

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО/МЫШИНОГО/ КРЫСИНОГО ВАСПИНА

EIA-VAP-1, Human/Mouse/Rat Vaspin Enzyme Immunoassay Kit

Каталог. № : EIA-VAP-1
Количество : 96
Производитель: RayBiotech,
Inc. (США)

Версия 1.1



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

1. ВВЕДЕНИЕ

Полученный из висцеральной жировой ткани серпин (Васпин), член семейства сериновых протеаз, является адипокином с потенциальными антипротеазными свойствами. сДНК была выделена из белой жировой ткани (VAT) Otsuka Long-Evans Tokushima fatty крыс (OLETF), животная модель абдоминального ожирения с " типом сахарного диабета. Человеческий, мышинный и крысиный Васпин состоит из 395, 394 и 392 аминокислотных остатков соответственно. Васпин принадлежит к семейству ингибиторов протеаз и выявляет около 40% гомологии с 1-антитрипсином.

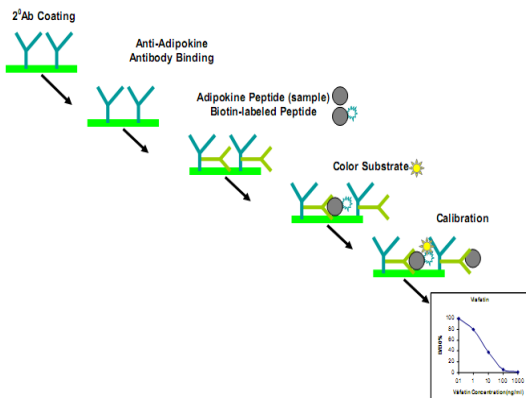
Исследования Васпина проводятся для идентификации потенциального белкового субстрата для развития терапии антипротеазными ингибиторами, что может улучшить чувствительность к инсулину при метаболическом синдроме.

2. ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ

Набор является количественным тестом *in vitro* для детекции пептида Васпина, основанного на принципе конкурентного иммуноферментного анализа.

Микропланшет покрыт антикरोлическими вторичными антителами. После шага блокирования и инкубации планшета с анти-Васпиновыми антителами, оба - биотинилированный Васпин и Васпин стандарта или образца конкурентно взаимодействует с Васпиновыми антителами. Связанный биотинилированный Васпин затем взаимодействует со стрептавидин-HRP, который катализирует реакцию с развитием цвета. Интенсивность колориметрического сигнала прямо пропорциональна количеству комплекса биотинилированный пептид – стрептавидин- HRP и обратно пропорциональна количеству Васпина в стандарте или образце. Это обусловлено конкурентным связыванием Васпиновых антител между биотинилированным Васпином и Васпином стандарта или образца. По известной концентрации стандартов Васпина строится калибровочная кривая и соответственно рассчитывается концентрация Васпина в образце.

КАК РАБОТАЕТ НАБОР



3. РЕАГЕНТЫ

1. Микропланшет Васпина – 96 ячеек (12 стрипов по 8 ячеек), покрытых вторичными антителами.

2. Концентрат промывочного буфера (20x), 25 мл
3. Стандарт Васпина, 2 флакона, человеческий пептид Васпина
4. Анти-Васпиновые поликлональные антитела, 2 флакона
5. Рабочий растворитель А, 30 мл, содержит 0,09% азид натрия в качестве консерванта. Растворитель для стандартов и образцов (сыворотка/плазма).
6. Рабочий растворитель В, 15 мл концентрированного 5x буфера. Для разбавления стандартов/образцов (среда культуры клеток/моча).
7. Биотинилированный Васпин, 2 флакона.
8. Концентрат HRP-стрептавидин – 8 мкл 25,000x концентрата стрептавидина, конъюгированного с HRP.
9. Позитивный контроль – 1 флакон.
10. Субстрат одношаговый ТМВ – 12 мл тетраметилбензидина в буфере.
11. Стоп-раствор – 8 мл 2М серной кислоты.
12. Диаграмма теста
13. Инструкция.

4. ХРАНЕНИЕ

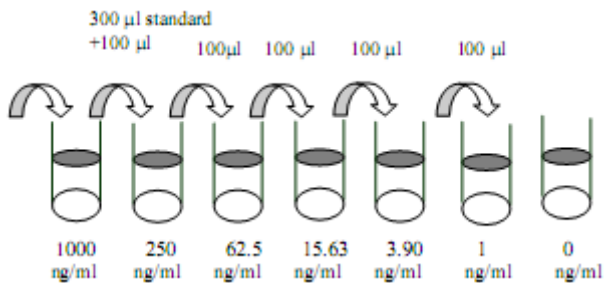
Набор может храниться до 6 месяцев при -20°C от даты отгрузки. Стандарты, биотинилированный Васпин и позитивный контроль храните при -20°C или -80°C (рекомендуется при -80°C) после прибытия. Открытый микропланшет и антитела могут храниться до 1 месяца при 2-8 °C. Возвратите неиспользованные ячейки в пакет с осушителем, запечатайте. Избегайте множественных заморозок/оттаиваний стандартов, биотинилированного Васпина и позитивного контроля.

5. ТРЕБУЕМЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер для измерения абсорбции при 450 нм.
2. Точные пипетки на от 2мкл до 1 мл.
3. Пипетки 1-25 мл для приготовления реагентов.
4. Градуированные цилиндры на 100 мл и 1 л
5. Абсорбирующая бумага.
6. Дистиллированная или деионизированная вода.
7. Программное обеспечение для проведения 4-параметрической лог-регрессии.
8. Пробирки для приготовления разведений стандартов или образцов.
9. Орбитальный шейкер.
10. Алюминиевая фольга.
11. Упаковка

6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Приведите все реагенты и образцы к комнатной температуре (18-25°C) перед использованием.
2. Кратко отцентрифугируйте флакон с анти-Васпиновыми антителами перед использованием. Внесите 50 мкл 1x рабочего дилуэнта В во флакон для приготовления концентрата детектирующих антител. Перемешайте слегка пипетированием и аспирацией. Концентрат анти-Васпиновых антител затем разбавляется в 100 раз 1x рабочим растворителем В. Это ваш рабочий раствор анти-Васпиновых антител, который будет использоваться в шаге 2 процедуры анализа.
3. Кратко отцентрифугируйте флакон с биотинилированным Васпином перед использованием. Внесите 5 мкл биотинилированного Васпина к 5 мл рабочего растворителя А (при использовании образцов сыворотки/плазмы) или 1x рабочего растворителя В (при использовании среды культуры клеток/мочи). Перемешайте слегка пипетированием и аспирацией. Конечная концентрация биотинилированного Васпина составит 10 нг/мл. Это разведение будет использовано в шаге 4 приготовления реагентов. Для образца и разведений позитивного контроля, см. шаги 5 и 6 приготовления реагентов.
4. Приготовление стандартов: Кратко отцентрифугируйте флакон со стандартом Васпина. В отдельную пробирку внесите 10 мкл стандарта Васпина в 990 мкл раствора биотинилированного Васпина (приготовленного в шаге 3 – см. выше.) для приготовления стандарта 1000 нг/мл. Перемешайте слегка пипетированием и аспирацией. Внесите 100 мкл стандарта Васпина 1000 нг/мл в пробирку с 300 мкл раствора биотинилированного Васпина. Это будет стоковый раствор стандарта (250 нг/мл Васпина, 10 нг/мл биотинилированного Васпина). Внесите 300 мкл раствора биотинилированного Васпина в 6 пробирок. Используйте стоковый раствор для приготовления серийных разведений, как показано ниже. Тщательно перемешайте содержимое пробирки перед следующим переносом. Биотинилированный Васпин служит нулевым стандартом (0 нг/мл).



- Разбавление образцов. Если ваши образцы нуждаются в разведении, используйте рабочий растворитель А + биотинилированный Васпин для сыворотки/плазмы. Для среды культуры клеток и образцов мочи используйте 1х рабочий растворитель В + биотинилированный Васпин в качестве растворителя. Важно убедиться, что конечная концентрация биотинилированного Васпина 10 нг/мл во всех разбавленных образцах.

Например: для 4-х кратного разведения образца: сначала сделайте 1:10 разведение 10 мкг/мл биотинилированного Васпина добавлением 2 мкл биотинилированного Васпина к 18 мкл соответствующего рабочего растворителя, перемешайте пипетированием/аспирацией. В отдельную пробирку пипетируйте 148 мкл соответствующего рабочего растворителя, 2 мкл 1:10 биотинилированного Васпина и 50 мкл вашего биологического образца, перемешайте.

- Разведение позитивного контроля. Кратко отцентрифугируйте флакон с позитивным контролем. Внесите в этот флакон 103 мкл рабочего растворителя В и 2 мкл разведенного в 10 раз биотинилированного Васпина.
- Разведите рабочий растворитель В 5-кратно, деионизированной или дистиллированной водой.
- Если 20х промывочный концентрат содержит видимые кристаллы, подогрейте к комнатной температуре и слегка перемешайте до полного растворения. Разбавьте 20 мл концентрата промывочного раствора деионизированной или дистиллированной водой для получения 400 мл 1х промывочного буфера.
- Кратко отцентрифугируйте флакон с концентратом HRP-стрептавида перед использованием. Концентрат HRP-стрептавида нужно разбавить в 25,000 раз с помощью 1х рабочего растворителя В.
Например: для 10000 кратного разведения концентрата HRP-стрептавида, кратко отцентрифугируйте флакон. Внесите 2 мкл концентрата HRP-стрептавида в пробирку с 198 мкл 1х рабочего растворителя В для приготовления 100-кратного разведения (не храните разбавленный раствор для использования следующего дня!). Тщательно перемешайте и затем внесите 100 мкл приготовленного 100 кратного разведения в пробирку с 10 мл 1х рабочего растворителя В для приготовления конечного 10,000 – кратного разведения.

7. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

- Приведите все реагенты и образцы к комнатной температуре (18-25°C) перед использованием. Рекомендуется все стандарты и образцы ставить как минимум в дублях.
- Внесите 100 мкл анти-Васпиновых антител (см. приготовление реагентов, шаг 2) в каждую ячейку и инкубируйте 1,5 часа.
- Удалите раствор и промойте ячейки 5 раз 1х промывочным раствором (200 мкл на каждую).
- Внесите 100 мкл каждого стандарта (см. приготовление реагентов шаг 3), позитивного контроля (см. приготовление реагентов шаг 6) и образцов в соответствующие ячейки. Накройте ячейки и инкубируйте 2,5 часа при комнатной температуре или на протяжении ночи при 4°C.
- Удалите раствор и промойте ячейки 4 раза 1х промывочным раствором (200 мкл на каждую).
- Внесите 100 мкл приготовленного раствора HRP-стрептавида (см. приготовление реагентов шаг 7) в каждую лунку. Инкубируйте 45 минут при комнатной температуре.
- Удалите раствор и промойте ячейки 5 раз 1х промывочным раствором (200 мкл на каждую).
- Внесите 100 мкл реагента ТМБ-субстрата в каждую ячейку. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре в темноте.
- Внесите 50 мкл стоп-раствора в каждую ячейку. Считайте при 450 нм незамедлительно.

8. РЕЗЮМЕ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Подготовить все реагенты, образцы и стандарты как указано выше.



- Добавить 100 мкл антител анти-Васпина (1000X разведение) в каждую лунку. Инкубировать 1.5 часа при КТ.



- Добавить 100 мкл стандартных пептидов или образца, смешанных с биотинилированным пептидом Васпина, в каждую лунку. Инкубировать 2.5 часа при КТ или на протяжении ночи при 4 °С.



- Добавить 100 мкл приготовленного раствора Стрептавида. Инкубировать 45 минут при КТ.



- Добавить 100 мкл Реагента Субстрата ТМБ в каждую лунку. Инкубировать 30 минут при КТ.



- Добавить 50 мкл Стоп Раствора в каждую лунку. Считать результаты при 450 нм немедленно.

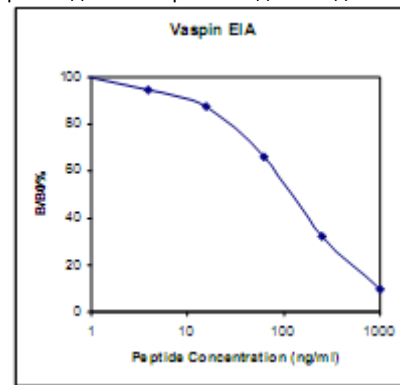
9. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитайте среднюю абсорбцию для каждого из дубликатов стандартов, контролей и образцов и вычтите из нее абсорбцию бланка. Постройте калибровочную кривую, используя программное обеспечение, с концентрацией по оси X стандартов, и процент абсорбции (полученный при калькуляции) по оси Y. Проведите оптимальную кривую по точкам.

Процент абсорбции = $(V - \text{ОП бланка}) / (V_0 - \text{ОП бланка})$
 где V = ОП образца или стандарта
 V₀ = ОП "0" стандарта (полное связывание)

А. ТИПИЧНЫЕ ДАННЫЕ

Приведенная стандартная кривая только для демонстрации. Стандартная кривая должна строиться для каждого исследования.



В. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Минимально определяемая доза Васпина – 2.62 нг/мл или 55.53 пМ.

С. ЛИНЕЙНОСТЬ

1-100 нг/мл

Д. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Внутри набора: CV < 10%.
 Между наборами: CV < 15%.

10. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Перекрестная реактивность: Набор не показал перекрестной реактивности с протестированными цитокинами: Висфатином, Несфатином, Ангиотензином II, NPY и APC.

11. РЕКОМЕНДОВАННЫЕ ФАКТОРЫ РАЗВЕДЕНИЯ (для большинства сывороток/плазм)

CYTOKINE	HUMAN		MOUSE		RAT
	Serum	Plasma	Serum	Plasma	Serum
Visfatin	4X-8X	4X-8X	4X-8X	4X-8X	2X-8X
Nesfatin	4X-8X	4X-8X	4X-8X	4X-8X	2X-4X
Ghrelin	4X-8X	2X	4X-8X	2X	2X
APC	4X	4X-8X	4X-8X	4X-8X	2X
Angiotensin II	4X	4X-8X	4X-8X	4X-8X	4X-8X
NPY	4X	2X	4X-8X	2X	2X
CART	4X-8X	4X-8X	2X-4X	2X	not tested

*2X – рекомендуемое разведение образца для Васпина.

12. РУКОВОДСТВО ПО УСТРАНЕНИЮ НЕПОЛАДOK

Проблема	Причина	Решение
1. Низкого качества Стандартная кривая	1. Неточное пипетирование 2. Неправильное разведение стандарта	1. Проверить пипетки 2. Убедитесь, что содержимое флакона С перемешано и порошок растворен тщательным перемешиванием.
2. Слабый сигнал	1. Слишком короткое время инкубации 2. Несоответствующие объемы реагента или неправильное разведение	1. Обеспечить достаточное время инкубации; шаг 2 процедуры анализа изменить на инкубацию в течение ночи 2. Проверить пипетки и обеспечить корректную подготовку
3. Высокое значение CV	1. Неточное пипетирование	1. Проверить пипетки
4. Завышенный фон	1. Недостаточная промывка планшета 2. Загрязненный Промывочный Буфер	1. Просмотреть инструкцию относительно надлежащей промывки. Если используется планшетный вошер, убедитесь, что все работает беспрепятственно. 2. Приготовить свежий Промывочный Буфер
5. Низкая чувствительность	1. Ненадлежащее хранение набора 2. Стоп Раствор	1. Хранить стандарт при < -20 °C после восстановления, остальные реагенты при 4 °C. Хранить раствор субстрата в защищенном от света месте 2. Стоп Раствор добавлять в каждую лунку перед измерением



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