

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНГИОПОЭТИНА-2 ЧЕЛОВЕКА В СУПЕРНАТАНТЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК, СЫВОРОТКЕ, ПЛАЗМЕ И СЛЮНЕ

DANG20, Human Angiopoietin-2

Каталог. № : **DANG20**
Количество : **96**
Производитель: **R&D (Великобритания)**

Методика от **10-2015**
Версия **750902.6**



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 для диагностического использования**

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ (См. оригинал инструкции на англ. языке).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данная тест-система основана на количественном иммуноферментном анализе типа сэндвич. Моноклональные антитела к Ang-2 нанесены в ячейки микропланшета. Стандарты и образцы вносятся в ячейки и присутствующий в них Ang-2 связывается с антителами. После промывки несвязанного материала антитела к Ang-2, меченные ферментом, вносятся в ячейки. Последующая промывка удаляет несвязанный конъюгат антител с ферментом, после чего в ячейки вносится раствор ферментного субстрата, развитие окраски пропорционально количеству Ang-2, связавшегося на первом шаге анализа. Цветную реакцию останавливают и считывают оптическую плотность ячеек.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- **ИСПОЛЬЗОВАТЬ ТОЛЬКО ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЕЙ. НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР**
- Данный Набор должен быть использован до истечения срока годности указанного на этикетке набора.
- Не смешивайте и не заменяйте реагенты с реагентами других лотов или других производителей.
- Если значения концентрации образцов выше, чем концентрация самого высокого стандарта, разведите образцы соответствующим буфером для разведения стандарта и повторите анализ.
- Любые изменения в буфере для разведения стандарта, выполнении процедуры, техники пипетирования, промывки, времени инкубации или температуре и сроке годности набора могут быть причиной изменений в связывании.
- Данный метод предполагает исключение влияния растворимых рецепторов, связывающих белков и других факторов, присутствующих в биологических образцах. До проверки всех факторов, однако, возможность влияния не может быть исключена.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- При перемешивании белковых растворов избегайте вспенивания.
- Избегайте взаимной контаминации растворов, заменяйте наконечник на новый каждый раз при внесении стандарта другой концентрации, нового образца и нового реагента. Также для каждого реагента необходимо использовать отдельные резервуары (ванночки).

- Для получения корректных результатов закрывайте планшет адгезивной плёнкой каждый раз на время инкубации.
- При использовании автоматического вошера для промывок, установите после добавления буфера для промывок период замачивания 30 секунд, и/или вращение микропланшета на 180 градусов между шагами промывок может повысить точность результатов.
- Субстратный раствор должен оставаться бесцветным до момента добавления в ячейки. Храните в тёмном месте. Цвет Субстратного раствора во время реакции должен изменяться от бесцветного до голубого различной интенсивности.
- Стоп-раствор необходимо добавлять в ячейки в той же последовательности и с той же скоростью, что и Субстратный раствор. Цвет в ячейках будет меняться с голубого на жёлтый при добавлении стоп-реагента. Зелёный цвет в лунках свидетельствует о том, что стоп-раствор не был тщательно перемешан с раствором субстрата.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Ang-2 обнаруживается в слюне. Примите меры предосторожности, чтобы предотвратить загрязнение реагентов набора во время работы этого теста. Стоп-раствор этого набора является раствором кислоты. Некоторые компоненты этого набора содержат Проклин, который может вызвать аллергическую реакцию на коже. Избегайте вдыхания паров. Цветной Реагент В может вызвать раздражение кожи, глаз и раздражение дыхательных путей. Избегайте вдыхания паров. Носите защитные перчатки, одежду, защиту для глаза, и маску для лица. Тщательно вымойте руки после использования. Пожалуйста, обратитесь к листу безопасности на нашем сайте перед использованием.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Хранить невскрытый набор при 2-8 °С. Не использовать после окончания срока годности.

Реагент	№ реагента	Кат. № DANG20	Кат. № SANG20	Описание	Хранение открытых/восстановленных материалов
Ang-2 микропланшет	892359	1 планшет	6 планшетов	96-луночный полистироновый микропланшет (12 x 8 лунок), покрытый моноклональными антителами к Ang-2	Верните оставшиеся стрипы в пакет с осушителем, закройте zip-застёжку и поместите в холодильник. Неиспользованные стрипы храните в пакете при 2-8 °C 1 месяц*.
Ang-2 стандарт	892361	2 флакона	12 флаконов	Рекомбинантный человеческий Ang-2 в белковом буферном растворе с консервантами, лиофилизированный. <i>Обратитесь к этикетке флакона для объема восстановления.</i>	Утилизируйте после использования. Используйте свежий стандарт для каждого анализа.
Ang-2 конъюгат	892360	1 флакон	6 флаконов	21 мл/флакон моноклональных антител к Ang-2, конъюгированных с пероксидазой хрена, с консервантами.	
Рабочий буфер RD1-76	895812	1 флакон	6 флаконов	11 мл/флакон белкового буферного раствора с	

				консервантами.	Можно хранить 1 месяц при температуре 2-8 °С*
Буфер для разведения калибратора RD5-5	895485	1 флакон	6 флаконов	21 мл/флакон белкового буферного раствора с консервантами.	
Концентрат буфера для промывок	895003	1 флакон	6 флаконов	21 мл/флакон 25х буферного солевого раствора с детергентом и консервантами. <i>Может пожелтеть со временем.</i>	
Цветной реагент А	895000	1 флакон	6 флаконов	12 мл/флакон стабилизированного раствора перекиси водорода.	
Цветной реагент В	895001	1 флакон	6 флаконов	12 мл/флакон стабилизированного раствора хромогена (тетраметилбензидин).	
Стоп-раствор	895032	1 флакон	6 флаконов	6 мл/флакон раствор 2 N серной кислоты.	
Плётки для заклеивания стрипов	Без номера	4 полоски	24 полоски	Адгезивные плёнки	

*Учитывая, что не заканчивается срок годности.

DANG20 содержит достаточное количество материалов для запуска ИФА на один 96-луночный планшет.

SANG20 (Упаковка из шести наборов) содержит достаточно материалов для запуска ИФА на шести 96-луночных планшетах.

Этот набор также доступен в PharmPak (R&D Systems, каталог # PDANG20). PharmPaks содержит достаточно материала для работы ИФА на 50 микропланшетов. Содержимое конкретных флаконов для каждого компонента может изменяться. Пожалуйста, обратитесь к инструкции, сопровождающей ваш заказ, за конкретными значениями содержимого флаконов.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Микропланшетный ридер с фильтром 450 нм с фильтром сравнения 540 или 570 нм.
- Калиброванные пипетки переменного объема с одноразовыми наконечниками.
- Деионизированная или дистиллированная вода.
- Впрыскивающая бутылка, ручное или автоматическое промывающее устройство
- Градуированный цилиндр на 500 мл.
- Горизонтальный орбитальный шейкер со скоростью 500 ± 50 об/мин.
- Устройство для забора слюны, что не имеет никакого связывания с белками или возможности фильтрации, такое как Salivette® или эквивалент.
- Полипропиленовые тестовые пробирки для разбавления стандартов и образцов.
- Контроли Ang-2 человека (опционно; могут быть заказаны отдельно в R&D Systems).

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Условия сбора и хранения образцов, перечисленные ниже, предназначены в качестве общих руководящих принципов. Стабильность образца не была оценена.

Образцы супернатантов клеточных культур

Центрифугируйте образцы для удаления частиц и анализируйте немедленно или приготовьте аликвоты и храните при ≤ -20 °С. Избегайте повторного замораживания-размораживания.

Внимание: Значительные уровни Ang-2 были обнаружены в эмбрионах быков, крупного рогатого скота, свиней, лошадей, и сыворотке кролика. Фоновый уровень Ang-2 в контрольной среде должен быть определен и вычитается из образцов кондиционированной среды.

Образцы сыворотки

Если используете сепарационные пробирки, позвольте крови свернуться в течение 30 минут при комнатной температуре. Центрифугируйте 15 минут при 1000 g. Анализируйте сыворотку сразу или приготовьте аликвоты и храните при ≤ -20 °С. Избегайте повторного замораживания-размораживания образцов.

Образцы плазмы

Соберите плазму, используя для сбора образцов в качестве антикоагулянта ЭДТА или гепарин. Отделите плазму центрифугированием в течение 15 минут при 1000g не позже, чем через полчаса после забора. Анализируйте плазму сразу или приготовьте аликвоты и храните при ≤ -20 °С. Избегайте повторного замораживания-размораживания.

Примечание: Цитратная плазма не была исследована для использования в данном анализе.

Слюна – Провести забор слюны с помощью устройства для забора такого как Salivette или его эквивалента. Анализировать немедленно или аликвотировать и хранить образцы при ≤ -20 °С. Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания.

Примечание: Коллектор слюны не должен иметь никакого связывания с белками или возможности фильтрации.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Используйте полипропиленовые пробирки. Образцы сыворотки или плазмы должны быть разведены не менее, чем в 5 раз. Например, 50 мкл образца + 200 мкл буфера для разведения стандарта RD5-5.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты должны достичь комнатной температуры (18-25 °С) перед использованием.

Примечание: Высокие концентрации Ang-2 находятся в слюне. Мы рекомендуем использовать маску для лица и перчатки, чтобы защитить реагенты от загрязнения.

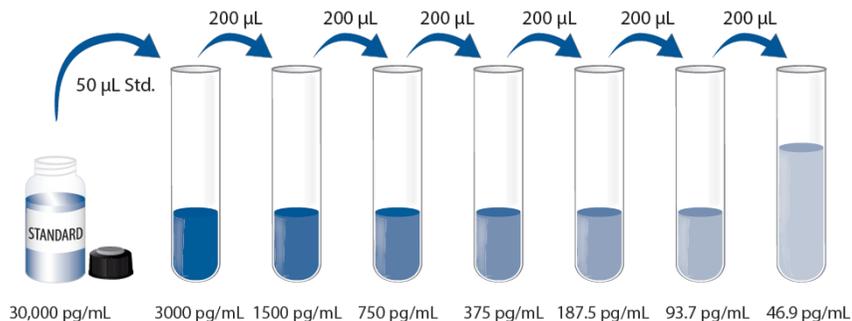
Буфер для промывок - нагрейте концентрат буфера для промывок до комнатной температуры и перемешайте, убедившись, что кристаллы соли, выпавшие в осадок, полностью растворились. Разведите 20 мл концентрата буфера для промывок дистиллированной или деионизированной водой для приготовления до 500 мл готового буфера для промывок.

Субстратный раствор - Смешайте равные доли Цветных реагентов А и В в подходящей емкости за 15 минут до использования. Защищайте от света. Для одной ячейки необходимо 200 мкл смеси.

Стандарт Ang-2 – Обратитесь к этикетке флакона для объема восстановления.

Развести Стандарт Ang-2 деионизированной или дистиллированной водой. Это восстановление производит исходный раствор в объеме 30,000 пг/мл. Смешать стандарт для обеспечения полного растворения и оставить стандарт как минимум на 15 минут при осторожном перемешивании до проведения разведений.

Используйте полипропиленовые пробирки. Внесите 450 мкл Разбавителя калибратора RD5-5 в пробирку с 3000 пг/мл. Внесите 200 мкл Разбавителя калибратора RD5-5 в остальные пробирки. Используйте исходный раствор, чтобы произвести серию разбавлений (см. ниже). Перемешайте содержимое каждой пробирки тщательно перед следующей передачей. Стандарт 3000 пг/мл служит в качестве Высокого стандарта. Разбавителя калибратора RD5-5 служит в качестве нулевого стандарта (0 мкг/мл).



ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Все реагенты и образцы должны достичь комнатной температуры (18-25 °C) перед использованием. Рекомендуется все стандарты, образцы и контроли анализировать в дуплях.

Примечание: Ang-2 обнаруживается в слюне. Примите меры предосторожности, чтобы предотвратить загрязнение реагентов набора во время работы этого теста.

1. Приготовьте все реагенты, рабочие разведения стандартов и образцы как это описано в предыдущем разделе.
2. Поместите требуемое количество стрипов в держатель. Верните оставшиеся стрипы в пакет с осушителем и поместите в холодильник.
3. Добавьте по 100 мкл Рабочего буфера RD1-76 во все лунки.
4. Добавьте по 50 мкл каждого стандарта, контроля или образца* в соответствующие лунки. Закройте стрипы адгезивной плёнкой. Инкубируйте 2 часа при комнатной температуре на горизонтальном орбитальном микропланшетном шейкере (0.12 "орбит) при 500 ± 50 оборотов в минуту. Устройство пластины рассчитано на запись результатов анализа стандартов и образцов.
5. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейку 3 раза с общим количеством промывок четыре раза. Промывайте, заполняя каждую лунку 400 мкл буфера для промывок, используя сжимаемую бутылку, многоканальную пипетку, ручной диспенсер или устройство для автоматической промывки (вошер). Полное удаление жидкости в каждом цикле промывки принципиально для хорошего качества анализа. После последнего цикла промывки удалите остатки буфера для промывок аспирацией или декантированием. Переверните и подсушите планшет на чистой фильтровальной бумаге.
6. Добавьте по 200 мкл Ang-2 конъюгата в каждую лунку. Закройте стрипы новой адгезивной плёнкой. Инкубируйте 2 часа при комнатной температуре.
7. Повторите промывку, как описано в шаге 5.
8. Внесите по 200 мкл Субстратного раствора во все ячейки. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре. **Защищайте планшет от воздействия света.**
9. Добавьте по 50 мкл стоп-раствора во все ячейки. Если цвет в ячейках зеленый или, если изменение цвета не происходит однородно, постучите осторожно по держателю стрипов для перемешивания реагентов.
10. Определите оптическую плотность ячеек в течение 30 минут при 450 нм. Используйте, если это возможно, длину волны сравнения 540 или 570 нм. Это необходимо для устранения оптических дефектов планшета. Если измерения с коррекцией невозможны, вычитите значения, полученные для лунок при длине волны 540 нм или 570 нм из значений, полученных при 450 нм. Считывание только при 450 нм может быть выше и менее точным по сравнению с двухволновым считыванием.

* Образцы могут требовать разбавления. См. раздел Подготовка образцов.

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

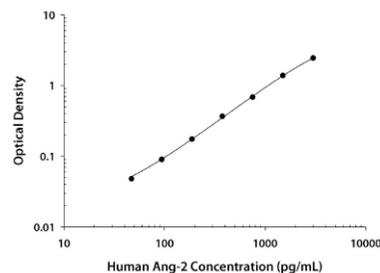
Рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта, контроля и образца и вычитите среднее значение О.П. нулевого стандарта.

Используя графическую бумагу, отметьте точки рассчитанных значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую. Оптимально может использоваться график в координатах log/log, для log трансформации может быть использован регрессионный анализ.

Для определения концентрации Ang-2 каждого образца сначала найдите соответствующее значение О.П. на оси y и проведите горизонтальную линию до пересечения с калибровочной кривой. Затем из точки пересечения проведите вертикальную линию до пересечения с осью x. Значение на оси X в точке пересечения будет соответствовать концентрации Ang-2 в образце. Так как образцы разводили, то значение найденной концентрации необходимо умножить на коэффициент разведения.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Пример результатов измерения стандартов Ang-2. Эти данные приводятся только в качестве примера. Стандартная кривая должна строиться для каждой серии анализов:



пг/мл	ОП	Среднее ОП	Скорректированное
0	0.026 0.027	0.027	---
46.9	0.074 0.076	0.075	0.048
93.7	0.114 0.120	0.117	0.090
187.5	0.197 0.206	0.202	0.175
375	0.391 0.398	0.395	0.368
750	0.701 0.728	0.715	0.688
1500	1.394 1.418	1.406	1.379
3000	2.454 2.506	2.480	2.453

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась путем 20 определений на одном планшете.

Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями исследований определялась анализом трех образцов сыворотки с известной концентрацией 40 раз в независимых сериях анализа.

Внутри серии:

Образец	Образец 1	Образец 2	Образец 3
n	20	20	20
Среднее значение, (пг/мл)	237	703	1301
Стандартное отклонение	16.4	45.6	54.4
Коэффициент вариации CV, (%)	6.9	6.5	4.2

Между сериями:

Образец	Образец 1	Образец 2	Образец 3
n	40	40	40
Среднее значение, (пг/мл)	276	805	1494
Стандартное отклонение	28.8	73.0	111
Коэффициент вариации CV, (%)	10.4	9.1	7.4

ИЗВЛЕЧЕНИЕ

Извлечение Ang-2, добавленного в образцы с различными концентрациями белка, охватывающими весь измеряемый диапазон, было определено для различных матриц.

Тип образца	Среднее извлечения, %	Диапазон
Культуральная среда (n=4)	103	98-113%
Сыворотка* (n=4)	100	90-107%

Гепариновая плазма (n=4)	94	85-104%
ЭДТА плазма (n=4)	95	87-104%

*Образцы были разбавлены перед анализом.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Образцы с высоким содержанием, или насыщенные до высокой концентрации Ang-2, были серийно разведены *Растворителем для Калибратора* и проанализированы.

	Культуральная среда (n=4)	Сыворотка* (n=4)	ЭДТА плазма* (n=4)	Гепариновая плазма* (n=4)	Слюна (n=4)
1:2					
Среднее ожидаемое, %	100	95	97	95	105
Диапазон, %	98-102	87-103	93-103	89-101	101-110
1:4					
Среднее ожидаемое, %	97	95	95	94	107
Диапазон, %	90-103	86-112	93-98	88-101	100-112
1:8					
Среднее ожидаемое, %	96	95	100	91	107
Диапазон, %	87-105	87-114	89-113	87-100	104-112

* Образцы сыворотки перед анализом были разведены

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Минимально определяемая концентрация (MDD) или чувствительность метода составила 8.29 пг/мл. Чувствительность была рассчитана добавлением 2 стандартных отклонений к среднему значению оптической плотности 20 измеренных реплик стандарта 0 нг/мл и расчетом соответствующей концентрации.

КАЛИБРОВКА

Данный иммуноферментный метод был прокалиброван по высокочистому препарату NSO рекомбинантного человеческого Ang-2.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Сыворотка/плазма - Данным методом были протестированы образцы сыворотки и плазмы.

Тип образца	Среднее (пг/мл)	Диапазон (пг/мл)	Стандартное отклонение, пг/мл
Сыворотка (n=60)*	2494	1065-8907	1341
ЭДТА плазма (n=35)	1964	1071-4389	808
Гепариновая плазма (n=35)	2049	1009-4973	913

* Образцы были разведены. ND - не обнаружено

Слюна - Девять образцов были оценены на наличие Ang-2 в данном анализе, и значения варьировались от 247 - 822 пг/мл.

Супернатанты клеточных культур – Две культуры HUVEC пупочной вены человека эндотелиальных клеток выращивали до слияния в EGM с добавлением 2% фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина и экстракта бычьего мозга. Аликвоты супернатантов клеточных культур были извлечены, и анализировались в отношении уровней природного Ang-2.

Образец	Значения (пг/мл)
Культура HUVEC 1	2326
Культура HUVEC 2	7611

Примечание: Значительные уровни Ang-2 находятся в эмбриональной бычьей сыворотке, сыворотке крупного рогатого скота, свиней, лошадей, и кроликов. Фоновый уровень Ang-2 в контрольной среде должен быть определен и вычитается из образцов кондиционированной среды.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Данный метод распознаёт рекомбинантную и нативную формы человеческого Ang-2. Факторы, перечисленные ниже, были приготовлены в концентрации 50 нг/мл в буферах для разведения стандарта и были проанализированы на перекрестную реактивность. Приготовленные нижеперечисленные факторы в концентрации 50 нг/мл в среднем диапазоне контролей были проанализированы на интерференцию. Не обнаружено значительной перекрестной реактивности, за исключением Ang-2-подобных белков, как указано. Интерференция не была обнаружена ни для одного из протестированных веществ.

Рекомбинантные, человека:

ANG	VEGF ₁₂₁
Ang-1	VEGF ₁₆₅
Tie-2	VEGF/PIGF



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
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