA совместим с образцами 11-дегидро-ТХВ₂ в ткани культуральных сред и моче человека. Значения концентраций в образцах, достаточно разведенных рабочим буфером, могут быть считаны непосредственно по калибровочной кривой. Более детально с данными по извлечению, в предлагаемых разведениях, можно ознакомиться ниже в инструкции. Однако оператор **должен проверить**, подходят ли рекомендованные разведения для его образцов. **Образцы, содержащие IgG кролика, могут интерферировать с анализом.**

Образцы в большинстве тканей культуральных сред, в том числе те, которые содержат фетальную бычью сыворотку, также могут быть считаны в анализе, при условии, что стандарты разводили в культуральной среде ткани вместо буфера для анализа. Будет небольшое изменение в связывании при анализе стандартов и образцов в культуральной среде. Допускается использование только стандартных кривых, построенных в среде или буфере, для расчета концентрации 11-дегидро-ТХВ₂ в соответствующей матрице. Для образцов ткани и мочи, ингибиторы простагландин-синтетазы, например, индометацина или меклофенамовой кислоты в концентрации до 10 мкг/мл, следует добавить к гомогенату ткани или к образцам мочи. Образцы мочи могут быть использованы в анализе без разбавления. Некоторым образцам может потребоваться экстракция для точного измерения. Подходящий процесс экстракции описан ниже:

Необходимые материалы

1. Стандарт 11-дегидро-ТХВ₂ для обеспечения точного определения эффективности экстракции.
2. 2 М соляной кислоты, деионизированная вода, этанол, гексан и этилацетат.
3. 200 мг Экстракционные Столбцы Обратной Фазы C₁₈.

Процедура

1. Подкислите мочу или гомогенат ткани добавлением 2М HCl до pH 3.5. Оставить на 15 минут при 4 °С. Центрифугировать образцы в микроцентрифуге в течение 2 минут, чтобы удалить осадок.
 2. Подготовьте колонку C18 обратной фазы промыванием 10 мл этанола с последующим добавлением 10 мл деионизированной воды.
 3. Внесите образец с легким давлением с получением скорости потока около 0,5 мл/мин. Промойте колонку 10 мл воды, затем 10 мл 15%-ного этанола и, наконец, 10 мл гексана. Элюировать образец из колонки добавлением 10 мл этилацетата.
 4. Если анализ будет проводиться сразу, выпарить образцы струей азота. Добавьте как минимум 250 мкл буфера к высушенным образцам. Тщательно перемешать, оставить при комнатной температуре на 5 минут. Повторить еще два раза. Если анализ будет отложен, хранить образцы как элюированные этилацетатные растворы при температуре -80 °С до проведения анализа. Выпарить органический растворитель струей азота перед проведением анализа и восстановить, как описано выше.
- См. список Литературы (15-18) за информацией о подробном протоколе экстракции.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ

1. Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов, не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке.
2. Дайте реагентам достичь комнатной температуры не менее чем в течение 30 минут перед тем, как их открыть.
3. Стандарты и образцы должны быть приготовлены в пластиковой посуде.
4. При пипетировании стандартов смачивайте наконечники перед нанесением, используйте новый одноразовый наконечник для каждого реагента, стандарта и образца
5. Наносите стандарты и образцы на дно лунок.
6. Для предотвращения контаминации наносите остальные реагенты на стенки лунок.
7. В данном наборе использован микропланшет с отдельными стрипами, что позволяет проводить только необходимое количество измерений. Неиспользованные стрипы должны храниться с осушителем при 4 °С в поставляемом пакете. Стрипы надо использовать с поставляемой рамкой-держателем.
8. **Необходимо соблюдать меры предосторожности для снижения контаминации эндогенной щелочной фосфатазой.** Контаминация щелочной фосфатазой, особенно в субстратном растворе, может привести к высоким значениям бланка. Не прикасайтесь голыми руками к наконечникам и другим материалам, используемым при анализе.
9. **Перед добавлением субстрата убедитесь в отсутствии остатков буфера для промывок в лунках.** Любой оставшийся буфер для промывок может вызвать отклонения в результатах анализа.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. **Стандарт 11-дегидро-ТХВ₂**
Позволить Раствору Стандарта 11-дегидро-ТХВ₂ 1-0,000 пг/мл достичь комнатной температуры.
Промаркируйте 6 полипропиленовых пробирок 12x75 мм от № 1 по № 6. Внесите 1,000 мкл Растворителя Стандарта (Рабочий Буфер или Культуральная Среда) в пробирку №1. Внесите 750 мкл Растворителя стандарта в пробирки №2 - №6. Удалите 100 мкл разбавителя из пробирки №1. Добавьте 100 мкл стандарта 100,000 пг/мл в пробирку №1. Тщательно перемешайте. Добавьте 250 мкл из пробирки №1 в пробирку №2 и тщательно перемешайте на вортексе. Добавьте 250 мкл из пробирки № 2 в пробирку №3 и перемешайте на вортексе. Продолжайте для пробирок №4-№6

Концентрации 11-дегидро-ТХВ₂ в пробирках №1-№6 будут 10,000, 2,500, 625, 156.3, 39.1 и 9.8 пг/мл соответственно. Подробности разведения приведены в листе со схемой постановки анализа 11-дегидро-ТХВ₂.

Разведенные Стандарты использовать в течение 60 минут после приготовления.

2. **Буфер для промывок**
Приготовить промывочный буфер разбавлением 5 мл поставляемого концентрата в 95 мл деионизированной воды. Разведенный буфер для промывок может храниться при комнатной температуре до 3 месяцев, но не дольше чем до окончания срока годности.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приведите все реагенты и образцы к комнатной температуре не менее, чем за 30 минут до открытия.

Все образцы и стандарты должны анализироваться в дублях.

1. Определите, используя лист со схемой постановки анализа, необходимое для анализа число стрипов, неиспользованные стрипы верните в пакет с осушителем, тщательно закройте и храните при 4 °С.
2. Внесите по 100 мкл Растворителя Стандарта (Рабочий Буфер или Культуральная Среда) в лунки NSB и Во (стандарт 0 пг/мл).
3. Внесите по 100 мкл стандартов из пробирок №1–№6 в соответствующие лунки.
4. Внесите по 100 мкл образцов в соответствующие лунки.
5. Внесите 50 мкл Рабочего буфера в NSB лунки.
6. Внесите 50 мкл синего конъюгата в каждую лунку, за исключением лунок Общей Активности (ТА) и Бланка.
7. Внесите 50 мкл желтых антител в каждую лунку, за исключением лунок Бланк, ТА и NSB.

ПРИМЕЧАНИЕ: Каждая лунка должна быть **зеленого цвета**, кроме лунок NSB, которые должны быть **синими**. Лунки Бланк и ТА пусты в данный момент и не имеют цвета.

8. Инкубировать при комнатной температуре на шейкере в течение 2 часов при ~ 500 оборотов в минуту.
9. Освободить лунки и промыть путем добавления 400 мкл промывочного раствора в каждую лунку. Повторить мытье еще 2 раза в общей сложности **3 промывки**.
10. После последней промывки освободить лунки, и сильно стукнуть пластиной по безворсовому бумажному полотенцу, чтобы удалить остатки промывочного буфера.
11. Внесите 5 мкл синего Конъюгата в лунки ТА.
12. Внесите по 200 мкл раствора субстрата во **все** ячейки. Инкубируйте 1 час при КТ без шейкования.
13. Внесите по 50 мкл стоп-раствора в каждую ячейку. Это останавливает реакцию, и результаты должны быть считаны немедленно.
14. Бланкируйте микропланшетный фотометр (ридер) по лункам бланка, определимте оптическую плотность (ОП) ячеек при 405. Желательно использовать фильтр сравнения с длиной волны между 570 и 590 нм. Если ридер не может быть бланкирован по лункам бланка, вычитите среднее значение ОП, полученное для бланка, из значений ОП, полученных для всех остальных лунок.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Подсчет концентрации 11-дегидро-ТХВ₂ в образцах можно проводить различными способами. Для обработки полученных данных рекомендуется использовать специальное программное обеспечение, с применением 4 параметрической аппроксимации. Если использование такого программного обеспечения невозможно, концентрация 11-дегидро-ТХВ₂ в образцах может быть рассчитана следующим образом:

1. Рассчитайте среднюю ОП для каждого стандарта и образца вычитанием среднего значения ОП бланка из среднего значения ОП образца или стандарта:

$$\text{Average Net OD} = \text{Average Bound OD} - \text{Average NSB OD}$$

2. Рассчитать связывание каждой пары стандартных лунок в виде процента от максимального связывания лунок (Bo), с использованием следующей формулы:

$$\text{Percent Bound} = \frac{\text{Net OD}}{\text{Net Bo OD}} \times 100$$

3. Отметить процент связывания против концентрации 11-дегидро-ТХВ₂ для стандартов. Приблизительно постройте прямую через точки. Концентрация 11-дегидро-ТХВ₂ в неизвестных может быть определена путем интерполяции.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

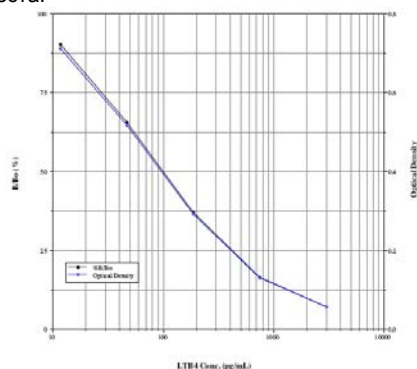
Результаты, приведенные ниже, приводятся только в демонстрационных целях и **не должны** использоваться для расчетов результатов какой-либо другой постановки.

Образец	Средняя ОП (-бланк)	Средняя Net ОП	Процент связывания	11-дегидро-ТХВ ₂ , (пг/мл)
Бланк ОП	(0.093)			
ТА	0.125			
NSB	-0.003	0.000		
Во	0.509	0.512	100 %	0

S1	0.047	0.050	9.8%	10000
S2	0.074	0.077	15.0%	2500
S3	0.136	0.139	27.1%	625
S4	0.256	0.259	50.6%	156.3
S5	0.384	0.387	75.6%	39.1
S6	0.456	0.459	89.6%	9.8
Обр. 1	0.110	0.113	22.1%	966
Обр.2	0.212	0.215	42.0%	246

ТИПИЧНАЯ СТАНДАРТНАЯ КРИВАЯ

Ниже приведена типичная калибровочная кривая. Эта кривая **не должна** быть использована для расчета концентрации 11-дегидро-ТХВ₂; калибровочную кривую необходимо строить при каждой постановке теста.



Типичные параметры контроля качества

Общая активность Добавленная = $0.125 \times 10 = 1.25$
 % NSB = 0.0 %
 % Во/ТА = 41.0 %
 Качество Подгонки = 1.000

(Рассчитано из 4-параметровой логистической кривой)

20% Пересечения = 1,212 пг/мл
 50% Пересечения = 162 пг/мл
 80% Пересечения = 28 пг/мл

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Следующие параметры данного набора были определены с использованием указаний, перечисленных в протоколе оценки Национального Комитета по Клиническим Лабораторным Стандартам (NCCLS).

Чувствительность

Чувствительность рассчитывали, определяя среднюю ОП шестнадцати (16) повторов 0 пг/мл, и сравнивая со средней ОП шестнадцати (16) повторов стандарта №6. Предел чувствительности был определен как концентрация 11-дегидро-ТХВ₂, соответствующая двум стандартным отклонениям от нуля по калибровочной кривой.

Средняя ОП В₀ = 0.507 ± 0.011 (2.26%)
 Средняя ОП стандарта № 5 = 0.457 ± 0.009 (1.96%)
 Дельта ОП (0 – 11.7 пг/мл) = $0.507 - 0.457 = 0.106$
 2 SD's от нулевого стандарта = $2 \times 0.011 = 0.022$

Чувствительность: = $\frac{0.022 \times 9.8 \text{ пг/мл}}{0.050} = 4.31 \text{ пг/мл}$

Линейность

Образец, содержащий 6,613 пг/мл 11-дегидро-ТХВ₂, был разведен 6 раз 1:2 рабочим буфером и протестирован с помощью данного метода. Данные были представлены графически, как зависимость актуальной концентрации 11-дегидро-ТХВ₂ от измеренной. Полученная линия имела уклон 0.943 и коэффициент корреляции 0.999.

Точность

Воспроизводимость внутри серии определялась многократным тестированием (n=16) образцов с низкой, средней и высокой концентрацией 11-дегидро-ТХВ₂ в одной постановке. Воспроизводимость между сериями определялась многократным тестированием (n=8) трех образцов с низкой, средней и высокой концентрацией 11-дегидро-ТХВ₂ в разных постановках. Данные по воспроизводимости, приведенные ниже, представлены как % коэффициента вариаций для концентраций 11-дегидро-ТХВ₂, определенных в указанных постановках, рассчитанных с помощью

программного обеспечения с использованием 4-параметрической аппроксимации.

	11-дегидро-ТХВ ₂ , пг/мл	%CV Внутри серии	%CV Между сериями
Низкая	67	13.2	
Средняя	165	15.3	
Высокая	318	8.1	
Низкая	72		17.5
Средняя	216		12.6
Высокая	1,250		16.3

Перекрестная реактивность

Перекрестную реактивность подобных молекул определяли, растворяя перекрестно реагирующее вещество в рабочем буфере. Затем эти образцы были протестированы данным методом определения 11-дегидро-ТХВ₂, и была рассчитана измеренная концентрация 11-дегидро-ТХВ₂. % перекрестной реактивности был рассчитан сравнением актуальной концентрации перекрестно реагирующего вещества в образце и выражен в процентах.

Compound	Cross Reactivity
11-dehydro TXB ₂	100%
PGE ₂	1.85%
TXB ₂	0.4%
PGF _{2α}	0.2%
6-keto-PGF _{1α}	0.17%
PGD ₂	0.1%
2,3-dinor TXB ₂	0.1%
8-iso-PGF _{2α}	0.07%
11-b-PGF _{2α}	0.05%

Восстановление образцов

Концентрации 11-дегидро-ТХВ₂ были измерены в культуральной среде ткани и моче человека. Для образцов культуральной среды ткани, убедитесь, что стандарты разбавляют в той же среде (см. стр. 1). Для всех образцов, 11-дегидро-ТХВ₂ был добавлен в образцы, которые были разбавлены в аналитическом буфере набора или среде. Были получены следующие результаты:

Sample	% Recovery*	Recommended Dilution*
Tissue Culture Media	104.8	None
Human Urine	112.2	1:32

* См. раздел «Подготовка образцов».



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕВ»
 ул. Черновола, 97
 г. Ивано-Франковск, 76005
 тел.: +38 (0342) 775 122
 факс: +38 (0342) 775 123
 e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

