

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНА D В ОБРАЗЦАХ ПЛАЗМЫ, СЫВОРОТКИ, МОЧИ, СЛЮНЫ, МОЛОКА И СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

EI7800-1, Human IgD ELISA

Каталог. № : EI7800-1
Количество : 96
Производитель: AssayPro, (США)

Методика от 01-02-2013
Версия 2.0



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

ВВЕДЕНИЕ

Иммуноглобулин D (IgD) представляет собой антитело изотипа иммуноглобулина, который представляет собой мономер, состоящий из двух идентичных тяжелой и легкой цепей, организованных в изменчивые и постоянные области, аналогичные IgG. Он имеет растворимую и трансмембранную формы и обнаруживается как рецептор антигена на поверхности клеток (1). IgD является важной иммуномодулирующей молекулой, что способствует иммунной защите. Избыточная активность этого пути может вызвать воспаление и повреждение тканей (2). Сывороточные IgD были увеличены у пациентов со СПИДом, туберкулезом, эпидемическим гепатитом, болезнями органов дыхания (3-4).

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор AssayMax человеческого IgD ELISA предназначен для обнаружения Иммуноглобулина D в плазме, сыворотке, моче, слюне, молоке и супернатантах клеточных культур человека. Этот анализ использует количественную методику иммуноферментного анализа типа сэндвич, которой измеряется IgD менее, чем за 4 часа. Поликлональные антитела, специфичные для IgD, были предварительно нанесены на микропланшет. IgD в стандартах и образцах зажат иммобилизованным антителом и специфическим биотинилированным поликлональным антителом IgD, 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, промыточный 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 биотинилированного 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 IgD:** 96-луночный полистироловый микропланшет (12 стрипов по 8 лунок), покрытый поликлональным антителом к IgD.
- **Уплотнительные ленты:** Каждый комплект содержит 3 нарезанные, чувствительные к давлению уплотнительные ленты, которые могут быть подогнаны под формат индивидуального анализа.
- **Стандарт Человеческого IgD:** IgD в буферной белковой основе (8 нг, лиофилизированный).
- **Биотинилированное антитело Человеческого IgD:** 50х биотинилированное поликлональное антитело к IgD (140 мкл).
- **Концентрат разбавителя ИФА (10х):** 10х концентрированная буферная белковая основа (30 мл).

- **Концентрат промыточного 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), мощный 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. Развести образцы 1:100000 в разбавителе EIA и проанализировать. При необходимости разбавить пробы в пределах от 1:20000 до 1:200000. Неразбавленные образцы можно хранить при -20 °C или ниже в течение 3 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания. (EDTA или гепарин могут также использоваться в качестве антикоагулянта.)
- **Сыворотка:** Образцы должны быть собраны в сывороточную сепараторную пробирку. После формирования сгустка, центрифугировать образцы при 3000 x g в течение 10 минут и удалить сыворотку. Развести образцы 1:100000 в разбавителе EIA и проанализировать. При необходимости разбавить пробы в пределах от 1:20000 до 1:200000. Неразбавленные образцы можно хранить при -20 °C или ниже в течение 3 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.
- **Супернатанты клеточных культур:** Центрифугировать среду клеточной культуры при 3000 x g в течение 10 минут для удаления остатков. Собрать супернатанты и проанализировать. Хранить оставшиеся образцы при температуре -20 °C или ниже. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.
- **Моча:** Собрать образцы мочи, используя ёмкость для забора образца. Образцы центрифугировать при 800 x g в течение 10 минут. Развести образцы 1:10 в разбавителе EIA и проанализировать. Образцы можно хранить при -20 °C или ниже в течение 3 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.
- **Слюна:** Собрать образцы слюны, используя пробирки. Образцы центрифугировать при 800 x g в течение 10 минут. Развести образцы 1:100 в разбавителе EIA и проанализировать. Образцы можно хранить при -20 °C или ниже в течение 3 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.
- **Молоко:** взять образец молока с использованием пробирки. Образцы центрифугировать при 800 x g в течение 10 минут. Развести образцы 1:2000 в разбавителе EIA и проанализировать. Образцы можно хранить при -20 °C 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 °C.

- **Стандартная кривая:** Восстановить 8 нг стандарта человеческого IgD с 2 мл разбавителя ИФА для получения стандартного раствора 4 нг/мл. Позволить стандарту отстояться в течение 10 минут, слегка помешивая перед разведениями. Развести стандарт (4 нг/мл) в соотношении 1:2 ИФА разбавителем. Подготовить точки стандарта в двух или трех повторах последовательным разбавлением стандартного раствора (4 нг/мл) 1:2 с равным объемом ИФА разбавителя для получения 2, 1, 0.5, 0.25 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	[IgD] (ng/ml)
P1	Standard Stock (4 ng/ml) + 1 part EIA Diluent	2.000
P2	1 part P1 + 1 part EIA Diluent	1.000
P3	1 part P2 + 1 part EIA Diluent	0.500
P4	1 part P3 + 1 part EIA Diluent	0.250
P5	1 part P4 + 1 part EIA Diluent	0.125
P6	1 part P5 + 1 part EIA Diluent	0.063
P7	EIA Diluent	0.000

- **Антитела биотинилированного человеческого IgD (50x):** Центрифугируйте конъюгат антител так, чтобы полностью собрать реагент на дне пробирки, и разведите необходимое количество конъюгата 1:50 EIA буфером для разведения. Оставшиеся неиспользованными растворы должны храниться замороженными при -20°C.
- **Концентрат буфера для промывок (20x):** Если кристаллы образовались в концентрате, аккуратно перемешать, пока кристаллы полностью не растворятся. Разведите концентрат буфера для промывок в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой.
- **SP конъюгат (100x):** 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 °C).
- 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. Если вы используете машину, промойте 6 раз 300 мкл промывочного буфера, а затем переверните пластину для полного удаления содержимого; постучать 4-5 раз по впитывающей бумаге, чтобы полностью удалить жидкость.
- Внесите по 50 мкл биотинилированных IgD антител во все лунки и инкубируйте в течение 1 часа.
- Промойте планшет как описано выше.
- Внесите по 50 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидаза во все лунки и инкубируйте 30 минут. Включите микропланшетный ридер и запустите программу заранее.
- Промойте лунки микропланшета как это описано выше.
- Внесите по 50 мкл хромогенного субстрата во все лунки и инкубируйте 15 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**. Если доступна коррекция длины волны, вычтите показания при 570 нм от полученных при 450 нм для исправления оптических недостатков. В противном случае, считывайте результаты только при 450 нм. Пожалуйста, обратите внимание, что

некоторые черные нестабильные частицы могут собираться на высоких точках концентрации после остановки реакции в течение 10 минут, что приведет к снижению показаний.

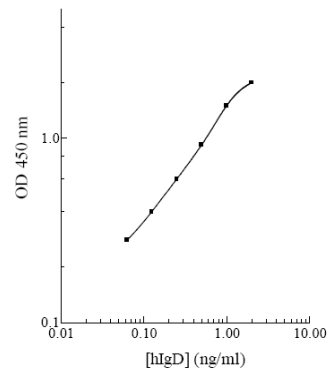
РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 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.

Human IgD Standard Curve



ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ

- Минимально определяемая концентрация IgD составляет 0.06 нг/мл.
- Коэффициенты вариации внутри и между сериями составляют 4.8 % и 7.1 %, соответственно.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Разведение образца	Плазма	Сыворотка
1:20000	90 %	94 %
1:100000	99 %	100 %
1:200000	103 %	106 %

Разведение образца	Слюна
1:50	85 %
1:100	97 %
1:200	105 %

Разведение образца	Моча
1:10	89 %
1:20	98 %
1:40	101 %

Разведение образца	Молоко
1:1000	95 %
1:2000	100 %
1:4000	102 %

ВОССТАНОВЛЕНИЕ

Значение стандартного добавления	0.06 - 1 нг/мл
Восстановление %	86 - 107 %
Среднее восстановление %	98 %

ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

Виды	Перекрестная активность, %
Собачий	Нет
Бычий	Нет
Обезьяны	< 2 %
Мыши	< 2 %
Крысы	Нет
Свиньи	Нет
Кролика	Нет

Иммуноглобулины	Перекрестная активность, %
IgA	Нет
IgM	Нет
IgG1	Нет
IgG2	Нет
IgG3	Нет
IgG4	Нет
IgD	100%
IgE	Нет



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