



## НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ Эндотелина-1 (человека, крысы, мыши, свиньи. быка, утки, кроля) Endothelin-1

Кат. № : 113-3420  
Количество : 96  
Производитель : DRG (США)

**Внимание:** основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

Методика от 29.01.2008

### ВВЕДЕНИЕ

Набор предназначен для определения специфического пептида и относящихся к нему и основаны на принципе конкурентного иммуноферментного анализа.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Имунопланшет этого набора является предварительно покрытый вторичным антителом и неспецифические связанные зоны заблокированные. Вторичное антитело может связываться к Fc фрагменту первичного антитела (антитело пептида), Fab фрагменты которого будут полностью связываться с биотинальным пептидом и пептидом стандарта целевого пептида в образце. Биотинальный пептид может взаимодействовать с стрептавидин-пероксидазой хрена (SA-HRP), что катализирует раствор субстрата с ТМВ и перекиси водорода для формирования раствора голубого окраса. Энзимно-субстратная реакция останавливается соляной кислотой (HCl) и раствор меняет окрас на желтый. Интенсивность желтого окраса прямо пропорциональна количеству пептида в растворе стандарта или образце. Это происходит через конкурирующее связывание биотинального пептида в растворе стандарта или образца с антителом пептида (первичное антитело). Соответственно строится стандартная кривая пептида с известной концентрацией. Пептид при неизвестной концентрации в образце определяется экстраполяцией с стандартной кривой.

Схема: см. оригинал инструкции.

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Концентрат рабочего буфера (20x) – 50 мл.
- Один микропланшет на 96 ячеек - 1 планшет
- пленка для запечатывания планшета (3 шт.)
- Первичная антисыворотка (кроличий анти-пептид IgG) – 1 фл.
- Стандарт пептида (1 мкг).
- Биотинилированный пептид (1 фл).
- Стрептавидин пероксидаза хрена (SA-HRP) (30 мкл).
- Раствор субстрата (12 мл).
- Положительный контроль (2 фл.).
- 2 N HCl (15 мл).
- Диаграмма анализа (1 лист).
- Общий протокол (1 брошюра).

### ТРЕБУЕМЫЕ НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер с фильтром 405-650 нм.
- Орбитальный планшетный шейкер на 300-500 об/мин.
- Микропланшетный промыватель (рекомендовано).
- Многоканальный дозатор для точного измерения объема от 50-100 мкл (рекомендовано).
- Резервуар для раствора.
- Абсорбирующий материал для вытряхивания.

- EDTA трубки для забора крови (необязательно).
- Апротинин (0,6 ТМЕ/мл крови) (выборочно).
- Буфер А (выборочно).
- Буфер В (выборочно).
- C18 SEP-колонки

**Примечание:** Набор необходимо привести к комнатной температуре (20-23°C) перед вскрытием флаконов и началом анализа. Настоятельно рекомендуется использовать растворы в день регидрации. В данном приложении рекомендуется использование протокола забора крови. Каждый набор содержит достаточное количество реагентов для 96 лунок и для анализа 40 образцов в дубле.

### ХРАНЕНИЕ

Хранить набор при 2-4°C после получения. Набор будет оставаться стабильным в течении 6 мес.

Набор необходимо привести к комнатной температуре перед анализом. Настоятельно рекомендуется использовать растворы после регидрации как можно быстрее.

Удалить ненужные полоски из покрытого антителом планшета, запечатать их хранить при 4С.

Хранить регидрированный раствор стандарта, биотинилированного пептида, антитела и HRP при 4С.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Перед началом анализа внимательно прочитайте инструкцию и приведите все компоненты набора к комнатной температуре (25-45 мин.).
2. Разведите 20x концентрат рабочего буфера с 950 мл дистиллированной водой и тщательно перемешайте. Этот рабочий буфер будет использоваться для реконституции всех остальных компонентов набора и экстракции образцов плазмы. Примечание: если появились кристаллы в 20X рабочем буфере, буфер можно поместить в теплую ванну на 30 мин. или пока видны кристаллы. Тщательно перемешайте перед использованием.
3. Центрифугируйте и разбавьте стандарт с 1 мл 1X рабочего буфера. Концентрация в данном исходном растворе – 1000 нг/мл. выдержите 10 минут при комнатной температуре (20-23C) для полного растворения. Центрифугируйте и смешайте на вортексе непосредственно перед использованием.
4. приготовьте растворы стандарта согласно схеме:

Стандарт	Объем стандарта	Рабочий буфер	Концентрация
Исходный раствор	1000 мкл	- - -	1000 нг/мл
1	25 мкл исходн. р-ра	975 мкл	25 нг/мл
2	200 мкл 1	800 мкл	5.0 нг/мл
3	200 мкл 2	800 мкл	1.0 нг/мл
4	200 мкл 3	800 мкл	0.2 нг/мл
5	200 мкл 4	800 мкл	0.04 нг/мл

5. Регидрируйте первичную сыворотку с 5 мл 1x рабочего буфера. Позвольте осесть в течении 5 мин. до полного растворения и тщательно перемешайте.
6. Регидрируйте биотинальный пептид с 5 мл 1 x рабочего буфера. Позвольте осесть в течении 5 мин. до полного растворения и тщательно перемешайте.
7. Центрифугируйте и регидрируйте положительный контроль с 200 мкл 1x рабочего буфера. Позвольте осесть по крайней мере в течении 5 мин. до полного растворения и тщательно перемешайте.
8. Оставьте лунки А-1 и А-2 пустыми в качестве **бланка**.
9. Внесите 50 мкл 1x рабочего буфера в лунки В-1 и В-2 как к **полностью связанным**.

10. Внесите 50 мкл приготовленных растворов стандартов от №5 до №1 (обратный порядок последовательного разбавления) в ячейки от C-1 и C-2 к G-1и G-2 соответственно.

**Примечание:** пептидные стандарты должны анализироваться в дубле.

11. Внесите 50 мкл регидрированного положительного контроля в лунки H-1 и H-2.

**Примечание:** положительные контроли должны анализироваться в дубле.

12. Внесите 50 мкл образцов в соответствующие лунки в дубле.

13. Внесите 25 мкл регидрированной первичной антисыворотки в каждую лунку **кроме лунки бланка**.

14. Внесите 25 мкл регидрированного биотинилированного пептида в каждую лунку **кроме лунки бланка**.

**Примечание:** не рекомендуется применять многоканальную пипетку для биотинилированного пептида или первичной антисыворотки.

15. Накройте планшет ацетатной пленкой.

16. Инкубируйте планшет в течении 2 часов при комнатной температуре (20-23°C). В процессе инкубации рекомендуется орбитальное встряхивание при 300-400 об/мин.

17. Центрифугируйте SA-HRP поставляемый флакон (3000-5000 об/мин в течении 5 сек) и внесите 12 мкл SA-HRP в 12 мл 1х рабочего раствора для того чтобы создать SA-HRP раствор. Тщательно смешайте.

18. Снимите пленку, закрывающую планшет.

19. Удалите содержимое лунок.

20. Промойте лунку 350 мкл 1х рабочего буфера, удалите буфер, переверните и высушите планшет. Повторите 4 раза.

21. Внесите 100 мкл SA-HRP раствора в каждую лунку.

22. Накройте планшет повторно ацетатной пленкой.

23. Инкубируйте планшет в течении 1 часа при комнатной температуре (20-23°C). В процессе инкубации рекомендуется орбитальное встряхивание при 300-400 об/мин.

24. Снимите пленку, закрывающую планшет.

25. Промойте лунку 350 мкл 1х рабочего буфера как указано выше.

26. Внесите по 100 мкл раствора TMB субстрата в каждую лунку. В процессе инкубации рекомендуется орбитальное встряхивание при 300-400 об/мин. Строго рекомендуется защищать TMB раствор субстрата от воздействия света.

27. Повторно накройте планшет пленкой.

28. Инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре (20-23°C).

29. Снимите с планшета пленку. Внесите по 100 мкл стоп раствора в каждую ячейку для остановки ферментативной реакции (раствор в ячейках должен стать из синего желтым). Если цвет неоднородный, легко постучите по планшету, чтобы тщательно смешать. **Следующий шаг должен быть выполнен в течение 20 минут.**

30. Вставьте планшет в фотометр.

31. Считайте оптическую плотность при длине волны 450 нм.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Не смешивайте реагенты из разных партий.
- Тщательно проверьте компоненты, указанные на коробке.
- Неиспользованные стрипы необходимо поместить в фольговый пакет с осушите лем и хранить при 4С. не допускайте попадания влаги в ячейки.
- При работе с планшетом не прикасайтесь ко дну.
- Ручное промывание может вызвать высокий коэффициент вариации. Для уменьшения этого

фактора, удаляйте жидкость из планшета переворачиванием и промоканием планшета на абсорбирующую бумагу.

- Если комнатная температура не попадает в диапазон (20-23°C), это может вызвать вариацию результатов.
- Можно повторно использовать резервуары для реагентов, если тщательно промывать резервуар дистиллированной водой перед каждым использованием.
- Каждая лаборатория должна определить соответствующий фактор разбавления для образцов, что бы удостовериться, что образцы попадают в динамический диапазон стандартной кривой.
- Высокий уровень влияющих протеинов может вызвать вариацию результатов образцов; поэтому рекомендуется выбрать соответствующее приготвление образца для получения оптимальных образцов
- Каждый раз используйте новый наконечник, удостоверьтесь что на наконечнике нет пузырей. Для лучшей внутри-тестовой вариации, аспирируйте и вливайте реагент или образец назад в контейнер несколько раз перед конечным забором.
- Не погружайте полностью наконечник в реагенты, поскольку капли могут собираться на конце наконечника и в ячейки попадет больше реагента. Это будет влиять на результаты.
- Для всех инкубаций рекомендуется использование орбитального планшетного встряхивателя на 300-400 об/мин.
- Модификация данного протокола может влиять на чувствительность или специфичность теста.

## РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Постройте стандартную кривую на логарифмической бумаге. Для этого отметьте точки полученных средних значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y (логарифмическая), а соответствующие концентрации аналита на горизонтальную ось X (линейная). Настоятельно рекомендуется использование 4 параметровой логарифмической программы для количественного вычисления стандарта. Стандартная кривая показывает обратное соотношение между концентрацией пептида и соответствующей абсорбцией. При увеличении концентрации стандарта, желтый окрас уменьшается, таким образом уменьшая ОП абсорбцию

Для определения концентрации образца, отметьте ОП образца на оси У, потом нарисуйте горизонтальную линию до пересечения со стандартной кривой. Вертикальная линия, нарисованная с этой точки, пересечет ось X покажет концентрацию пептида в образце. Поскольку образцы предварительно разбавляется, полученная концентрация следует умножить на соответствующий фактор разбавления. Стандартная кривая будет иметь обратную сигмоидальную форму.

Следуйте данным листа контроля для соответствующих величин положительного контроля.

## ИТОГ ППОТОКОЛА АНАЛИЗА

1. Добавьте 50 мкл/лунку стандарта или образца, 25 мкл первичной антисыворотки и 25 мкл биотинилированного пептида.
2. Инкубируйте при комнатной температуре (20-23°C) в течении 2 ч.
3. Промойте планшет 4 раза 350 мкл/лунку 1х рабочим буфером.
4. Добавьте 100 мкл/лунку раствора субстрата TMB.
5. Инкубируйте при комнатной температуре (20-23°C) в течении 1 ч.
6. Остановите реакцию 100 мкл/лунку 2 N HCl.
7. Считайте абсорбцию при 450 нм в течении и вычислите результаты.

**ЭКСТРАКЦИЯ ПЕПТИДОВ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ****Забор крови:**

Соберите образцы крови в пробирки Вакутанера с EDTA и емкостью 7 мл. Легко встряхните пробирки несколько раз немедленно после забора во избежание коагуляции. Перенесите кровь из пробирок в пробирки центрифуги с аprotинином (0,6 ТМЕ/мл крови) и легко встряхните несколько раз, чтобы ингибировать активность протеиназ. Центрифугируйте кровь при 1,600-х г в течении 15 мин. при 4°C и соберите плазму. Плазма, хранящаяся при -70°C может быть стабильна в течении 1 месяца. Если пробирки Вакутанера безопасны для использования в центрифуге, аprotинин можно жлобавлять на начальном этапе забора.

**Информация для заказа:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Факс: (0342) 775612  
 E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

**ЭКСТРАКЦИЯ ПЕПТИЦИДОВ ИЗ ПЛАЗМЫ**

1. Окислите плазму одинаковым количеством буфера А, например, при использовании 1 мл плазмы добавьте 1 мл буфера А. Смешайте и центрифугируйте при 6000-17000 х г в течении 20 мин. при 4°C.
2. Настройте SEP-COLUMN, содержащую 200 мг C-18 промывкой буфером В (1 мл, один раз) с последующим буфером А (3 мл, 3 раза).

**Примечание:** В этапах 3-5 давление не должно применяться.

3. Внесите окисленную плазму в предварительно обработанную C-18 SEP-COLUMN.
4. Медленно промойте колонку буфером А (3 мл, дважды) и удалите промывочный раствор.
5. медленно элюируйте пептид буфером В (3 мл, один раз) и соберите элюант в полипропиленовые пробирки.
6. Высушите элюант насухо в концентраторе центрифуги или с помощью подходящей методики.
7. Храните высушенный экстракт при -20°C и проведите анализ как можно быстрее. Используйте рабочий буфер для растворения высушенного экстракта. Если значение пептида заходится вне диапазона определения, разбавьте или концентрируйте образец по необходимости.

**Рекомендации по экстракции плазмы:**

При использовании C-18 SEP-COLUMN впервые, используйте пипетку, чтобы воздействовать давлением на колонку после добавления 1мл буфера В, чтобы улучшить поток через колонку. В этапах 3-5 давление не должно применяться.

Убедитесь, что поток одинаковый для всех растворов во время процедуры экстракции. Не позволяйте воздушным пузырькам проникнуть в матрикс C-18, чтобы обеспечит оптимальную обработку образцов и восстановление.

**Высушивание образца после экстракции:**

Сочетание концентратора центрифуги (напр. Speedvac) и лиофилизатора (сухая заморозка) – процедуры, дающие наилучшие результаты для осушивания образца после экстракции. Сначала используйте Speedvac, чтобы осушить образец в течении 15 минут и удалить органический слой. Затем мгновенно заморозьте остаток образца, и сухозамораживайте в течении ночи при использовании лиофилизатора. Данная двухэтапная процедура ведет к образованию порошка более мягкой консистенции, который легче регидрировать, чем образец высушенный только центробежным концентратором. Но если нет возможности работать с центрифужным концентратором, достаточно использовать замораживание-высушивание в течении ночи при использовании лиофилизатора.