



ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ LTB₄ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Кат.№ : ADI-900-068
Производитель : Enzo Life Sciences, (США)

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

Методика от 11-05-2012

**Только для исследовательских целей.
Не применять для диагностики**

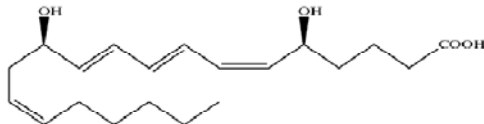
ОПИСАНИЕ

Набор Assay Designs Osteopontin (human) основан на иммуноферментном анализе (EIA) и предназначен для количественного определения LTB₄ в биологических жидкостях человека. Пожалуйста, полностью прочитайте инструкцию перед постановкой анализа. В наборе используются поликлональные антитела к LTB₄ человека для конкурентного связывания с LTB₄ человека, присутствующего в образцах или молекуле щелочной фосфатазы, к которой ковалентно присоединена LTB₄. После инкубации при комнатной температуре избыток реагентов вымывается и добавляется субстрат. После 2-часовой инкубации ферментативную реакцию останавливают, и генерируемый желтый считывается планшетным ридером при 405 нм. Интенсивность связанного желтого цвета обратно пропорциональна концентрации LTB₄ либо в стандартах, либо в образцах. Измеренная оптическая плотность используется для расчета концентрации LTB₄. Более подробные объяснения принципа метода и практические рекомендации по иммуноферментному анализу приведены в книгах Chard¹ или Tijssen².

ВВЕДЕНИЕ

Лейкотриен В₄ (LTB₄) является основным продуктом метаболизма арахидоновой кислоты и формируется с помощью 5-липоксигеназы³⁻⁵. LTB₄ стимулирует функции лейкоцитов, в том числе высвобождение лизосомальных ферментов⁶, адгезию^{7,8} и агрегацию полиморфных лейкоцитов⁹. LTB₄ была вовлечена в качестве мощного медиатора воспалительных заболеваний¹⁰⁻¹³ и иммунорегуляции¹⁴.

LTB₄



ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

ТОЛЬКО ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЕЙ, НЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР.

1. Некоторые компоненты набора содержат азид, который может реагировать со свинцом или медью. При утилизации реагентов обязательно промойте их большим количеством воды, чтобы предотвратить скопление азидов.
2. Стоп-раствор, входящий в состав данного набора, является раствором тринатрийфосфата. Это едкое вещество. При работе с данным реагентом необходимо соблюдать меры предосторожности.
3. Активность конъюгата щелочной фосфатазы зависит от присутствия ионов Mg²⁺ и Zn²⁺ и подвержена влиянию хелаторов, например ЭДТА, в концентрациях > 10 мМ
4. Характеристики метода были протестированы для различных типов образцов, однако возможно, что высокие концентрации влияющих веществ могут быть причиной вариабельности результатов анализа.
5. Со стандартом LTB₄, поставляемым в наборе, кат. № 80-0623, необходимо обращаться с осторожностью, из-за известных и неизвестных эффектов, оказываемых человеческим LTB₄.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

1. **LTB₄ Микропланшет** - 96-ячеечный микропланшет со сменными стрипами, покрытый козыми моноклональными антителами LTB₄ к IgG кролика.
2. **LTB₄ Конъюгат, 5 мл** - раствор щелочной фосфатазы, конъюгированный с LTB₄, голубого цвета.

3. **LTB₄ раствор антител, 5 мл**, Желтый раствор кроличьих поликлональных антител к LTB₄.
4. **Рабочий буфер, 27 мл**, Трис-буферный солевой раствор, содержащий белки и моющие средства, и азид натрия в качестве консерванта.
5. **Концентрат буфера для промывок, 27 мл**, содержит Трис буфер с детергентами.
6. **Стандарт человеческого LTB₄, 0.5 мл**. Раствор LTB₄, 120,000 пг/мл.
7. **pNpp Субстрат, 20 мл**, содержащий p-Нитрофенилфосфат в буфере. Готов к использованию.
8. **Стоп-раствор, 5 мл**. Раствор тринатрийфосфата (TSP). Хранить тщательно закрытым. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: едкое вещество.
9. **Схема постановки анализа human LTB₄** - 1 лист
10. **Пленки для накрывания микропланшета** - 1 шт.

ХРАНЕНИЕ

Все компоненты набора, за исключением конъюгата, стабильны при 4 °С до истечения срока годности набора. Стандарт должен храниться замороженным при температуре -20 °С.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Деионизированная или дистиллированная вода.
2. Калиброванные пипетки для нанесения объемов от 5 мкл до 1,000 мкл.
3. Дозаторы для внесения объемов 50 мкл и 200 мкл.
4. Одноразовая лабораторная посуда для разведения концентратов буферов.
5. Мерные цилиндры.
6. Микропланшетный шейкер.
7. Фильтровальная бумага.
8. Инкубатор 37 °С.
9. Микропланшетный фотометр с длиной волны измерения 405 нм и фильтром сравнения между 570 и 590 нм.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Данный набор может быть использован для измерения концентрации LTB₄ в образцах различных матриц. Значения концентраций в образцах, достаточно разведенных рабочим буфером, могут быть считаны непосредственно по калибровочной кривой. Более детально с данными по извлечению, в предлагаемых разведениях, можно ознакомиться ниже в инструкции. Однако исследователь **должен проверить** подходят ли рекомендованные разведения для его образцов. Образцы, содержащие IgG кролика, могут интерферировать с анализом.

Образцы в большинстве тканей культуральных сред, в том числе те, которые содержат фетальную бычью сыворотку, также могут быть считаны в анализе, при условии, что стандарты разводили в культуральной среде ткани вместо буфера для анализа. Будет небольшое изменение в связывании при анализе стандартов и образцов в культуральной среде. Допускается использование только стандартных кривых, построенных в среде или буфере, для расчета концентрации LTB₄ в соответствующей матрице. Для образцов ткани, мочи и плазмы, ингибиторы простагландин-синтетазы, например, индометацина или меклофенамовой кислоты в концентрации до 10 мкг/мл, следует добавить к гомогенату ткани или к образцам мочи и плазмы.

Некоторые образцы, как правило, имеют очень низкие уровни LTB₄, и экстракция может быть необходима для точных измерений. Подходящая методика экстракции приводится ниже:

Необходимые материалы

1. Стандарт LTB₄ для обеспечения точного определения эффективности экстракции.
2. 2 М соляной кислоты, деионизированная вода, этанол, гексан и этилацетат.
3. 200 мг Экстракционные Столбцы Обратной Фазы C18.

Процедура

1. Подкислите плазму, мочу или гомогенат ткани добавлением 2М HCl до pH 3.5. Примерно 50 мкл HCl будут необходимы на мл плазмы. Оставить на 15 минут при 4 °С. Центрифугировать образцы в микроцентрифуге в течение 2 минут, чтобы удалить осадок.
2. Подготовьте колонку C18 обратной фазы промыванием 10 мл этанола с последующим добавлением 10 мл деионизированной воды.
3. Внесите образец с легким давлением с получением скорости потока около 0,5 мл/мин. Промойте колонку 10 мл воды, затем

- 10 мл 15%-ного этанола и, наконец, 10 мл гексана. Элюировать образец из колонки добавлением 10 мл этилацетата.
4. Если анализ будет проводиться сразу, выпарить образцы струей азота. Добавьте как минимум 250 мкл буфера к высушенным образцам. Тщательно перемешать, оставить при комнатной температуре на 5 минут. Повторить еще два раза. Если анализ будет отложен, хранить образцы как элюированные этилацетатные растворы при температуре -80 °С до проведения анализа. Выпарить органический растворитель струей азота перед проведением анализа и восстановить, как описано выше.
- См. список Литературы (15-18) за информацией о подробном протоколе экстракции.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ

- Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов, не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Дайте реагентам достичь комнатной температуры не менее чем в течение 30 минут перед тем как их открыть.
- Стандарты и образцы должны быть приготовлены в пластиковой посуде.
- При пипетировании стандартов смачивайте наконечники перед нанесением, используйте новый одноразовый наконечник для каждого реагента, стандарта и образца
- Наносите стандарты и образцы на дно лунок.
- Для предотвращения контаминации наносите остальные реагенты на стенки лунок.
- В данном наборе использован микропланшет с отдельными стрипами, что позволяет проводить только необходимое количество измерений. Неиспользованные стрипы должны храниться с осушителем при 4 °С в поставляемом пакете. Стрипы надо использовать с поставляемой рамкой-держателем.
- Необходимо соблюдать меры предосторожности для снижения контаминации эндогенной щелочной фосфатазой.**
Контаминация щелочной фосфатазой, особенно в субстратном растворе, может привести к высоким значениям бланка. Не прикасайтесь голыми руками к наконечникам и другим материалам, используемым при анализе.
- Перед добавлением субстрата убедитесь в отсутствии остатков буфера для промывок в лунках.** Любой оставшийся буфер для промывок может вызвать отклонения в результатах анализа.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Стандарт LTB₄

Позволить Раствору Стандарта LTB₄ 120,000 пг/мл достичь комнатной температуры.
Промаркируйте 5 12x75 мм полипропиленовых пробирок с № 1 по № 5. Внесите 975 мкл Растворителя Стандарта (Рабочий Буфер или Культуральная Среда) в пробирку №1. Внесите 750 мкл Растворителя стандарта в пробирки № 2 - №5. Добавьте 250 мкл из пробирки №1 в пробирку №2 и тщательно перемешайте. Перенесите 250 мкл полученного раствора из пробирки № 2 в пробирку № 3 и тщательно перемешайте. Выполните аналогичную процедуру переноса для пробирок № 4 и № 5.
Концентрации LTB₄ в пробирках № 1 - № 5 составляют 3,000, 750, 188, 46.9 и 11.7 пг/мл соответственно. Подробности разведения приведены в листе со схемой постановки анализа LTB₄.
Разведенные Стандарты использовать в течение 60 минут после приготовления.

2. Конъюгат LTB₄

Позволить Конъюгату достичь комнатной температуры. Любой неиспользуемый конъюгат аликвотировать и повторно заморозить при температуре не выше -20 °С. Избегать повторного замораживания-оттаивания аликвот.

3. Буфер для промывок

Приготовить промывочный буфер разбавлением 5 мл поставляемого концентрата в 95 мл деионизированной воды. Разведенный буфер для промывок может храниться при комнатной температуре до 3 месяцев, но не дольше чем до окончания срока годности.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приведите все реагенты и образцы к комнатной температуре не менее, чем за 30 минут до открытия. Все образцы и стандарты должны анализироваться в дублях.

- Определите, используя лист со схемой постановки анализа, необходимое для анализа число стрипов, неиспользованные стрипы верните в пакет с осушителем, тщательно закройте и храните при 4 °С.
- Внесите по 100 мкл Растворителя Стандарта (Рабочий Буфер или Культуральная Среда) в лунки NSB и Во (стандарт 0 пг/мл).
- Внесите по 100 мкл стандартов из пробирок №1 – №5 в соответствующие лунки.
- Внесите по 100 мкл образцов в соответствующие лунки.
- Внесите 50 мкл Рабочего буфера в NSB лунки.
- Внесите 50 мкл синего конъюгата в каждую лунку, за исключением лунок Общей Активности (ТА) и Бланка.
- Внесите 50 мкл желтых антител в каждую лунку, за исключением лунок Бланк, ТА и NSB.

ПРИМЕЧАНИЕ: Каждая лунка должна быть **зеленого цвета**, кроме лунок NSB, которые должны быть **синими**. Лунки Бланк и ТА пусты в данный момент и не имеют цвета.

- Инкубировать при комнатной температуре на шейкере в течение 2 часов при ~ 500 оборотов в минуту.
- Освободить лунки и промыть путем добавления 400 мкл промывочного раствора в каждую лунку. Повторить мытьё ещё 2 раза в общей сложности **3 промывки**.
- После последней промывки освободить лунки, и сильно стукнуть пластиной по безворсовому бумажному полотенцу, чтобы удалить остатки промывочного буфера.
- Внесите 5 мкл синего Конъюгата в лунки ТА.
- Внесите по 200 мкл раствора субстрата во **все** ячейки. Закройте микропланшет и инкубируйте 2 часа при 37 °С.
- Внесите по 50 мкл стоп-раствора в каждую ячейку. Это останавливает реакцию и результаты должны быть считаны немедленно.
- Бланкируйте микропланшетный фотометр (ридер) по лункам бланка, определите оптическую плотность (ОП) ячеек при 405. Желательно использовать фильтр сравнения с длиной волны между 570 и 590 нм. Если ридер не может быть бланкирован по лункам бланка, вычитите среднее значение ОП, полученное для бланка, из значений ОП, полученных для всех остальных лунок.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Подсчет концентрации LTB₄ в образцах можно проводить различными способами. Для обработки полученных данных рекомендуется использовать специальное программное обеспечение, с применением 4 параметрической аппроксимации. Если использование такого программного обеспечения невозможно, концентрация LTB₄ в образцах может быть рассчитана следующим образом:

- Рассчитайте среднюю ОП для каждого стандарта и образца вычитанием среднего значения ОП бланка из среднего значения ОП образца или стандарта:

$$\text{Average Net OD} = \text{Average Bound OD} - \text{Average NSB OD}$$

- Рассчитать связывание каждой пары стандартных лунок в виде процента от максимального связывания лунок (Bo), с использованием следующей формулы:

$$\text{Percent Bound} = \frac{\text{Net OD}}{\text{Net Bo OD}} \times 100$$

- Отметить процент связывания против концентрации LTB₄ для стандартов. Приблизительно постройте прямую через точки. Концентрация LTB₄ в неизвестных может быть определена путем интерполяции.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

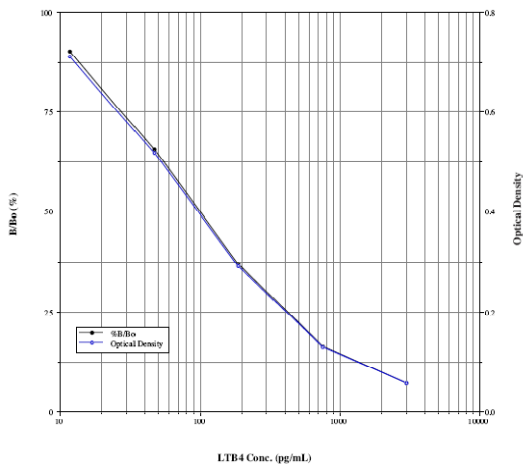
Результаты, приведенные ниже, приводятся только в демонстрационных целях и не должны использоваться для расчетов результатов какой-либо другой постановки.

Образец	Средняя ОП (-бланк)	Средняя Net ОП	Процент связывания	LTB ₄ , (пг/мл)
Бланк ОП	(0.145)			
ТА	1.466			
NSB	-0.002	0.000		
Во	0.786	0.788	100 %	0
S1	0.054	0.056	7.0 %	3,000
S2	0.127	0.129	16.4 %	750
S3	0.289	0.291	36.9 %	188

S4	0.515	0.517	65.6 %	46.9
S5	0.710	0.712	90.4 %	11.7
Обр. 1	0.465	0.467	59.3 %	63.5
Обр.2	0.155	0.157	19.9 %	556

ТИПИЧНЫЕ СТАНДАРТНЫЕ КРИВЫЕ

Ниже приведена типичная калибровочная кривая. Эта кривая **не должна** быть использована для расчета концентрации LTB₄; калибровочную кривую необходимо строить при каждой постановке теста.



Типичные параметры контроля качества

Общая активность Добавленная	= 1.466 x 10 = 14,66
% NSB	= 0.0 %
% Bo/TA	= 5.37 %
Качество Подгонки	= 1.000

(Рассчитано из 4-параметровой логистической кривой)

20% Пересечения	= 552 пг/мл
50% Пересечения	= 98 пг/мл
80% Пересечения	= 23 пг/мл

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Следующие параметры данного набора были определены с использованием указаний, перечисленных в протоколе оценки Национального Комитета по Клиническим Лабораторным Стандартам (NCCLS).

Чувствительность

Чувствительность рассчитывали, определяя среднюю ОП двадцати (20) повторов 0 пг/мл, и сравнивая со средней ОП двадцати (20) повторов стандарта № 5. Предел чувствительности был определен как концентрация человеческого LTB₄, соответствующая двум стандартным отклонениям от нуля по калибровочной кривой.

Средняя ОП B ₀	= 0.802 ± 0.025 (3.2%)
Средняя ОП стандарта № 5	= 0.696 ± 0.011 (1.6%)
Дельта ОП (0 – 11.7 пг/мл)	= 0.106
2 SD's от нулевого стандарта = 2 x 0.025	= 0.051

Чувствительность: = $\frac{0.051}{0.106} \times 11.7$ пг/мл = 5.63 пг/мл

Линейность

Образец, содержащий 1,000 пг/мл человеческого LTB₄, был разведен 6 раз 1:2 рабочим буфером и протестирован с помощью данного метода. Данные были представлены графически, как зависимость актуальной концентрации LTB₄ от измеренной. Полученная линия имела уклон 0.961 и коэффициент корреляции 0.999.

Воспроизводимость

Воспроизводимость внутри серии определялась многократным тестированием (n=16) образцов с низкой, средней и высокой концентрацией LTB₄ в одной постановке. Воспроизводимость между сериями определялась многократным тестированием (n=8) трех образцов с низкой, средней и высокой концентрацией LTB₄ в разных постановках. Данные по воспроизводимости, приведенные ниже, представлены как % коэффициента вариаций для концентраций LTB₄, определенных в указанных постановках, рассчитанных с помощью

программного обеспечения с использованием 4-параметрической аппроксимации.

	LTB ₄ , пг/мл	%CV Внутри серии	%CV Между сериями
Низкая	305	6,0	
Средняя	607	6,8	
Высокая	1,078	5,9	
Низкая	99		15,7
Средняя	308		16,5
Высокая	507		5,0

Перекрестная реактивность

Перекрестную реактивность подобных молекул определяли, растворяя перекрестно реагирующее вещество в рабочем буфере. Затем эти образцы были протестированы данным методом определения LTB₄, и была рассчитана измеренная концентрация LTB₄. % перекрестной реактивности был рассчитан сравнением актуальной концентрацией перекрестно реагирующего вещества в образце и выражен в процентах.

Compound	Cross Reactivity
LTB ₄	100%
6-trans-12-epi-LTB ₄	5.50%
6-trans-LTB ₄	4.90%
12-epi-LTB ₄	0.94%
PGE ₂	<0.2%
PGF _{2α}	<0.2%
20-OH-LTB ₄	<0.2%
20-COOH-LTB ₄	<0.2%
LTC ₄	<0.2%
LTD ₄	<0.2%
LTE ₄	<0.2%
5(S)-HETE	<0.2%
12(S)-HETE	<0.2%
15(S)-HETE	<0.2%

Извлечение

Рекомендации по подготовке образцов и стандартов смотрите выше в данной инструкции.

Концентрации LTB₄ были измерены во множестве различных типов образцов, включая культуральную среду, человеческую мочу и слюну, плазму свиньи. LTB₄ был добавлен в эти матрицы, которые затем были разведены рабочим буфером и протестированы данным методом. Замечание: так как концентрация LTB₄ в образцах различается, то могут требоваться различные разведения. Разведения, приведенные ниже, были необходимы для того, чтобы концентрации исследуемых образцов попадали в измеряемый диапазон.

Образец	% извлечения	Рекомендуемое разведение*
Культуральная среда	97.3	----
Человеческая слюна	114.1	≥ 1:4
Человеческая моча	96.9	----
Плазма свиньи	109.6	1:2 – 1:4

* См. раздел «Подготовка образцов».

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