



НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ Эндотелина-2 (человека, собаки) Endothelin-2

Кат. № : 113-3421
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

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

Методика от 30-10-2006

ВВЕДЕНИЕ

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Антитела к пептиду, биотинильный пептид и образец пациента либо стандарт вносятся в ячейку плашки и смешиваются. Антитела к пептиду связываются с особым образом обработанными стенками ячеек. Небиотинилированный пептид конкурирует за участки связывания на антителах с немеченым пептидом образцов и стандартов. После инкубации несвязавшийся небиотинилированный пептид удаляется промыванием плашки, после чего в ячейки вносится пероксидаза хрена, конъюгированная со стрептавидином, образуя при этом комплекс типа "сэндвич" с иммобилизованными в ячейках антителами и биотинилированным пептидом. После промывки, в ходе которой удаляется избыток конъюгата пероксидазы хрена со стрептавидином, в ячейки вносится хромогенный субстрат - тетраметилбензидин (ТМБ), который реагирует с пероксидазой в составе сэндвичевого комплекса с развитием окраски. Интенсивность развивающейся окраски пропорциональна количеству биотинилированного пептида, связавшегося с иммобилизованными в плашке антителами. В свою очередь количество биотинилированного пептида, связавшегося с иммобилизованными антителами, обратно пропорционально количеству немеченого пептида в образце.

Схема: см. оригинал инструкции.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Концентрат рабочего буфера (20х) – 50 мл.
- Один микропланшет на 96 ячеек с пленкой 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.
- Многоканальный дозатор для точного измерения объема от 50-100 мкл (рекомендовано).
- Резервуар для раствора.
- Абсорбирующий материал для вытряхивания.

- EDTA трубки для забора крови (выборочно).
- Апротинин (0,6 ТМЕ/мл крови) (выборочно).
- Буфер А (выборочно).
- Буфер В (выборочно).
- Промыватель микропланшет и планшетный шейкер (необязательно)
- Полулогарифмическая бумага для построения калибровочной кривой либо соответствующее программное обеспечение для компьютера
- Полипропиленовые пробирки 12х75 мм, а также пластиковые пробирки на 15 и 50 мл
- Миксер типа вортекс
- Деионизированная вода

Примечание: Набор необходимо привести к комнатной температуре (20-23⁰С) 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 дублете.

Этап 1: Подготовка реагентов

1. Перед началом анализа внимательно прочитайте инструкцию и приведите все компоненты набора к комнатной температуре (25-45 мин.).
2. Приготовление рабочего буфера: Разведите концентрат рабочего буфера 950 мл дистиллированной водой и тщательно перемешайте.
3. Разведение стандарта: Добавьте 1 мл разбавителя стандарта во флакон с лиофилизированным стандартом и тщательно перемешайте на вортексе. Концентрация анализа в данном исходном растворе – 1,000 нг/мл. Центрифугировать и смешивать непосредственно перед использованием. Схема приготовления растворов стандарта пептида см. в оригинале инструкции «Assay procedure».
4. Разведение первичной антисыворотки: Добавьте 5 мл рабочего буфера. Позвольте осесть в течении 5 мин. до полного растворения и тщательно перемешайте на вортексе.
5. Разведение биотинилированного пептида: Добавьте 5 мл рабочего буфера. Позвольте осесть в течении 5 мин. до полного растворения и тщательно перемешайте на вортексе.
6. Центрифугируйте и регидрируйте положительный контроль 200 мкл рабочего буфера. Позвольте осесть по крайней мере в течении 5 мин. до полного растворения и тщательно перемешайте на вортексе.
7. Оставьте лунки А-1 и А-2 как **бланк**.
8. Внесите 50 мкл рабочего буфера в лунки В-1 и В-2 как к **полностью связанным**.
9. Внесите 50 мкл приготовленных растворов стандартов пептида от №5 до №1 (обратный порядок последовательного разбавления) в ячейки от С-1 и С-2 к G-1и G-2 соответственно. **Примечание:** пептидные стандарты должны анализироваться в дублете.
10. Внесите 50 мкл регидрированного положительного контроля в лунки Н-1 и Н-2. **Примечание:** положительные контроли должны анализироваться в дублете.
11. Внесите 50 мкл образцов в соответствующие лунки в дублете.
12. Внесите 25 мкл регидрированной первичной антисыворотки в каждую лунку **кроме лунки бланка**.
13. Внесите 25 мкл регидрированного биотинилированного пептида в каждую лунку

кроме лунки бланка. **Примечание:** не рекомендуется применять многоканальную пипетку для заправки биотинилированного пептида или первичной антисыворотки.

14. Накройте планшет ацетатной пленкой. Инкубируйте планшет в течении 2 часов при комнатной температуре (20-23°C). В процессе инкубации рекомендуется орбитальное встряхивание при 300-400 об/мин.
15. Центрифугируйте SA-HRP поставляемый флакон (3000-5000 об/мин в течении 5 сек) и внесите 12 мкл SA-HRP в 12 мл рабочего раствора для того чтобы создать SA-HRP раствор. Тщательно смешайте.
16. Снимите пленку, закрывающую планшет и удалите содержимое лунок.
17. Промойте лунку 350 мкл рабочего буфера, удалите буфер, переверните и высушите планшет. Повторите 4 раза.
18. Внесите 100 мкл SA-HRP раствора в каждую лунку.
19. Накройте планшет повторно ацетатной пленкой. Инкубируйте планшет в течении 1 часа при комнатной температуре (20-23°C). В процессе инкубации рекомендуется орбитальное встряхивание при 300-400 об/мин.
20. Снимите пленку, закрывающую планшет и удалите содержимое лунок.
21. Промойте лунку 350 мкл рабочего буфера, удалите буфер, переверните и высушите планшет как указано в п. 17 выше.
22. Внесите по 100 мкл раствора хромогенного субстрата ТМБ в каждую лунку. Строго рекомендуется защищать ТМБ раствор субстрата от воздействия света.
23. Повторно накройте планшет пленкой. Инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре.
24. 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 неоднотонный, легко постучите по планшете, чтобы тщательно смешать. **Следующий шаг должен быть выполнен в течение 20 минут.**
25. Вставьте планшет в фотометр. 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.
- Каждый набор специально разработан, поэтому, перекрестное использование компонентов, особенно SA-HRP и рабочего буфера, между разными наборами настоятельно не рекомендуется.
- Все шаги анализа, включая инкубацию (кроме шага 31), проводятся при комнатной температуре. Исследуемые образцы и все компоненты набора должны быть приведены к комнатной температуре перед использованием.
- Для всех инкубаций рекомендуется использование орбитального планшетного встряхивателя на 300-400 об/мин.
- Мы рекомендуем нашим покупателям проверить вариативность между нашим разбавителем стандартов и их собственной средой перед использованием процедуры без экстракции. Наш стандарт разработан из образцов сыворотки или плазмы, не содержащей пептидов, что служит в качестве матрикса, могут различаться от образцов пользователей. Эта разница может быть проверена сравнением ОП нулевой дозы нашего разбавителя стандарта от контроля образца

пользователя. Если эта разница значительно выше, рекомендуется пользователем использовать собственную сыворотку или плазму, не содержащую пептиды вместо разбавителя стандарта, что используется в наборе.

- Из-за малых объемов инкубации в данном анализе большое значение имеет аккуратность пипетирования для минимизации вариации результатов.
- Не прикасайтесь к дну плашки, так как любое загрязнение влияет на результат определения оптической плотности.
- Характеристики данного набора в большой степени зависят от качества используемой воды. Рекомендуется использовать стерильную деионизированную воду (18Мом/см). Рекомендуется дополнительно фильтровать воду после ее деионизации для удаления загрязнителей, которые могут присутствовать в системе очистки воды.
- Если набор не будет использоваться немедленно, рекомендуется хранить лиофилизированные антитела, стандарт и биотинилированный аналит при -20°C. Другие компоненты должны храниться при 4°C. В этих условиях лиофилизированные компоненты стабильны не менее 4 месяцев. Поскольку анализ проводится при комнатной температуре, все компоненты набора перед использованием должны быть приведены к этим условиям. Не рекомендуется вскрывать плашку и флаконы с реагентами до достижения ими комнатной температуры. При использовании части набора рекомендуется остаток реагентов хранить при -20°C, кроме плашки, ферментного конъюгата и стоп раствора (эти компоненты следует хранить при 4°C). Не допускайте циклов повторного замораживания-оттаивания образцов. Данный способ позволяет сохранить реагенты для дальнейшего использования, тем не менее, рекомендуется использовать весь набор в одной постановке.
- Измерение пептидов в других биологических средах: Этот набор разработан для определения пептидов в сыворотке или плазме. Он может не дать точных результатов, если использовать другие рабочие основы, такие как моча или другие. Для решения этой проблемы возможно замещение стандартного разбавителя, что поставляется в наборе на другой, подходящий.
- **Не рекомендуется** использовать многоканальные пипетки в заправке ни биотинилированного пептида ни первичной антисыворотки.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используя линейную или полулогарифмическую бумагу, отметьте точки полученных средних значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y (логарифмическая), а соответствующие концентрации аналита на горизонтальную ось X (линейная). Проведите оптимальную кривую по полученным точкам. Калибровочная кривая должна иметь сигмоидальную форму и отражать обратную зависимость оптической плотности от концентрации аналита. Концентрация пептида в неизвестных образцах определяется при размещении ОП образца на оси Y. Нарисуйте горизонтальную линию до пересечения со стандартной кривой. Нарисуйте вертикальную линию от точек пересечения между стандартной кривой и горизонтальной линией. Эта вертикальная линия пересечет ось X с координатами, соответствующими концентрации пептида в неизвестном образце. Соответствующее программное обеспечение может использоваться для вычисления результатов. Разное программное обеспечение требует разную номенклатуру для кривой, которая используется. Для обработки результатов анализа может быть использовано любое программное обеспечение, выполняющее расчет по

сигмоидальной кривой. Стандартная кривая должна быть вычислена во время анализа для вычисления значений образцов.

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.

Рабочий буфер хранить при 4°C.

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

Хранить регидрированный раствор стандарта, биотинилированного пептида, первичной антисыворотки и HRP при 4°C.

ИТОГ ПРОТОКОЛА 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 рабочим буфером.
4. Добавьте 100 мкл/лунку раствора субстрата ТМВ.
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

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.

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 6,000-17,000 х г в течении 20 мин. при 4°C.
2. Приведите к комнатной температуре SEP-COLUMN, содержащий 200 мг С-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. Заправьте раствор окисленной плазмы в предварительно подготовленный С-18 SEP-COLUMN.
4. Осторожно промойте область с буфером А (3 мл, дважды) и удалите промывочный раствор.
5. Осторожно вымойте пиптид буфером В (3 мл, один раз) и соберите разбавители 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 1х как буфер для растворения высушенного экстракта если значение пептида заходится вне диапазона определения. При

необходимости разбавьте или концентрируйте образец.

Рекомендации по экстракции плазмы:

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

Убедитесь, что все растворы включены в процедуру экстракции и не позволяйте воздушным пузырькам проникнуть в основание С-18, чтобы обеспечит оптимальную обработку и восстановление образцов.

Высушивание образца после экстракции:

Сочитание концентратора центрифуги (напр. Speedvac) и лиофилизатора (лиофильная сушилка) ведет к наилучшим результатам 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 замораживайте насухо в течении ночи при использовании лиофилизатора. Данная двухэтапная процедура ведет к образованию более вязкий ворсистый порошок, который легче регидрировать чем образец высушенный только центробежным концентратором. Но если нет возможности работать с центробежным концентратором, достаточно использовать замораживание-высушивание в течении ночи при использовании лиофилизатора.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»

Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122

Факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.com

www.diameb.com