

НАБОР

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНГИОТЕНЗИНА II В ОБРАЗЦАХ ПЛАЗМЫ, СЫВОРОТКИ И КУЛЬТУРЫ СУПЕРНАТАНТА ЧЕЛОВЕКА

EA3501-1, Human Angiotensin II ELISA

Каталог. № : **EA3501-1**
Количество : **96**
Производитель: **AssayPro, (США)**

Версия 1.9



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

ВВЕДЕНИЕ

Ангиотензин II, основной эффекторный пептид в ренин-ангиотензиновой системе, действует как стимулятор роста и ангиогенный фактор посредством 1-го типа рецепторов ангиотензина II (1). Предположительно Ангиотензин II участвует в регуляции клеточной пролиферации (2), ангиогенезисе (3), воспалении (4) и раке (1).

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор AssayMax человеческого ангиотензина II ELISA предназначен для обнаружения ангиотензина II в плазме, сыворотке и супернатантах клеточных культур человека. Этот анализ использует количественную методику иммуноферментного анализа типа сэндвич, которая измеряет ангиотензин II менее, чем за 5 часов. Поликлональные антитела, специфичные для ангиотензина II, были предварительно нанесены на микропланшет. Ангиотензин II в стандартах и образцах зажат иммобилизованным антителом и специфическим биотинилированным поликлональным антителом ангиотензина II, который распознается конъюгатом стрептавидин-пероксидазы. Все несвязанные материалы затем вымываются и субстрат фермента пероксидазы добавляется. Развитие цвета останавливается, и интенсивность цвета измеряется.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- **Подготовить все реагенты (рабочий буфер для разведения, промывочный буфер, стандарты, биотинилированное антитело и SP-конъюгат) в соответствии с инструкцией, перед запуском теста.**
- **Подготовьте все образцы до проведения анализа. Фактор разбавления для образцов указан в настоящем Протоколе. Тем не менее, пользователь должен самостоятельно определить оптимальный коэффициент разбавления.**
- **Осадить частицы во флаконе SP-конъюгата и во флаконе биотинированного антитела перед их открытием и использованием.**
- Этот набор предназначен для использования в исследовательских целях.
- Набор не следует использовать по истечении срока годности.
- Стоп раствор является кислым раствором.

РЕАГЕНТЫ

- **Микропланшет Человеческого ангиотензина II:** 96-луночный полистироловый микропланшет (12 стрипов по 8 лунок), покрытый поликлональным антителом к ангиотензину II.
- **Уплотнительные ленты:** Каждый комплект содержит 3 нарезанные, чувствительные к давлению уплотнительные ленты, которые могут быть подогнаны под формат индивидуального анализа.
- **Стандарт Человеческого ангиотензина II:** ангиотензин II в буферной белковой основе (8 нг, лиофилизированный).
- **Биотинилированное антитело Человеческого ангиотензина II:** 80х биотинилированное поликлональное антитело к ангиотензину II (100 мкл).
- **Концентрат разбавителя ИФА (10х):** 10х концентрированная буферная белковая основа (20 мл).
- **Концентрат промывочного буфера (20х):** 20х концентрированные буферные поверхностно-активные вещества (30 мл, 2 бутылки).
- **Конъюгат стрептавидин-пероксидазы (SP-конъюгат):** 100х концентрат (80 мкл).

- **Субстрат хромогена:** готовый к использованию стабилизированный пероксидазой хромогенный субстрат тетраметилбензидина (8 мл).
- **Стоп раствор:** 0,5 N соляной кислоты для остановки реакции хромогенного субстрата (12 мл).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

- Храните компоненты набора при температуре 2-8 °C или -20 °C по прибытии до истечения срока годности.
- Храните SP-конъюгат и биотинилированное антитело при -20 °C.
- Храните микропланшет, концентрат разбавителя (10х), моющий буфер, стоп раствор, и субстрат хромогена при температуре 2-8 °C.
- Неиспользованные лунки микроплшета могут быть возвращены в пакет из фольги с осушителем и запечатаны. Хранить до 1 месяца в вакуумном эксикаторе.
- Разбавитель (1х) хранить до 1 месяца при 2-8 °C.
- Хранить стандарт при 2-8 °C перед восстановлением с разбавителем и при -20 °C, после восстановления с разбавителем.

ДРУГИЕ НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетное считывающее устройство, способное измерять оптическую плотность при 450 нм.
- Пипетки (1-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл и многоканальная).
- Деионизированная или дистиллированная вода класса реагента.

ЗАБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

- **Плазма:** собрать плазму, используя 1/10 объема 0,1 M цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Центрифугировать образцы при 3000g в течение 10 минут. Удалить плазму и провести анализ. Неразбавленные образцы можно хранить при -20 °C или ниже в течение 3 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания. (Образцы плазмы должны содержать о-фенантролина 0,44 мМ, 25 мМ ЭДТА, 1 мМ р-гидрокси-тегсигibenzoic кислоты и пепстатина А 0,12 мМ). Для низкого уровня ангиотензина II, воспользуйтесь протоколом экстракции, указанным ниже:

Протокол экстракции Ангиотензина II

Буфер А: 1% трифторуксусной кислоты (TFA, HPLC) в H₂O Буфер D: 60% ацетонитрила (HPLC) в 1% TFA

1. Подкислить образец с равным количеством буфера А (1 мл образца: 1 мл буфера А). Перемешать и Центрифугировать образцы при 6000g в течение 20 минут при 4 °C.
2. Тампонировать экстракционную колонку с использованием 200 мг смолы С18. Предварительно уравновесить колонку с 1 мл буфера В один раз, а затем с 3 мл буфера А три раза.
3. Загрузить подкисленный раствор плазмы на предварительно обработанную С18 колонку.
4. Медленно промыть колонку 3 мл буфера А дважды.
5. Элюировать пептид медленно с 3 мл буфера В один раз и собрать элюент.
6. Выпарить и высушить элюент в сублимационной камере или использовать подходящую замену.
7. Хранить высушенный экстракт при -20 °C и выполнять исследование как можно раньше. Развести высушенный экстракт 200 мкл разбавителя ИФА перед анализом. Проверьте pH пробы с pH бумагой. Если pH образца ниже 6,5, нейтрализовать образец с 20 мкл 1 M NaH₂PO₄. Если значение пептида превышает или не попадает в диапазон обнаружения, разбавьте или концентрируйте образец соответственно.

- **Сыворотка:** Образцы должны быть собраны в сывороточную сепараторную пробирку. После формирования сгустка, центрифугировать образцы при 3000g в течение 10 минут. Удалить сыворотку и провести анализ. Неразбавленные образцы можно хранить при -20 °C или ниже в течение 3 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания. (Образцы сыворотки должны содержать о-фенантролина 0,44 мМ, 25 мМ ЭДТА, 1 мМ р-гидрокси-тегсигibenzoic кислоты и пепстатина А 0,12 мМ). Для низкого уровня ангиотензина II, воспользуйтесь протоколом экстракции, как описано выше.
- **Супернатанты Культуры клеток:** среда культуры клеток должна содержать должны содержать о-фенантролина 0,44 мМ, 25 мМ ЭДТА, 1 мМ р-гидрокси-тегсигibenzoic кислоты и пепстатина А 0,12 мМ в процессе культивирования. После роста клеток до идеальной плотности, удалить культуральную среду и центрифугировать среду культуры клеток при 3000 g в течение 10 мин для удаления остатков. Собрать супернатанты и

добавить свежие о-фенантролин 0,44 мМ, 25 мМ ЭДТА, 1 мМ р-гидрокси-тегсигibenzoic кислоту и пепстатин А 0,12 мМ к среде и проанализировать. Неразбавленные образцы можно хранить при -20 °С или ниже в течение 3 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

- Свежеприготовленные реагенты привести к комнатной температуре перед использованием.
- **ИФА концентрат разбавителя (10х):** Если кристаллы образовались в концентрате, аккуратно перемешать, пока кристаллы полностью не растворятся. Развести концентрат разбавителя ИФА 1:10 очищенной водой. Хранить до 1 месяца при 2-8 °С.
- **Стандартная кривая:** Восстановить 8 нг стандарта человеческого ангиотензина II с 4 мл разбавителя ИФА для получения стандартного раствора 2 нг/мл. Позволить стандарту отстояться в течение 10 минут, слегка помешивая, перед разведениями. Развести стандарт (2 нг/мл) в соотношении 1:2 ИФА разбавителем для получения раствора 1 нг/мл. Подготовить точки стандарта в двух или трех повторах последовательным разбавлением стандартного раствора (1 нг/мл) 1:02 с равным объемом ИФА разбавителя для получения 0,5, 0,25, 0,125 и 0,063 нг/мл растворов. Разбавитель ИФА служит в качестве нулевого стандарта (0 нг/мл). Любой оставшийся раствор должен быть заморожен при температуре -20 °С и использован в течение 30 дней.

Standard Point	Dilution	[ANGII] (ng/ml)
P1	Standard (2 ng/ml) + 1 part EIA Diluent	1.000
P2	1 part P1 + 1 part EIA Diluent	0.500
P3	1 part P2 + 1 part EIA Diluent	0.250
P4	1 part P3 + 1 part EIA Diluent	0.125
P5	1 part P4 + 1 part EIA Diluent	0.063
P6	EIA Diluent	0.000

- **Антитела биотинилированного человеческого ангиотензина II (80х):** Коротко центрифугируйте конъюгат антител так, чтобы полностью собрать реагент на дне пробирки, и разведите необходимое количество конъюгата в 80 раз EIA буфером для разведения. Оставшиеся неиспользованными растворы должны храниться замороженными при -20°C.
- **Концентрат буфера для промывок (20х):** Разведите концентрат буфера для промывок в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой.
- **SP конъюгат (100х):** Коротко центрифугируйте SP конъюгат так, чтобы полностью собрать реагент на дне пробирки, и разведите необходимое количество конъюгата в 100 раз EIA буфером для разведения. Оставшиеся неиспользованными растворы должны храниться замороженными при -20°C.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Приготовьте все реагенты, рабочие разведения стандарта и образцы, как описано в данной инструкции. Перед началом анализа все реагенты должны достичь комнатной температуры. Тестирование выполняется при комнатной температуре (20-30 °С).
- Достаньте лишние стрипы из рамки-держателя и немедленно поместите их обратно в оригинальный алюминиевый пакет с осушителем. Тщательно закройте пакет для предотвращения попадания влаги и храните его в вакуумном эксикаторе.
- Внесите по 50 мкл стандартов или образцов в соответствующие лунки. Закройте лунки адгезивной пленкой и инкубируйте 2 часа. Установите таймер после внесения последнего образца.
- Промойте лунки 5 раз, используя по 200 мкл буфера для промывок на лунку на один цикл промывки. На каждом шаге переворачивайте микропланшет, сливайте жидкость из лунок, затем постучите 4-5 раз по фильтровальной бумаге, для полного удаления остатков жидкости из лунок.
- Внесите по 50 мкл биотинилированных анти-ангиотензин II антител во все лунки и инкубируйте в течение 2 часов.
- Промойте лунки 5 раз, используя по 200 мкл буфера для промывок на лунку на один цикл промывки. На каждом шаге переворачивайте микропланшет, сливайте жидкость из лунок, затем постучите 4-5 раз по фильтровальной бумаге, для полного удаления остатков жидкости из лунок.
- Внесите по 50 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидаза во все лунки и инкубируйте 30 минут. Включите микропланшетный ридер и запустите программу заранее.

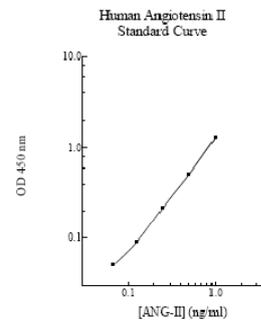
- Промойте лунки микропланшета 5 раз по 200 мкл буфера для промывок, как это описано выше.
- Внесите по 50 мкл хромогенного субстрата во все лунки и инкубируйте 20 минут или до развития оптимального окрашивания. Аккуратно постучите по краю микропланшета для тщательного перемешивания и удалите пузырьки воздуха с помощью наконечника для пипетки.
- Внесите по 50 мкл стоп-раствора во все лунки. Окрашивание изменится с голубого на желтое.
- Считайте абсорбцию (ОП) с помощью микропланшетного ридера при длине волны 450 нм **немедленно**.

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитайте среднее значение поглощения (ОП) для каждого триплета стандартов и образцов.
- Для построения калибровочной кривой используйте полулогарифмическую графическую бумагу, откладывая по оси ординат (Y) среднее значение ОП при 450 нм для каждого стандарта, а по оси абсцисс (X) соответствующие значения концентраций стандартов. Оптимальная кривая может быть получена регрессионным анализом с использованием log-log или 4- параметрической логистической аппроксимации.
- Определите концентрации в образцах по калибровочной кривой и умножьте полученное значение на соответствующий коэффициент разведения.

КАЛИБРОВОЧНАЯ КРИВАЯ

- Приведенная ниже калибровочная кривая дана только в демонстрационных целях. Калибровочная кривая должна быть включена в каждую постановку.



РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Минимально определяемая концентрация ангиотензина II составляет 0.06 нг/мл.
- Коэффициент вариации внутри и между сериями составляют 4.9 % и 7.0 %, соответственно.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

Виды	Перекрестная активность, %
Собаки (гончая)	Нет
Бычий	Нет
Обезьяны	>50 %
Мыши	Нет
Крысы	Нет
Свиньи	>40 %
Вещество	Перекрестная активность, %
Ангиотензин I	20%
Ангиотензин III	30%
Ангиотензин II	100%



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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