

превращению в процессе генерации электрохимических разрядов. Ацетилхолинэстераза электрического угря обладает третичной структурой, подобной листе клевера, состоящей из трех тетрамеров, присоединенных к коллаген-подобному структурному волокну. Этот стабильный фермент способен очень активно ($64,000 \text{ сек}^{-1}$) гидролизовать ацетилтихолин. Молекула ацетилхолинэстеразы, ковалентно связанная с антителами, специфическими к аналиту, служит конъюгатом в системе ACE™ иммуноферментного анализа. Для количественной оценки конъюгата используется измерение его ацетилхолинэстеразной активности с помощью реагента Элмана. Этот реагент состоит из ацетилтихолина и 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты). Гидролиз ацетилтихолина ацетилхолинэстеразой приводит к образованию тиохолина (см. рис. 2). В результате неферментативной реакции тиохолина с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) образуется 5-тио-2-нитробензойная кислота, абсорбцию которой можно считать при длине волны 412 нм ($\epsilon=13,600$). Ацетилхолинэстераза обладает несколькими преимуществами по сравнению с другими ферментами, обычно используемыми в иммуноферментном анализе. В отличие от пероксидазы хрена, в ходе реакции не происходит ауто-инактивации ацетилхолинэстеразы. Это свойство ацетилхолинэстеразы позволяет многократно проводить развитие окрашивания. Кроме того, фермент очень стабилен при условиях, в которых проводится тестирование, обладает широким диапазоном pH (pH 5-10) и не ингибируется обычно используемыми буферами или консервантами.

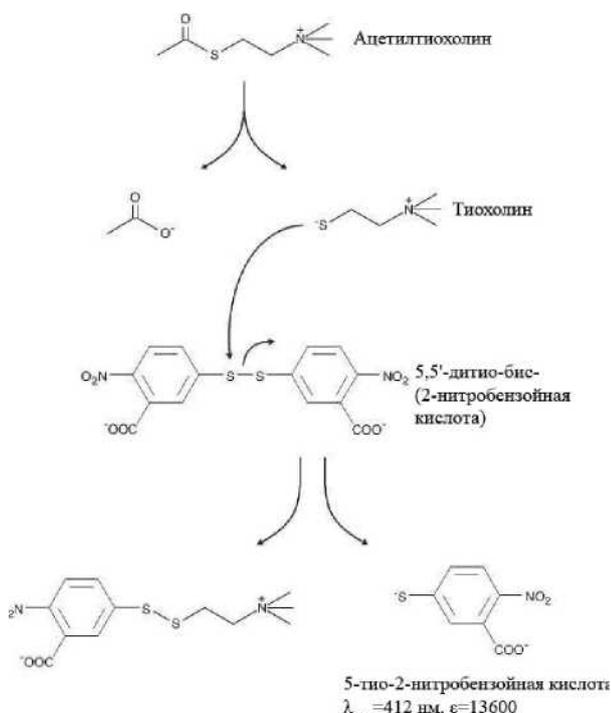


Рис. 2 Реакция, катализируемая ацетилхолинэстеразой

Определения ключевых слов

Бланк: фоновая абсорбция, вызываемая реагентом Элмана. Даже свежеприготовленный реагент Элмана обладает некоторой измеряемой абсорбцией, приблизительно 0.1 единиц оптической плотности (ОП). Абсорбция бланка должна вычитаться из значений ОП, полученных для всех остальных лунок.

Калибровочная кривая: серия лунок, содержащих различные известные количества свободного аналита.

dtн. : определение, где один dtн. Указывает на количество реагента, используемого на одну лунку.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

ПРИМЕЧАНИЕ: Для приготовления всех реагентов данного ИФА набора необходимо использовать только деионизированную воду, свободную от следов органического загрязнения (ультрачистая вода). Используйте фильтры из активного углерода или другое оборудование для очистки от органических примесей. Дистиллированная вода (даже бидистиллированная) не может быть использована для подготовки реагентов данного набора. Ультрачистую воду можно заказать в Sauman Chemical (каталожный No. 400000).

Подготовка буфера

(Храните все буферы при 4°C; они стабильны приблизительно 2 месяца)

Приготовление ИФА буфера

1. Разведите содержимое одного флакона с концентратом ИФА буфера 90 мл ультрачистой воды. Тщательно ополосните флакон так, чтобы точно удалить все соли, которые могли преципитировать.

ЗАМЕЧАНИЕ: Кристаллизация солей после оттаивания является нормальным процессом в концентрированном буфере. Все кристаллы полностью растворятся после разведения буфера.

ЗАМЕЧАНИЕ: Полисорбат-20 представляет собой вязкую жидкость и его объем нельзя измерить пипеткой. Небольшой объем этого реагента необходимо отмерять и вносить с помощью шприца или аналогичного оборудования.

2. Приготовление буфера для промывок

Разведите содержимое флакона 5 мл с концентратом буфера для промывок до конечного объема 2 литра ультрачистой водой и добавьте 1 мл Полисорбата-20.

ИЛИ

Разведите содержимое флакона 12.5 мл концентрата буфера для промывок до конечного объема 5 литров ультрачистой водой и добавьте 2.5 мл Полисорбата-20.

Для приготовления меньшего объема буфера для промывок разведите концентрат буфера для промывок в соотношении 1:400 и добавьте Полисорбат-20 (0.5 мл/л буфера для промывок).

Подготовка образцов

В общем случае образцы могут быть проанализированы без предварительной экстракции. Образцы плазмы рекомендуется разводить не менее, чем 1:20, а образцы синовиальной жидкости — не менее, чем 1:1,000. Существуют данные о влиянии человеческих гетерофильных анти-мышинных антител на результаты анализа данным методом. В набор включена неспецифическая мышинная сыворотка, которая может быть использована для компенсации данного влияния.³ Синовиальная жидкость может содержать анти мышинные IgM. Добавление 10 мМ дитиотреитола (DTT) может ослабить их влияние.³

Общие меры предосторожности

- Все образцы должны быть свободны от органических растворителей перед использованием.
- Образцы должны быть протестированы немедленно после забора; образцы, которые не тестируются немедленно, хранить при -80 °C.

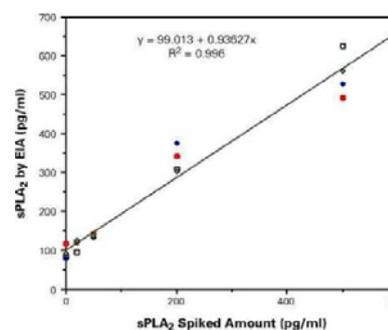


Рис 3. Образцы разведенной синовиальной жидкости, обогащенные sPLA₂

Образцы синовиальной жидкости у пациентов с артритом были разбавлены 1:5,000, обогащены sPLA₂ и проанализированы.

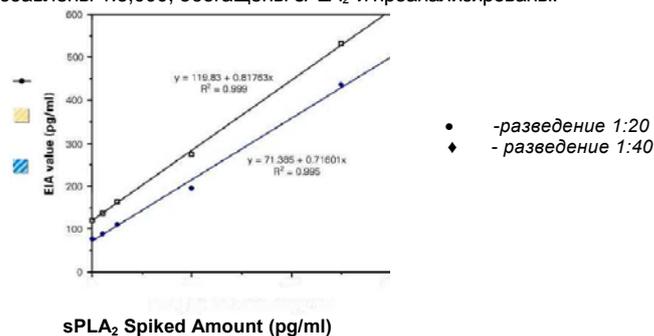


Рис 4. Образцы разведенной плазмы, обогащенные sPLA₂
Образцы плазмы были обогащены sPLA₂, разбавлены как показано на

рисунке и проанализированы.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Подготовка реагентов, специфичных для анализа

Стандарт sPLA₂

Растворите стандарт sPLA₂ в 2 мл ИФА буфера. Концентрация полученного раствора составит 10 нг/мл (10,000 пг/мл). Храните раствор при 4°C; он стабилен в течение приблизительно 2 недель. В набор включено такое количество стандарта sPLA₂, которого будет достаточно для анализа 20 калибровочных кривых. Этого избытка реагента должно быть достаточно для любых исследовательских целей.

ЗАМЕЧАНИЕ: При анализе образцов культуральной среды, которые не были разбавлены с буфером EIA, для разведения для стандартной кривой использовать культуральную среду.

Приготовление стандарта для анализа данным методом: Возьмите 8 чистых пробирок и пометьте их от № 1 до № 8. Внесите 900 мкл ИФА буфера в пробирку № 1 и по 500 мкл ИФА буфера в пробирки № 2-8. Внесите 100 мкл стокового раствора стандарта (10 нг/мл) в пробирку № 1 и тщательно перемешайте. Концентрация sPLA₂ в этой пробирке составит 1,000 пг/мл и будет служить самым высоким стандартом для калибровочной кривой. Затем выполните серийное разведение стандарта, отберите 500 мкл из пробирки № 1 и внесите их в пробирку № 2; тщательно перемешайте. Затем отберите 500 мкл из пробирки № 2 и внесите их в пробирку № 3; тщательно перемешайте. Повторите эту процедуру для пробирок с № 4 по № 7. Не вносите никакого разведения стандарта sPLA₂ в пробирку № 8. Эта пробирка будет использоваться как нулевой стандарт, самая низкая точка калибровочной кривой. (См. рисунок 5 в оригинале инструкции на английском языке).

Конъюгат ацетилхолинэстеразы sPLA₂ Fab'

Растворите флакон конъюгата Fab' 100 определений в 10 мл ИФА буфера

ИЛИ

Флакон конъюгата Fab' 500 определений в 50 мл ИФА буфера.

Храните растворенный конъюгат при 4°C и используйте в течение 2 недель. В расчете на случайные потери в набор включено 10% конъюгата дополнительно.

Не специфическая мышинная сыворотка

Мышинная сыворотка, поставляемая в данном наборе, может быть использована при анализа образцов плазмы или синовиальной жидкости, которые могут содержать анти-мышинные гетерофильные IgG антитела.³ Растворите мышиную сыворотку следующим образом:

100 определений: в 2.5 мл ультрачистой воды.

ИЛИ

500 определений: в 12.5 мл ультрачистой воды.

Хранить при 4°C. Она будет стабильна примерно 6 недель. Внесите 25 мкл мышинной сыворотки в каждые 500 мкл образца или стандарта перед пипетированием в лунки микропланшета.

Дитиотреитол (Не входит в состав набора)

Образцы синовиальной жидкости могут содержать анти мышинные IgM, влияние которых не может быть нейтрализовано добавлением мышинной сыворотки. Добавление DTT до конечной концентрации 10 mM (50 мкл 100 mM DTT на 500 мкл образца/стандарта) может компенсировать их влияние.

Подготовка планшета

В набор включен 96-луночный микропланшет, готов к использованию. Не требуется промывать планшет перед внесением реагентов в лунки. **ЗАМЕЧАНИЕ:** Если Вы не предполагаете использовать все стрипы в одной постановке, поместите оставшиеся стрипы обратно в пакет с осушителем и храните при 2-4°C. Убедитесь, что пакет тщательно закрыт.

В каждую постановку необходимо включать не менее двух лунок для бланка (Blk) и восемь стандартов для построения калибровочной кривой, в дублях. **ЗАМЕЧАНИЕ:** Для получения точных и воспроизводимых результатов каждая постановка должна включать эту минимальную конфигурацию. Анализируйте все образцы в дублях. Для улучшения результатов статистической обработки образцы рекомендуется тестировать в трех повторах. Возможное расположение типов лунок на планшете приведено на

рис. 6. Расположение типов лунок можно менять как это необходимо для каждого конкретного эксперимента. Предлагаемое на рисунке расположение лунок разработано для удобства анализа результатов с использованием подходящей программы расчетов, предлагаемой производителем Sauman Chemical (более подробно см. раздел «Расчет результатов»). Укажите содержимое каждой лунки на шаблоне планшета, поставляемом в наборе.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17	25
B	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18	25
C	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19	25
D	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20	26
E	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21	26
F	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22	26
G	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23	Blk
H	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24	Blk

Blk — бланк
S1-S8 - стандарты 1-8
1-26-образцы

Рис. 3 Пример расположения лунок на планшете

Проведение анализа

Рекомендации по пипетированию

- Для внесения буфера, стандартов, образцов, трейсера и антител необходимо использовать разные чистые одноразовые наконечники.
- Перед внесением каждого реагента, смочите наконечник в этом реагенте (т.е. медленно наполните наконечник реагентом и аккуратно удалите реагент, повторите процедуру несколько раз).
- Не дотрагивайтесь наконечником до реагента, уже находящегося в лунке.

Внесение реагентов

1. Стандарт sPLA₂

Внесите по 100 мкл из пробирки № 8 в обе лунки, предназначенные для самой низкой стандарта калибровочной кривой (S8). Внесите по 100 мкл из пробирки № 7 в обе лунки, предназначенные для следующего стандарта калибровочной кривой (S7). Продолжите этот процесс до тех пор, пока не внесете все стандарты, предназначенные для построения калибровочной кривой, в дублях, в соответствующие лунки. Для внесения всех стандартов (от самого низкого к самому высокому) можно использовать один и тот же наконечник. Перед внесением каждого следующего стандарта необходимо уравновесить наконечник этим стандартом.

2. Образцы

Внесите по 100 мкл образца в соответствующие лунки. Все образцы рекомендуется анализировать в трех репликах.

3. Конъюгат ацетилхолинэстеразы sPLA₂ Fab'

Внесите по 100 мкл во все лунки, за исключением лунок, предназначенных для бланка (B).

Таблица 1 Пипетирование

Лунка	Стандарт	Образец	Конъюгат AChE:sPLA ₂
Бланк	---	---	---
Стандарт	100 мкл	---	100 мкл
Образец	---	100 мкл	100 мкл

Инкубация

Закройте планшет пластиковой пленкой и инкубируйте в течение ночи при 4°C.

Развитие окрашивания

1. Растворите содержимое одного из флаконов на 100 опр. реагента Элмана (флакон № 8) в 20 мл ультрачистой воды

ИЛИ

Растворите содержимое одного из флаконов на 250 опр. реагента Элмана (флакон № 8) в 50 мл ультрачистой воды.

Замечание: Растворенный реагент Элмана не стабилен и должен быть использован в день приготовления; во время хранения защищайте реагент Элмана от света. На случай, если развитие окрашивания необходимо провести повторно или выполняется несколько постановок в

разные дни, в набор включены дополнительные флаконы с реагентом Элмана.

- Удалите жидкость из лунок и промойте пять или шесть раз буфером для промывок.
- Внесите по 200 мкл реагента Элмана в каждую лунку.
- Закройте планшет пластиковой пленкой. Лучше всего окрашивание развивается при использовании орбитального шейкера, оборудованного большой плоской крышкой, что позволяет проводить реакцию в темноте.
- Развитие окрашивания можно контролировать периодически в течение следующих нескольких часов.

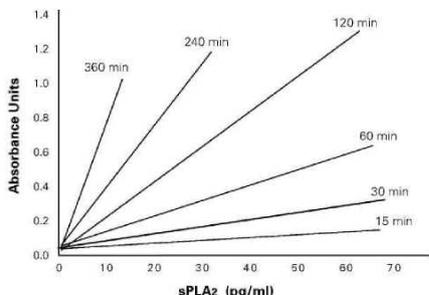


Рис. 7. sPLA₂ при различном времени развития окрашивания

Считывание планшета

- Перед считыванием рекомендуется протереть дно планшета чистой фильтровальной бумагой, чтобы удалить следы пальцев, загрязнения и т.д., так как пятна на дне планшета могут значительно повлиять на результаты считывания.
- Убедитесь в отсутствии брызг реагента Элмана на крышке планшета, так как любая потеря реагента Элмана значительно влияет на результаты считывания. Если это произошло, то с помощью пипетки соберите реагент Элмана с крышки и поместите его обратно в лунку. Если разбрызгано слишком много реагента Элмана и его невозможно легко и точно вернуть в соответствующие лунки, промойте планшет 3 раза буфером для промывок и повторите процедуру развития окрашивания, используя свежий реагент Элмана.
- Считайте абсорбцию в лунках при длине волны в диапазоне 405-420 нм. Как только лунки S1 будут визуальными желтыми (0.3 A.U., ~20-30 минут), будет возможно определить концентрацию относительно концентрированных образцов.

АНАЛИЗ

Обычно гораздо удобнее рассчитывать результаты, используя специальное программное обеспечение на компьютере; большинство ридеров обладают программным обеспечением для обработки результатов, или может быть использована программа табличных расчетов. **ЗАМЕЧАНИЕ:** *Сауна Chemical разработал такую программу для анализа результатов. Для получения более подробной информации или бесплатной копии этого удобного инструмента для анализа данных обращайтесь в отдел технической поддержки.*

Расчет результатов

Подготовка данных

Рекомендуется следующая процедура для подготовки данных для графического анализа.

- Если считывающее устройство ещё не сделало этого, отнимите среднюю плотность бланк лунок из значений остальных лунок.
- Рассчитайте среднюю плотность для каждого стандарта и лунки.

Построение калибровочной кривой

Постройте калибровочную кривую, откладывая значения абсорбции стандартов S1-S8 против соответствующих значений концентраций стандартов. Проведите по полученным точкам оптимальную прямую, включающую точку S8.

Определение концентрации аналита в образцах

Используйте уравнение калибровочной кривой, построенной по точкам S1-S8, для расчета концентрации в образцах.

Концентрация sPLA₂ (тип IIA) (пг/мл) = $[A_{412}(\text{образца}) - \text{пересечение калибровочной кривой с осью } Y] / \text{tg угла наклона калибровочной кривой} \times \text{Разведение}$

Характеристики метода

Чувствительность:

Минимальная определяемая концентрация составляет 15.6 пг/мл.

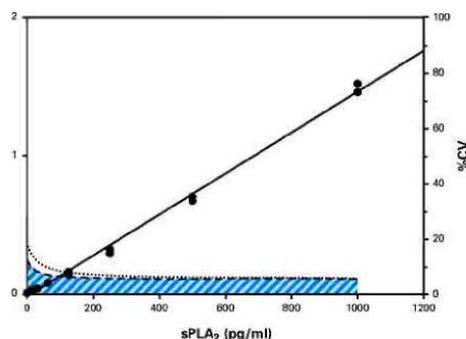
Пример результатов

Ниже приведен типичный пример калибровочной кривой, получаемой при анализе данным методом, однако результаты, получаемые при каждом тестировании, не идентичны. Не используйте данную калибровочную кривую для расчета результатов! Калибровочную кривую необходимо анализировать при каждой постановке. В зависимости от условий проведения реакции, матрикса образца, чистоты используемой воды результаты отдельных постановок могут значительно различаться и отличаться от результатов, приведенных в примере.

ЗАМЕЧАНИЕ: Данные Получены для стандарта, разведенного ИФА буфером. Значения приведены в единицах абсорбции.

Таблица 2 Типичные результаты

sPLA ₂ (пг/мл)	Абсорбция	
1,000	0.918	0.913
500	0.405	0.431
250	0.164	0.168
125	0.066	0.064
62.5	0.023	0.025
31.3	0.012	0.012
15.6	0.006	0.006
0	0.003	0.003



Калибровочная кривая sPLA₂

----- Воспроизводимость между сериями sPLA₂

..... Воспроизводимость внутри серии sPLA₂

Зона достоверных результатов

Рисунок 8 Типичная калибровочная кривая

Точность

Внутрисерийные и межсерийные CV определялись из стандартной кривой. Данные приведены ниже.

Таблица 3 внутрисерийная и межсерийная вариации

Доза (пг/мл)	% CV*	
	Внутрисерийная вариация	Межсерийная вариация
1,000	4.8	7.1
500	6.2	7.0
250	6.2	6.0
125	8.4	4.8
62.5	4.9	10.2
31.3	5.3	11.7
15.6	13.8	16.8
0	12.4	6.8

*%CV представляет вариацию в концентрации (не плотность), полученную с использованием стандартной кривой.

Специфичность

Таблица 4 Специфичность анализа

Составляющая	Перекрестная реактивность
sPLA ₂ (тип IIА)	100 %
sPLA ₂ (тип I)	<0.01 %
cPLA ₂ (тип IV)	<0.01 %
iPLA ₂ (тип IV)	<0.01 %
Крысиный sPLA ₂	<0.01 %
sPLA ₂ (тип V)	<0.01 %
Альбумин	<0.01 %
Интерлейкин-1	<0.01 %
PAF-AH	<0.01 %
TNF	<0.01 %

Поиск и устранение ошибок

Проблема	Возможные причины	Рекомендуемые решения по устранению
Разброс значений; дисперсия дублей.	А. Следы контаминации воды орг. Веществами В. Неправильная техника пипетирования	А. Заменить углеродный фильтр или использовать другой источник ультрачистой воды
Слабое развитие окрашивания (низкий сигнал) стандартной кривой	А. Неправильное разведение стандарта В. Для развития окрашивания требуется больше времени С. Деградация стандарта	А. Заменить углеродный фильтр или использовать другой источник ультрачистой воды В. Вернуть планшет на шейкер и считать результат позже
Отрицательный контроль или низкая концентрация образцов дают кажущуюся высокую концентрацию	А. Гетерофильные антитела В. Ревматоидный фактор	Добавить неспецифическую мышиную сыворотку и/или DTT
Анализ двух разведений биологического образца не совпадают (более 20 % разницы)	Влияние субстанций, присутствующих в образце	А. Образец должен быть очищен перед выполнением анализа ИФА. ³ В. Добавить мышиную сыворотку и DTT к стандартам и образцам
Концентрации образцов не соответствуют значениям, указанным в литературе	Матрицы образцов и стандартов различаются	А. Использовать один матрикс для всех образцов и стандартов В. Добавить мышиную сыворотку и DTT к стандартам и образцам

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»
 ООО «БиоТехЛаб-С»
 ул. Чорновола, 97
 г. Ивано-Франковск, 76005
 тел.: +38 (0342) 775 122
 факс: +38 (0342) 775 612
 e-mail: www.diameb.ua
www.biotechlab-s.com.ua