

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОСТАГЛАНДИНА E₂ (PGE₂) В СУПЕРНАТАНТЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК, ПЛАЗМЕ, СЫВОРОТКЕ И МОЧЕ

KGE004B, PGE₂ Assay

Каталог. № : **KGE004B**
 Количество : **96**
 Производитель: **R&D Systems (США)**

Методика от **04-2009**
 Версия **752043.4**



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 применять для диагностики.**

ВВЕДЕНИЕ

Простагландины (PG), тромбоксаны и лейкотриены относятся к классу простаноидов, производных ненасыщенной жирной кислоты - арахидоновой кислоты. Арахидоновая кислота высвобождается с мембранных фосфолипидов под действием фосфолираз, и преобразуется в PGG₂ и PGH₂ под воздействием циклооксигеназ COX-1 и COX-2, и превращается в PGE₂ с помощью простагландин E синтетазы (PGES) (1 - 3). PGE₂ обнаруживается во многих физиологических жидкостях и инактивируется в легких и печени ферментом простагландин дегидрогеназой и цитохром P-450 монооксигеназой. Существуют различные изоформы COX и PGES, которые конститутивно активны или могут быть индуцированы при воспалительных процессах. Синтез PGE₂ может быть блокирован кортикостероидами, которые ингибируют фосфолипазы или нестероидными противовоспалительными лекарственными препаратами (NSAIDs), ингибирующими циклооксигеназы (4, 5). PGE₂ продуцируется множеством различных тканей, включая бронхиоларные, гастроинтестинальные, сосудов, матки, гладкие мышцы мочевого пузыря, эмбриональный артериальный проток, плаценту, мозг, клетки плотного пятна (macula densa) почки, тестикулярные клетки Лейдига, мезенхимные стволовые клетки, моноциты и макрофаги (6-17). Увеличенные количества PGE₂ продуцируются при различных патологических состояниях, включая воспалительные процессы, артриты, лихорадку, повреждение ткани, эндометриоз и многие злокачественные опухоли (1, 7, 18-21).

Широкий спектр тканей, продуцирующих PGE₂ и множество дифференциально экспрессирующихся рецепторов и изоформ предсказали сложность PGE₂-индуцированных эффектов. В почке он индуцирует стимуляцию релиза ренина, а также активацию и ингибирование абсорбции соли и воды (10, 15, 16). В гладкой мускулатуре PGE₂ активирует как расслабление, так и сокращение, в зависимости от ткани (10, 22, 23). Он важен как при нормальных физиологических процессах так и как медиатор воспалительного ответа на повреждение ткани (18, 19, 24).

Активность PGE₂ связана с синтезом и релизом различных гормонов и эмбриональной гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой (7, 26). PGE₂ стимулирует дифференциацию и пролиферацию опухолевых клеток, опухоли-ассоциированную неоваскуляризацию (27, 28).

Набор PGE₂ Immunoassay производства R&D Systems' дает две возможности. Иммуноферментный конкурентный метод определения PGE₂ в супернатанте культуры клеток, плазме, сыворотке и моче, с обычной чувствительностью, 2,5 часа инкубации. Кроме того, в набор включена возможность проведения анализа в повышенной чувствительностью, при инкубации в течение ночи.

ПРИНЦИП МЕТОДА

В данной тест-системе используется количественный иммуноферментный анализ, основанный на конкурентном связывании, при котором PGE₂, присутствующий в образцах, конкурирует с фиксированным количеством конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) PGE₂ за сайты связывания на мышиных моноклональных антителах. В течение инкубации, мышиные моноклональные антитела связываются с козыми антимышинными антителами, сорбированными в лунках микропланшета. Последующая промывка удаляет несвязанный конъюгат и несвязавшиеся компоненты образцов, после чего в ячейки вносится раствор ферментного субстрата для определения ферментативной активности связавшегося конъюгата. Цветную реакцию останавливают и считывают оптическую плотность ячеек при 450 нм. Развитие окраски обратно пропорционально количеству PGE₂, присутствующего в образцах.

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 изменение 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. Зеленый цвет в лунках свидетельствует о том, что стоп-раствор не был тщательно перемешан с раствором субстрата.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Хранить невскрытый набор при ≤ -20° С в холодильнике с ручной разморозкой. Не использовать после окончания срока годности.

Реагент	№ реагента	Кат.№ DPG00	Кат.№ SPG00	Описание	Хранение открытых / восстановленных материалов
Козий Анти-мышинный Микропланшет	892575	1 планшет	6 планшетов	96-луночный полистириновый микропланшет (12 x 8 лунок), покрытый козыми антимышинными поликлональными антителами к PGE ₂	Верните оставшиеся стрипы в пакет. Неиспользованные стрипы храните в пакете при 2-8 °C 1 месяц*.
PGE ₂ Стандарт	893377	1 флакон	6 флаконов	25,000 пг/флакон PGE ₂ в буфере с консервантами,	Аликвотировать и хранить при ≤ 20 °C до

				лиофилизированный.	1 месяца в холодильнике с ручной разморозкой.*
PGE₂ Конъюгат	893375	1 флакон	6 флаконов	6 мл/флакон PGE ₂ , конъюгированных с пероксидазой хрена, с красным красителем и консервантами.	Можно хранить 1 месяц при температуре 2-8°C*
Раствор первых антител	893376	1 флакон	6 флаконов	6 мл/флакон мышинного моноклонального антитела к PGE ₂ в буфере с синим красителем и консервантами.	
Растворитель калибратора RD5-56	895612	2 флакона	12 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 консервантами.	
Цветной реагент А	895000	1 флакон	6 флаконов	12.5 мл/флакон стабилизированного раствора перекиси водорода	
Цветной реагент В	895001	1 флакон	6 флаконов	12.5 мл/флакон стабилизированного хромогена (тетраметилбензидин)	
Стоп-раствор	895926	1 флакон	6 флаконов	11 мл/флакон раствор 2 N серной кислоты	
Плётки для склеивания стрипов	Без номера	4 полоски	24 полоски	Адгезивные плёнки	

*Учитывая, что не заканчивается срок годности.

Набор KGE004B содержит достаточное количество материалов для запуска ИФА на одном 96-луночном планшете. Набор SKGE004B (SixPak) содержит достаточно материалов для запуска ИФА на шести 96-луночных планшетах.

Этот набор также доступен в PharmPak (R&D Systems, каталог № PKGE004B). PharmPaks содержит достаточно материала для проведения ИФА на 50 микропланшетах. Содержимое конкретного флакона может изменяться. Пожалуйста, обратитесь к литературе, сопровождающей ваш заказ, за данными по конкретным объемам каждого флакона.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный фотометр с длиной волны измерения 450 нм и фильтром сравнения 540 или 570 нм
- Дозаторы и наконечники к ним
- Деионизированная или дистиллированная вода
- Многоканальный дозатор и промывочная бутылка, либо автоматическое промывающее устройство
- Мерный цилиндр на 500 мл
- Горизонтальный орбитальный микропланшетный шейкер с возможностью установки скорости 500 ± 50 об/мин.
- Индометацин (пр-во Sigma кат. № I7378 или аналогичный).
- Контроли PGE₂ (опционально; могут быть заказаны в R&D Systems).

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Данный набор чувствителен к температуре. Комнатная температура должна быть 18-23 °С.

Стоп-раствор, входящий в состав данного набора, является раствором кислоты. При работе с данным реагентом рекомендуется использовать защитную одежду, очки и перчатки.

С PGE₂ Стандартом, входящим в набор, необходимо обращаться аккуратно, учитывая известные и неизвестные эффекты, оказываемые PGE₂.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

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

Содержание мышинных или крысиных IgG в образцах может влиять на результаты данного анализа.

Супернатанты культуры клеток - Удалите частицы центрифугированием. Анализируйте немедленно или аликвотируйте и храните при ≤ -20° С. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

Сыворотка* – используйте пробирки для разделения крови (SST). Дайте крови свернуться в течение 30 минут. Центрифугируйте 15 минут при 1000 x g. Анализируйте немедленно или аликвотируйте и храните при ≤ -20° С. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

Плазма* – Соберите плазму, используя гепарин или ЭДТА в качестве антикоагулянта. Центрифугируйте 15 минут при 1000 x g в течение 30 минут после сбора. Анализируйте немедленно или аликвотируйте и храните при ≤ -20° С. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

Замечание: *Использование цитрата в качестве коагулянта не было протестировано данным методом. Не используйте образцы с сильной липемией для тестирования данным методом.*

Моча – асептически соберите первую утреннюю мочу, непосредственно в стерильный контейнер. Удалите частицы центрифугированием. Анализируйте немедленно или аликвотируйте и храните при ≤ -20° С. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

***В образцы сыворотки или плазмы должен быть добавлен ингибитор простагландин синтетазы, такой как индометацин, с конечной концентрацией приблизительно 10 мкг /мл.**

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Все образцы должны быть разведены не менее, чем в 3 раза (например, 150 мкл образца + 300 мкл Буфера для разведения стандарта RD5-56).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

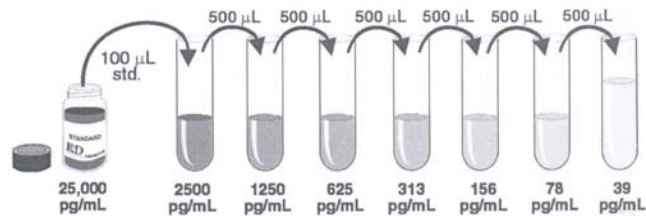
Позвольте всем реагентам достичь комнатной температуры перед использованием.

Промывающий буфер - Если в концентрате образовались кристаллы, нагрейте его до комнатной температуры и тщательно перемешайте, до полного растворения кристаллов. Разбавьте 20 мл концентрата дистиллированной или деионизированной водой до объема 500 мл.

Раствор субстрата - реагенты для развития окраски А и В должны быть смешаны в равных объемах не ранее, чем за 15 минут перед использованием. Защищайте от попадания света. На одну лунку необходимо по 200 мкл полученной смеси.

Стандарт PGE₂ - Разбавьте стандарт PGE₂ в 1 мл деионизированной или дистиллированной воды. После разведения получается стоковый раствор «25,000 пг/мл». Смешайте стандарт для обеспечения полного растворения и оставьте его как минимум на 15 минут с осторожным перемешиванием перед проведением разведений.

Внесите 900 мкл Буфера для разведения стандарта RD5-56 в пробирку, помеченную «2500 пг/мл» и по 500 мкл Буфера для разведения стандарта RD5-56 в остальные пробирки. Используя раствор «25,000 пг/мл» приготовьте серию разбавлений При приготовлении стандартов тщательно перемешивайте пробирки и меняйте наконечники перед каждым переносом. Раствор с концентрацией 2500 пг/мл служит самой высокой точкой калибровочной кривой, а Буфер для разведения стандарта RD5-56 служит точкой «0 пг/мл» (B₀).



ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приведите все реагенты и образцы к комнатной температуре перед началом анализа. Рекомендуется исследовать все образцы, стандарты и контроли в дублях.

1. Приготовьте все реагенты, рабочие стандарты и образцы согласно предыдущим разделам.
2. Выберите необходимое для анализа число стрипов, неиспользованные стрипы снова запечатайте в пакет с осушителем.
3. Внесите по 200 мкл Буфера для разведения стандарта RD5-56 в ячейки, предназначенные для NSB.
4. Внесите по 150 мкл Буфера для разведения стандарта RD5-56 в ячейки, предназначенные для нулевого стандарта (V_0).
5. Внесите по 150 мкл стандартов, контролей и образцов* в соответствующие ячейки.
6. Внесите по 50 мкл раствора первых антител во все ячейки (**кроме ячеек, предназначенных для NSB**). Жидкость во всех ячейках, кроме ячеек для NSB, должна быть голубого цвета.
7. Закройте ячейки пленкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре на орбитальном ($0.12''$) шейкере (500 ± 50 об/мин).
8. **Не промывайте планшет.** Добавьте по 50 мкл конъюгата PGE_2 во все ячейки. Жидкость во всех ячейках, кроме ячеек для NSB, должна стать фиолетового цвета.
9. Закройте ячейки пленкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре на орбитальном шейкере.
10. Удалите содержимое ячеек и промойте их, повторите процедуру еще 3 раза (общее число промывок = 4). Промывайте ячейки наполнением их 400 мкл промывающего буфера из сжимаемой бутылки, многоканального дозатора или автоматического промывающего устройства. Полное удаление жидкости на каждом шаге важно для получения правильных результатов. После последней промывки удалите остатки промывающего буфера и переверните микропланшет на чистую промокательную бумагу.
11. Внесите по 200 мкл готового раствора субстрата во все ячейки. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре **на столе, в защищенном от света месте.**
12. Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку. Аккуратно постучите планшет, чтобы перемешать содержимое.
13. Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм в течение 30 минут после внесения стоп-раствора. Используйте фильтр сравнения 540 или 570 нм. Если использование длины волны сравнения невозможно, вычитите результаты считывания при длине волны 570 нм или 540 нм из результатов считывания при длине волны 450 нм. Такое вычитание скорректирует оптические недостатки микропланшета. Считывание, произведенное только при длине волны 450 нм, без корректировки, может быть выше и менее точно.

*Образцы требуется разводить. См. раздел «Приготовление образцов».

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого стандарта, контроля и образца и вычитите из них среднее значение оптической плотности NSB.

Постройте калибровочную кривую, используя программное обеспечение для построения 4-параметрической калибровочной кривой. Альтернативно, можно построить калибровочную кривую, откладывая по линейной оси Y среднее значение оптической плотности стандартов, а по логарифмической оси X - их концентрацию, а затем проведя оптимальную кривую по полученным точкам.

Если необходимо, % V/B_0 можно рассчитать, разделив скорректированную ОП каждого стандарта и образца на скорректированную ОП V_0 и умножив на 100.

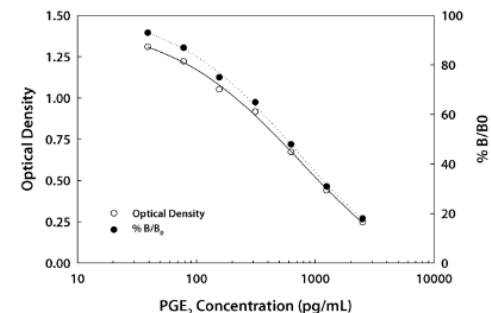
Исходя из стандартной кривой, рассчитайте концентрацию PGE_2 , соответствующую среднему значению полученной ОП.

Если образец был разведен, необходимо концентрацию, полученную из калибровочной кривой, умножить на коэффициент разведения.

Если проводилась экстракция образца, необходимо концентрацию, полученную из калибровочной кривой, разделить на коэффициент концентрации.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Приводятся только в демонстрационных целях и не должны использоваться в работе. Калибровочную кривую необходимо строить при каждой постановке теста.



пг/мл	ОП	Среднее	Скорректированное	% V/B_0
NSB	0.009 0.009	0.009	---	---
0(V_0)	1.404 1.419	1.412	1.403	---
39	1.304 1.333	1.319	1.310	93
78	1.212 1.250	1.231	1.222	87
156	1.051 1.073	1.062	1.053	75
312	0.910 0.939	0.925	0.916	65
625	0.657 0.707	0.682	0.673	48
1,250	0.448 0.452	0.450	0.441	31
2,500	0.249 0.265	0.257	0.248	18

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определялась тестированием трех образцов с известной концентрацией на одном микропланшете, по 20 повторов каждого.

Между сериями

Воспроизводимость между сериями определялась путем исследования трех образцов с известной концентрацией в 40 различных постановках.

Образец	Внутри серии			Между сериями		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	40	40	40
Среднее (пг/мл)	234	895	1456	253	835	1331
SD	21	45	89	33	82	120
CV (%)	9.0	5.0	6.1	12.9	9.9	9.0

ИЗВЛЕЧЕНИЕ

Извлечение PGE₂, добавленного к образцам разных типов матриц, с различной концентрацией в диапазоне анализа, было проанализировано для метода с обычной чувствительностью. Схожие результаты были получены и для метода с повышенной чувствительностью:

Образец	Среднее извлечение, %	Диапазон
Культуральная среда* (n=4)	97	84 - 106%
Сыворотка* (n=4)	97	86 - 114%
ЭДТА плазма* (n=4)	93	82 - 108%
Гепариновая плазма* (n=4)	94	81 - 111%
Моча* (n=4)	99	81 - 111%

*Все образцы были разведены, как указано в приготовлении образцов

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для определения минимального детектируемого количества (MDD) PGE₂ было выполнено 25 постановок метода с обычной чувствительностью, и полученные результаты находились в диапазоне 16.0 - 41.4 пг/мл. Среднее MDD составило 30.9 пг/мл.

Минимальное детектируемое количество определено вычитанием двух стандартных отклонений из среднего значения ОП нулевого стандарта (B₀), измеренного 20 раз и расчетом соответствующей концентрации.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Для определения линейности метода, образцы, содержащие и/или насыщенные высокими концентрациями PGE₂, были серийно разведены буфером для разведения стандарта RD5-56 в пределах диапазона измерений метода.

		Культуральная среда* (n=4)	Сыворотка* (n=4)	Гепариновая плазма* (n=4)	ЭДТА плазма* (n=4)	Моча* (n=4)
1:2	Средний % ожидаемого	100	99	104	108	93
	Диапазон, %	92 - 107	94 - 105	94 - 115	93 - 115	89 - 101
1:4	Средний % ожидаемого	100	101	99	104	90
	Диапазон, %	94 - 107	95 - 107	97 - 106	96 - 113	85 - 96
1:8	Средний % ожидаемого	101	104	103	102	92
	Диапазон, %	89 - 108	89 - 113	91 - 113	91 - 108	82 - 101
1:16	Средний % ожидаемого	106	102	95	103	101
	Диапазон, %	101 - 113	87 - 127	80 - 116	93 - 115	92 - 107

*Все образцы были разведены, как указано в приготовлении образцов.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Сыворотка/Плазма/Моча

Содержание PGE₂ было проанализировано в образцах сыворотки/плазмы/мочи методом с обычной чувствительностью.

Тип образца	Среднее определяемого (пг/мл)	% Определяемого	Диапазон (пг/мл)
Сыворотка (n=31)	389	90	ND - 2116
ЭДТА плазма (n=31)	414	94	ND - 2052
Гепариновая плазма (n=31)	406	87	ND - 2297
Моча (n=30)	796	67	ND - 1850

ND = не определяется

Супернатанты клеточных культур

Клетки периферической крови человека (1 x 10⁶ клеток/мл) растили на среде DMEM с добавлением 5% сыворотки плода коровы, 50мМ β-меркаптоэтанола, 2 мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина. Клетки растили не стимулированные и стимулированные 10 мкг/мл РНА. Были получены супернатанты культур клеток, алиquotированы и протестированы на содержание PGE₂.

Условия	1 день (пг/мл)	6 дней (пг/мл)
Стимулированные клетки	4666	10,680
Не стимулированные клетки	ND	ND

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

В буфере для разведения стандарта RD5-56 были приготовлены растворы всех факторов, перечисленных ниже, с концентрациями 50 нг/мл. Растворы были протестированы на перекрестную реактивность. Растворы указанных факторов были протестированы на наличие влияния. Влияния не наблюдалось. Перекрестная реактивность указана в таблице.

Соединение	% Перекрестной реактивности
PGE ₃	14.5
PGE ₁	5.3
PGF _{1α}	7.4
PGF _{2α}	7.6
6-keto-PGF _{1α}	4.2
PGA ₂	0.55
PGB ₁	< 0.1
Тромбоксан В ₂	< 0.1
Арахидоновая кислота	< 0.1
Арахидонилэтаноламид	< 0.1



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

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»