

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО/МЫШИНОГО/ КРЫСИНОГО ВАСПИНА

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

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

Методика от 15-03-2012
Версия 2.2



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.

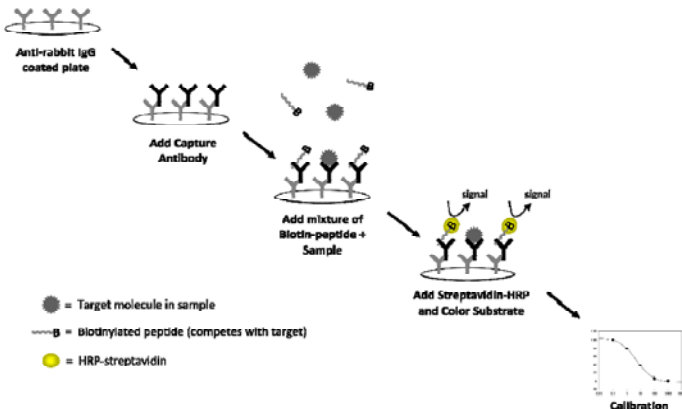
Исследования Васпина проводятся для идентификации потенциального белкового субстрата для развития терапии антипротеазными ингибиторами, что может улучшить чувствительность к инсулину при метаболическом синдроме.

2. ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ

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

Микропланшет покрыт антикриолическими 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 (Элемент А): – 96 ячеек (12 стрипов по 8 ячеек), покрытых вторичными антителами.

2. Концентрат промывочного буфера (20x) (Элемент В): 25 мл
3. Стандарт Пептида Васпина (Элемент С): 2 флакона, 10 мкл/флакон
4. Анти-Васпиновые поликлональные антитела (Элемент N): 2 флакона, 5 мкл/флакон
5. Рабочий растворитель А (Элемент D): 30 мл, содержит 0,09% азид натрия в качестве консерванта. Растворитель для стандартов и образцов (сыворотка/плазма).
6. Рабочий растворитель В (Элемент E): 15 мл концентрированного 5x буфера. Для разбавления стандартов/образцов (среда культуры клеток/моча).
7. Биотинилированный Васпин (Элемент F): 2 флакона, 20 мкл/флакон
8. Концентрат HRP-стрептавидин (Элемент G): 600 мкл 500x концентрата стрептавидина, конъюгированного с HRP.
9. Позитивный контроль (Элемент M): 1 флакон, 100 мкл
10. Субстрат одношаговый ТМВ (Элемент H): 12 мл тетраметилбензидаина в буфере.
11. Стоп-раствор (Элемент I): 8 мл 0.2M серной кислоты.
12. Диаграмма теста (Элемент J)
13. Инструкция (Элемент K)

4. ХРАНЕНИЕ

- Стандарт, Биотинилированный пептид Васпина и положительный контроль следует хранить при температуре -20 °C или -80 °C (рекомендуется при -80 °C) после прибытия. **Следует избегать многократного замораживания-оттаивания.**
- Остальные компоненты набора хранить при -20 °C.
- Открытый Микропланшет и антитела могут храниться сроком до 1 месяца при 2-8 °C. Неиспользованные лунки вернуть в пакет, содержащий осушитель и герметично закрывающийся вдоль всего края.
- При хранении с соблюдением вышеуказанных условий RayBiotech гарантирует работу набора на протяжении 6 месяцев с даты отгрузки.

5. ТРЕБУЕМЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер для измерения абсорбции при 450 нм.
2. Точные пипетки на от 2 мкл 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

Если тестируются образцы плазмы или сыворотки, использовать Разбавитель образцов А для разведения Элемента F и Элемента С. Если тестируется среда для культивирования клеток или другие типы образцов, использовать Разбавитель образцов В для разведения Элемента F и Элемента С. Для разведения образца и положительного контроля см. шаги 6, 7, 8 и 10 из приготовления реагентов.

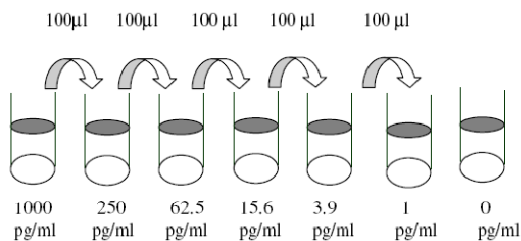
1. Держите реагенты на льду во время подготовительных шагов. Привести пластину к комнатной температуре перед открытием герметичной упаковки.
2. Рабочий растворитель В (Элемент E) необходимо развести в 5 раз деионизированной или дистиллированной водой.
3. Кратко отцентрифугируйте флакон с антителами Анти-Vaspin (Элемент N) перед использованием. Добавить 50 мкл 1x Рабочего растворителя В во флакон для приготовления концентрата детектирующего антитела. Пипетировать вверх и вниз, чтобы аккуратно перемешать.
4. Концентрат антител развести в 100 раз с 1x Рабочего растворителя В. Это ваш рабочий раствор анти-Васпиновых антител, который будет использоваться в шаге 2 процедуры анализа.

ПРИМЕЧАНИЕ: следующие шаги можно проводить во время процедуры инкубации антител (шаг 2 Процедуры исследования).

5. Кратко отцентрифугируйте флакон с биотинилированным Васпином (Элемент С) перед использованием. Внесите 5 мкл Элемента F к 5 мл соответствующего Рабочего растворителя. Перемешайте слегка пипетированием и аспирацией. **Конечная концентрация биотинилированного Васпина составит 100 пг/мл.** Это разведение будет использовано в шаге 6 приготовления реагентов.

6. **Приготовление стандартов:** Маркировать 7 микропробирок со следующими концентрациями: 1000 пг/мл, 250 пг/мл, 62.5 пг/мл, 15.6 пг/мл, 3.9 пг/мл, 1 пг/мл и 0 пг/мл. Внесите 300 мкл биотинилированного раствора Васпина в каждую пробирку, за исключением 1000 пг/мл, (оставьте эту одну пустой). *Важно убедиться, что концентрация биотинилированного Vaspin составляет 100 пг/мл во всех стандартах.*

- a) Кратко отцентрифугируйте флакон со стандартом Васпина (Элемент С). В пробирку, помеченную как 1000 пг/мл, пипетировать 8 мкл Элемента С и 792 мкл 100 пг/мл биотинилированного раствора Vaspin (приготовленного в шаге 5). Это и есть стоковый раствор Vaspin (1000 пг/мл Vaspin, 100 пг/мл биотинилированный Vaspin). Тщательно перемешать.
- b) Чтобы приготовить стандарт 250 пг/мл, просто пипетируйте 100 мкл Стокового раствора Vaspin в пробирку 250 пг/мл. Тщательно перемешать.
- c) Повторите этот шаг с каждой последующей концентрацией, для приготовления серии разбавлений, как показано на рисунке ниже. Каждый раз использовать 300 мкл биотинилированного Висфатина и 100 мкл предварительной концентрации до тех пор, пока не будет достигнут раствор 1 пг/мл. Перемешивайте каждую пробирку тщательно перед следующей передачей.
- d) Последняя пробирка (0 пг/мл Vaspin, 100 пг/мл биотинилированный Vaspin) служит нулевым стандартом (или стандартом общего связывания).



7. Подготовить 10-кратное разбавление Элемента F. Для этого добавьте 2 мкл Элемента F к 18 мкл соответствующего Рабочего разбавителя. Этот раствор будет использоваться в шагах 8 и 10.

8. **Разведение Положительного контроля:** Кратко отцентрифугируйте флакон с позитивным контролем (Элемент М). Внесите в этот флакон 101 мкл 1x Рабочего растворителя В. Также добавьте 2 мкл разведенного в 10 раз Элемента F (приготовленного в шаге 7). Это и есть разбавление в 2 раза положительного контроля. Тщательно перемешать. Положительный контроль является образцом клеточной культуральной среды с ожидаемым сигналом от 10% до 30% от общего связывания (70-90% конкуренция), если разводили, как описано выше. Он может быть разбавлен еще больше, если это желательно, но удостоверьтесь, что конечная концентрация биотинилированного Vaspin 100 пг/мл.

9. Если Элемент В (20x промывочный концентрат) содержит видимые кристаллы, подогрейте до комнатной температуры и слегка перемешайте до полного растворения. Разбавьте 20 мл Концентрата Промывочного раствора деионизированной или дистиллированной водой для получения 400 мл 1x Промывочного буфера.

10. **Приготовление образцов:** Используйте рабочий растворитель А + биотинилированный Васпин для образцов сыворотки/плазмы. Для среды культуры клеток и других образцов используйте 1x Рабочий растворитель В + биотинилированный Васпин в качестве растворителя. *Важно убедиться, что конечная концентрация биотинилированного Васпина составляет 100 пг/мл во всех разбавленных образцах.* НАПРИМЕР: для 4-х кратного разведения образца смешать 2.5 мкл 10-кратного разведения Элемента F (приготовленного в шаге 7), 185 мкл соответствующего Рабочего растворителя и 62.5 мкл вашего образца; аккуратно перемешать. Общий объем составляет 250 мкл, достаточно для дублирующих лунок на микропланшете.

Не используйте Элемент F из шага 5 для пробоподготовки. Если вы планируете использовать неразбавленные образцы, вы все равно должны добавить биотинилированный Vaspin до конечной концентрации 100 пг/мл. ПРИМЕР: Добавьте 2.5 мкл 10-кратно разбавленного Элемента F к 247.5 мкл образца. ПРИМЕЧАНИЕ: Оптимальные коэффициенты разбавления образца должны быть определены эмпирически, однако вы можете обратиться в службу технической поддержки (888-494-8555; techsupport@raybiotech.com), чтобы получить рекомендуемые диапазоны разбавления для сыворотки или плазмы.

11. Кратко отцентрифугируйте флакон с концентратом HRP-стрептавидина (Элемент G) перед использованием. Концентрат HRP-стрептавидина нужно разбавить в 500 раз с помощью 1x рабочего растворителя В.

Примечание: Не используйте Рабочий разбавитель А для приготовления HRP-Стрептавидина в шаге 11.

7. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Держите реагенты на льду во время подготовительных шагов. Рекомендуется все стандарты и образцы ставить как минимум в дублях.
2. Внесите 100 мкл анти-Васпиновых антител (см. приготовление реагентов, шаг 4) в каждую ячейку и инкубируйте 1.5 часа при КТ при осторожном встряхивании (1-2 цикла/сек). Вы также можете инкубировать в течение ночи при температуре 4 °С.
3. Удалите раствор и промойте ячейки 4 раза 1x промывочным раствором (200-300 мкл на каждую). Промывка может проводиться с помощью многоканальной пипетки или автоматизированного планшетного вошера. Полное удаление жидкости на каждом шаге необходимо для хорошей производительности анализа. После последней промывки удалите оставшийся Промывочный буфер путем аспирации или декантации. Пластины переверните и постучите ею об чистые бумажные полотенца.
4. Внесите 100 мкл каждого стандарта (см. приготовление реагентов шаг 6), позитивного контроля (см. приготовление реагентов шаг 8) и образцов (см. приготовление реагентов шаг 10) в соответствующие ячейки. Не забудьте включить пустую лунку (Рабочий разбавитель только). Накройте ячейки и инкубируйте в течение 2.5 часов при комнатной температуре при осторожном встряхивании (1-2 цикла/сек) или в течение ночи при 4 °С.
5. Удалите раствор и промойте ячейки 4 раза как описано в шаге 3.
6. Внесите 100 мкл приготовленного раствора HRP-стрептавидина (см. приготовление реагентов шаг 11) в каждую лунку. Инкубируйте 45 минут при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Рекомендуется, чтобы время инкубации не было короче или длиннее, чем 45 минут.
7. Удалите раствор и промойте ячейки 4 раза как описано в шаге 3.
8. Внесите 100 мкл реагента ТМВ-субстрата (Элемент Н) в каждую ячейку. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре в темноте при осторожном встряхивании (1-2 цикла/сек).
9. Внесите 50 мкл стоп-раствора (Элемент I) в каждую ячейку. Считайте при 450 нм незамедлительно.

8. РЕЗЮМЕ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Подготовить все реагенты, образцы и стандарты как указано выше.
2. Добавить 100 мкл антител анти-Васпина в каждую лунку. Инкубировать 1.5 часа при КТ или в течение ночи при 4 °С.
3. Добавить 100 мкл стандарта или образца в каждую лунку. Инкубировать 2.5 часа при КТ или на протяжении ночи при 4 °С.
4. Добавить 100 мкл приготовленного раствора Стрептавидина. Инкубировать 45 минут при КТ.
5. Добавить 100 мкл Реагента Субстрата ТМБ в каждую лунку. Инкубировать 30 минут при КТ.
6. Добавить 50 мкл Стоп Раствора в каждую лунку. Считать результаты при 450 нм немедленно.

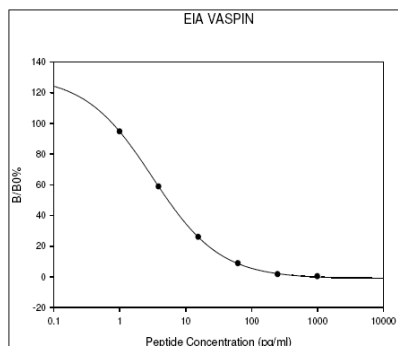
9. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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.



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

В. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Минимально определяемая доза Васпина – 26.2 пг/мл.

С. ЛИНЕЙНОСТЬ

1-10,000 пг/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.

12. РУКОВОДСТВО ПО УСТРАНЕНИЮ НЕПОЛАДКОВ

| 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 |