



Набор ИФА для определения человеческого АДИПОНЕКТИНА (Acrp30)

Каталог. № : ADIP025
Количество : 96
Производитель: Origenium (Финляндия)

Версия 2.10

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

ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА адипонектин (ACRP30) компании «Орджениум Лабораториз» является ферментосвязанным иммуносорбентным анализом для количественного определения человеческого адипонектина в супернатантах культуры клеток, плазме или сыворотке человека.

2. ВВЕДЕНИЕ

Настоящий набор является ферментосвязанным иммуносорбентным анализом *in vitro* для количественного определения общего (низко-, средне- и высокомолекулярной массы) человеческого адипонектина в супернатантах культуры клеток, сыворотке и плазме. Этот анализ использует антитело, свойственное для человеческого адипонектина, нанесенное на 96-луночный планшет. Стандарты, образцы и биотинилированный анти-человеческий адипонектин капаются в лунки и адипонектин, присутствующий в образце, захватывается антителом, иммобилизированным на лунках и биотинилированным адипонектином специфическим обнаруживающим антителом. После вымывания несвязанного биотинилированного антитела, капается в лунки стрептавидин, конъюгированный пероксидазой хрена. Лунки промываются снова. После этого второго этапа промывки в лунки добавляется раствор субстрата ТМБ, что ведет к развитию цвета, который пропорционален количеству связанного адипонектина. Стоп-раствор изменяет цвет из синего на желтый, и интенсивность цвета измеряется при 450 нм.

3. СОСТАВ НАБОРА

Компоненты набора	Количество/Объем
96-луночный планшет с 12 стрипами Делимые микротирационные стрипы для анализа, каждый с антителами адипонектина, нанесенными на 8 отдельных лунок. Готов к использованию.	1 рамка
Стандарт адипонектина 30 нг/мл Лиофилизированный и стабилизированный рекомбинант человеческого адипонектина (см. исходную конц. на этикетке). Растворить определенным количеством разбавителя образца, указанного на этикетке.	2 флакона
Раствор биотинилированного адипонектина Готов к использованию.	10 мл
Авидин, конъюгированный пероксидазой хрена Готов к использованию.	12 мл
20x концентрат промывочного раствора (достаточно для 1000 мл) Разбавить 1:20	50 мл
Разбавитель образца Готов к использованию.	2 x 100 мл
Стоп-раствор 0,9N H ₂ SO ₄ . Готов к использованию.	8 мл
Субстрат ТМБ Готов к использованию.	8 мл

4. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагент	Хранение	Стабильность
96-луночный планшет с 12 стрипами. Делимые микротирационные стрипы для анализа с 8 отдельными лунками, покрытыми антителом	Хранить при 2-8°C в закрытом мешочке из фольги с осушителями. Неиспользуемые стрипы должны храниться в запечатывающемся герметичном и влагозащитном мешочке из фольги!	3 месяца после вскрытия
Стандарт адипонектина. Лиофилизированный.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники!)</i>	До истечения срока годности набора в лиофилизированном виде. По крайней мере 3 недели после растворения разбавителем образца.
Биотинилированные антитела. Готовы к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники!)</i>	3 месяца после вскрытия
Авидин, конъюгированный пероксидазой хрена. Готов к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники!)</i>	3 месяца после вскрытия
Разбавитель образца. Готов к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники или пипетки!)</i>	3 месяца после вскрытия
20x концентрат промывочного буфера. Разбавленный промывочный буфер	Хранить при комнатной температуре. 1x рабочее разбавление. <i>Бутылки, используемые для рабочего разбавления, должны регулярно промываться. Утилизировать мутные растворы</i>	До истечения срока годности при комнатной температуре. 3 рабочих дня при комнатной температуре или 2 недели при +4°C.
Раствор ТМБ-субстрата.	Раствор готов для использования, при 2-8°C, защищая от света.	До истечения срока годности (указана на флаконе).

	Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники или пипетки!)	
Стоп-раствор.	Хранить при 2-8°C. Может храниться также при комнатной температуре.	До истечения срока годности.

5. ДОПОЛНИТЕЛЬНО ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер для измерения абсорбции при 450 нм.
- Точные пипетки для внесения объемов от 2 мкл до 1 мл.
- Многоканальная пипетка (от 25 – 350 мкл), 12 и 8-канальная. Рекомендуется для ручных промывок и внесения реагентов.
- Регулируемые пипетки 1-25 мл для подготовки реагентов.
- Градуированные колбы объемом 100 мл и 1 л.
- Промокательная бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Логарифмическая графопостроительная бумага или ПК с ПО для анализа данных ИФА.
- Пробирки для подготовки стандарта или разбавлений образца.
- Таймер

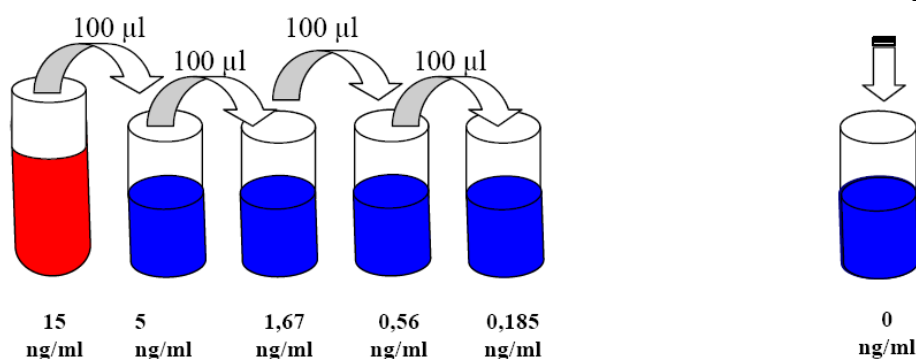
6. ОБЪЕМЫ РЕАГЕНТОВ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты					
К-во используемых стрипов (каждый на 8 лунок)	Биотинилированные антитела 50 мкл/лунку	Авидин-пероксидаза хрена 50 мкл/лунку	Субстрат ТМБ 50 мкл/лунку	Стоп-раствор 25 мкл/лунку	Промывочный буфер 300 мкл/лунку
1 (8 лунок)	500 мкл	500 мкл	500 мкл	300 мкл	30 мл
2 (16 лунок)	1 мл	1 мл	1 мл	600 мкл	55 мл
4 (32 лунок)	2 мл	2 мл	2 мл	1,2 мл	110 мл
6 (48 лунок)	3 мл	3 мл	3 мл	1,8 мл	165 мл
8 (64 лунок)	4 мл	4 мл	4 мл	2,4 мл	220 мл
12 (96 лунок)	6 мл	6 мл	6 мл	4 мл	350 мл

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ

1. Перед использованием привести все реагенты и образцы к комнатной температуре (18-25°C).
2. **Планшет, покрытый антителами:** До вскрытия мешочка из фольги определить количество стрипов, необходимых для исследования требуемого количества образцов, плюс 16 лунок, необходимых для стандартов и бланков в дубли. Удалить неиспользуемые стрипы из рамки планшета и вернуть их в мешочек, содержащий осушитель, на хранение до 1 месяца при 2-8°C.
3. **Разбавление стандарта для исследования:**
Растворить лиофилизированный стандарт адипонектина определенным количеством растворителя образца, указанным на этикетке. Стандарт адипонектина стабилен по крайней мере 3 недели после растворения. Чтобы получить калибровочную кривую необходимо разбавить следующим образом:
 - a) Добавить 125 мкл стандарта адипонектина и 125 мкл разбавителя образца в пробирку 1, чтобы получить 15 нг/мл стандарта адипонектина.
 - b) Добавить 200 мкл разбавляющего буфера в другие 4 пробирок и начать 3-кратные последовательные разбавления в пробирках для разбавления как описано на рисунке.
 - c) Используя чистый наконечник, добавить в пробирку 6 долька разбавитель образца. 125 мкл стандарта адипонектина + 125 мкл разбавителя образца.

Только 200 мкл разбавителя образца как контрольной пробы



4. **Подготовка и разбавление образца:** Разбавитель образца используется для разбавления всех образцов (сыворотки/плазмы, культуры супернатантов клеток и мочи), требующих разбавления. *Хранить и разбавлять все образцы в пробирках или планшетах, изготовленных из материала с низкой связывающей поверхностью, типа полипропилена.* Перед исследованием замороженные образцы следует разморозить как можно быстрее под проточной водой (18-25°C). Не использовать для этой цели водяную баню 37°C или 56°C.

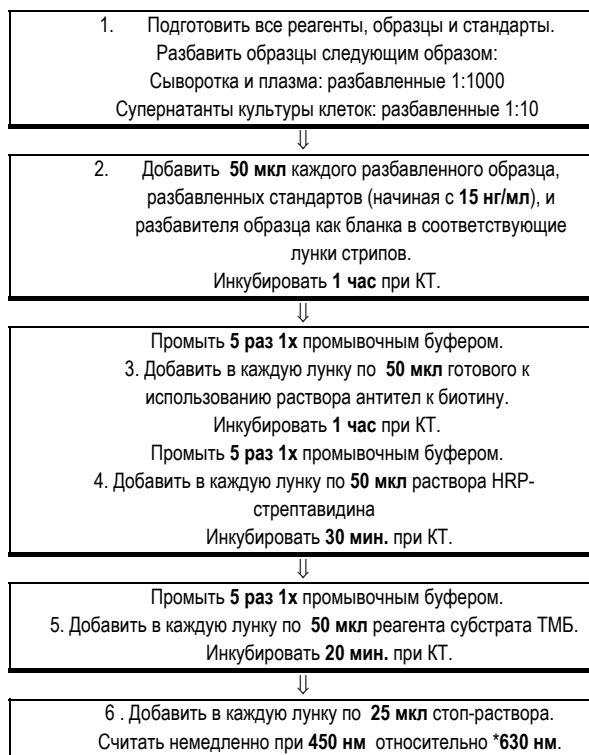
5.
 - **Плазма:** собрать плазму, используя одну десятую объема 0,1 М цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Центрифугировать образцы при 2000 x g в течение 10 минут и провести исследование. Разбавить образцов плазмы 1:1000 раствором для разбавления образцов. Рекомендуется выполнить разбавление в два этапа, например, первое разбавление 1:100 (5 мкл образца+495 мкл разбавителя образцов, а также дальнейшее разбавление 1:10 (100 мкл разбавленного образца+900 мкл раствора для разбавления образцов). Не использовать высоко гемолизированные или липемические образцы. Неразбавленные образцы могут храниться при температуре -20°C или ниже. Избегать повторного замораживания-размораживания
 - **Сыворотка:** Образцы должны быть собраны в пробирку для отделения сыворотки. После свертывания центрифугировать образцы при 2000 x g в течение 10 минут. Удалить сыворотку и провести исследование. Разбавить образцы сыворотки 1:1000 разбавителем образца. Рекомендуется выполнять разбавление в два этапа, например, первое разбавление 1:100 (5 мкл образца+495 мкл раствора для разбавления образцов, а также дальнейшее разбавление 1:10 (100 мкл разбавленного образца+900 мкл разбавителя образца).

Неразбавленные образцы могут храниться при температуре -20°C или ниже до 3 месяцев. Избегать повторного замораживания-размораживания.

- **Супернатанты культуры клеток:** Центрифугировать среду культуры клеток при 2000 x g в течение 10 минут, чтобы удалить отходы. Собрать и провести исследование супернатантов. Разбавить супернатанты культуры клеток 1:10 разбавителем образца (например, 10 мкл образца + 90 мкл разбавителя). Хранить образцы при -20°C или ниже. Избегать повторного замораживания-размораживания.
 - **Образцы с высокими значениями абсорбции:** Образцы, которые превышают диапазон измерений, должны быть разбавлены разбавителем образца 1:2 или 1:5 и измерены снова. Образцы со значениями меры поглощения света > 1.900 могут быть последовательно разбавлены 1:100, 1:2000 и 1:4000. При вычислении результатов должен быть принят во внимание коэффициент разбавления.
5. **Промывочный буфер:** Если 20x концентрированный промывочный буфер содержит видимые кристаллы, нагреть его при 37°C и осторожно перемешать до растворения. Разбавить 25 мл концентрата промывочного раствора деионизированной или дистиллированной водой, чтобы получить 500 мл 1x промывочного буфера.
6. Перед использованием осторожно перемешать вортексом раствор **биотинилированных антител**.
7. Перед использованием осторожно перемешать **меченный пероксидазой авидин**.

Предостережение: субстрат ТМБ (тетраметилбензидин) и стоп-раствор (H_2SO_4) токсичные или едкие и должны использоваться с осторожностью. Во время применения использовать перчатки.

8. СХЕМА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА



*Рекомендуется проводить корректировку оптических неточностей в микропланшетах, отнимая $A_{630\text{нм}}$, но не в качестве обязательной процедуры.

9. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ / ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Компоненты набора должны храниться в холодильнике если не используются. Все реагенты должны быть нагреты до комнатной температуры перед использованием.
- Перед вскрытием мешков из фольги микротитрационным планшетам нужно позволить достичь комнатной температуры.
- Как только было извлечено желаемое количество стрипов, немедленно герметично закрыть мешочек и хранить при $2 - 8^{\circ}\text{C}$, чтобы сохранить целостность планшета. Защищать от влажности.
- Образцы должны быть собраны в пробирки не содержащие пирогена/эндотоксина.
- Образцы должны быть заморожены если не анализируются вскоре после сбора. Избегать многократных циклов замораживания/замораживания образцов. Полностью разморозить и хорошо перемешать перед анализом.
- Когда возможно избегать использования чрезмерно гемолизированных или липемических сывороток. Если присутствует большое количество макрочастиц, центрифугировать или фильтровать перед анализом.
- Рекомендуется, чтобы все стандарты, контроли и образцы использовались в двойном экземпляре.
- Образцы, которые содержат > 15 нг/мл адипонектина, должны быть разбавлены буфером разбавителя образца.
- При капании реагентов из пипетки сохранять последовательный порядок переноса из лунки в лунку. Это обеспечивает одинаковое время инкубации для всех лунок.
- Накрывать или закрыть все неиспользуемые реагенты.
- Не использовать реагенты по истечении срока годности набора.
- Считать абсорбции в пределах 15 минут после завершения анализа.
- Внутренние контроли должны применяться в каждом анализе. Если значения контролей вне предустановленных диапазонов - точность пробирного анализа под сомнением.
- Все остатки промывочной жидкости должны высушиваться в лунках достаточной аспирацией или декантацией, сопровождаемой постукиванием с усилием планшетом о промокательную бумагу. **Никогда** не вставлять промокательную бумагу непосредственно в лунки.
- Поскольку хромоген ТМБ высокочувствителен, избегать длительного контакта со светом. Также избегать контакта между стабилизированным хромогеном и металлом, иначе может развиваться цвет.

10. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Перед использованием привести все реагенты и образцы к комнатной температуре ($18 - 25^{\circ}\text{C}$). Рекомендуется, чтобы все стандарты и образцы применялись по крайней мере в двойном экземпляре. Оставить некоторые лунки в качестве реагента бланка (от 2 до 4 лунок).

ПЕРВЫЙ ШАГ: СТАНДАРТ, ОБРАЗЦЫ И БЛАНК+РАСТВОР БИОТИНИЛИРОВАННЫХ АНТИТЕЛ

2. Раскапать в соответствующие лунки по 50 мкл образца и 50 мкл каждого разбавленного стандарта, начиная с 15 нг/мл (более детально см. стр. 7). Раскапать по 50 мкл разбавителя образца в лунки, которые будут использоваться в качестве контрольной пробы.
3. Добавить по 50 мкл зеленого раствора биотинилированных обнаруживающих антител во все лунки, содержащие стандарты и образцы. Инкубировать при комнатной температуре 1 час, промыть 5 раз 1х промывочным раствором (по 300 мкл на каждую лунку).

Для промывки: Удалить содержимое планшета. Использовать многоканальную пипетку, чтобы заполнить каждую лунку 300 мкл промывочного буфера, затем удалить содержимое планшета. Повторить процедуру еще 4 раза, чтобы в сумме получилось **ПЯТЬ** промывок. Осторожно стукнуть планшетом о бумажные полотенца или другой гигроскопичный материал.

Внимание: Для автоматизированной промывки аспирировать все лунки и промыть 5 раз промывочным буфером. Стукнуть планшетом о бумажные полотенца или другой гигроскопичный материал. Никогда не позволять реакционным лункам высыхать. Продолжить следующий этап без задержки или прерывания.

ВТОРОЙ ШАГ: СРЕПТАВИДИН-ПЕРОКСИДАЗА ХРЕНА

4. Добавить в каждую лунку по 50 мкл подготовленного раствора стрептавидин-пероксидазы хрена (готовый к использованию). Инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре.
5. Промыть 5 раз 1х промывочным раствором (по 300 мкл на каждую лунку).

ТРЕТИЙ ШАГ: СУБСТРАТ ТМБ

6. Добавить в каждую лунку по 50 мкл готового к использованию реагента субстрата. Инкубировать в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте.

ЧЕТВЕРТЫЙ ШАГ: ОСТАНОВКА РЕАКЦИИ И СЧИТЫВАНИЕ ПЛАНШЕТА

7. Добавить в каждую лунку по 25 мкл стоп-раствора. Считать при 450 нм в пределах 15 минут.
Корректировка оптической интерференции в микропланшете путем вычитания А630 нм рекомендованная, но не обязательная процедура.

ПЯТЫЙ ШАГ: СЧИТЫВАНИЕ И ВЫЧИСЛЕНИЕ

8. Вычислить среднее значение абсорбции реагента бланка и вычитать от всего значений исследуемых лунок (стандарта и образцов). Среднее значение реагента бланка при 450 нм должно быть меньше 0,200
9. Вычислить результаты относительно стандарта.

11. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Калибровочная кривая должна быть определена индивидуально для каждого исследования. Исправьте каждое значение меры поглощения света всех стандартов, вычитая ОП значения реагента бланка (Бл = только разбавитель образца). Вычислить из дубликатов среднее значение абсорбции каждого стандарта.

Калибровочная кривая используется, чтобы определить количество адипонектина в неизвестном образце. Калибровочная кривая производится изображением средней ОП (450 нм), полученной для каждой из концентраций стандартов на вертикальной (Y) оси против соответствующей концентрации адипонектина (нг/мл) на горизонтальной (X) оси.

Создать калибровочную кривую, используя миллиметровку или статистическое программное обеспечение.

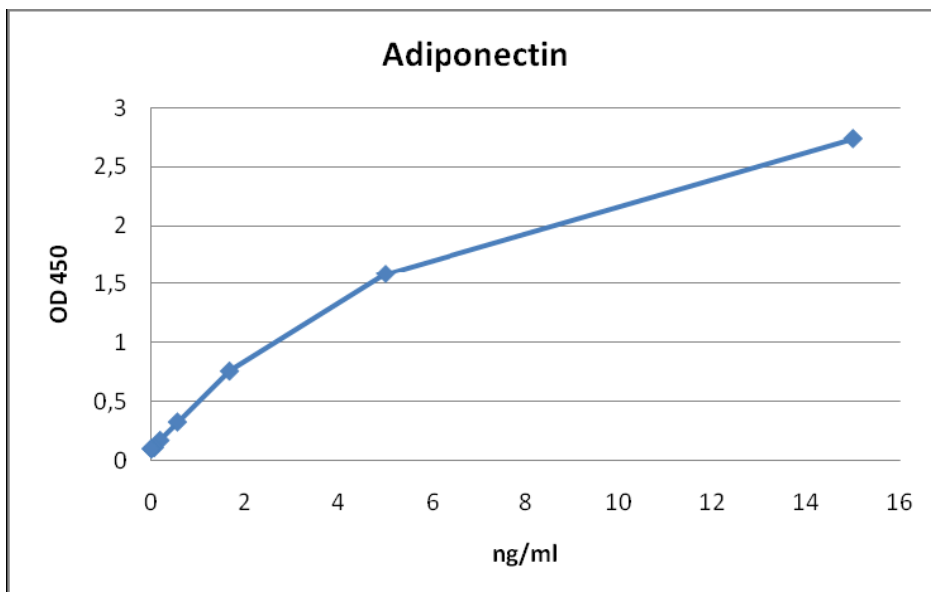
Если образцы производят значения выше чем самый высокий стандарт, разбавить образцы разбавителем образца и повторить анализ. Концентрация, полученная из калибровочной кривой должна быть умножена на коэффициент разбавления.

Умножить значение плазмы или сыворотки на коэффициент разбавления 1000 и значение культуры клеток на коэффициент разбавления 10.

12. ТИПИЧНЫЕ ДАННЫЕ

Следующие данные были получены для различных стандартов адипонектина в диапазоне от 0 до 15 нг/мл.

Внимание: Этот график предоставлен только в качестве примера. Калибровочная кривая должна строиться каждый раз при проведении исследования. Не использовать эти значения в своих расчетах.



13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

	Адипонектин
Диапазон анализа	0,185-15 нг/мл
Точки калибровочной кривой	15, 5, 1,67, 0,56, 0,185 и 0 нг/мл.
Точность в анализе	≤10%
Точность между анализами	≤12%
Точность между сериями	≤12%
Перекрестная реактивность	Перекрестной реактивности не наблюдалось в следующих рекомбинантах белков человека: IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, TNF α, тимус и регулируемый активацией хемокин (TARC)
Специфичность	Отличает человеческий адипонектин.
Чувствительность	<0,185 нг/мл

14. ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

15. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Настоящий набор предназначен только для использования в исследовательских целях квалифицированным и компетентным персоналом, выполняющим диагностические или исследовательские процедуры.

Если получатель настоящего набора передает его любым способом третьему лицу, эта инструкция, должна прилагаться, и вышеуказанный получатель должен под собственную ответственность обеспечить в пользу производителя все ограничения ответственности здесь изложенные.

Компания-производитель не несет ответственности за любые повреждения или потери из-за использования набора в любых случаях кроме тех, которые четко указаны в этой инструкции.

Ответственность производителя ни в коем случае не должна превышать коммерческой стоимости набора.

Производитель ни в коем случае не несет ответственности за косвенные, умышленные или наследственные повреждения, включая, но не ограничиваясь потерей прибыли.

16. ОБНАРУЖЕНИЕ И УСТРАНЕНИЕ ТРУДНОСТЕЙ

Проблема	Причина	Решение
Некачественная калибровочная кривая	1. Неточное капанье или ошибка капанья. 2. Неправильное разбавление стандарта. 3. Бактериологическое загрязнение реагентов.	Проверять пипетки и регулярно калибровать. Перемешать вортексом состав перед использованием и осторожно разбавить в пробирке Эппендорфа.
Слабый сигнал	1. Инкубация короче рекомендуемой. 2. Несоответствующие объемы реагента, неправильное разбавление или ошибка капанья.	Убедиться в достаточности времени инкубации. Проверить пипетки и убедиться в правильности их работы.
Большой КВ	Неправильное капанье и высушивание лунок в течении процедуры анализа.	Проверить пипетки. Немедленно заполнить лунки промывочным буфером и реагентами.
Высокий фон	1. Недостаточная промывка планшета. 2. Загрязненный промывочный буфер. 3. Объем промывочного буфера меньше рекомендуемого.	Посмотреть руководство по правильности промывки. При использовании планшетного промывателя проверить открытость и чистоту всех проточных путей. Приготовить новый промывочный буфер. Использовать 300 мкл/лунку.
Низкая чувствительность	1. Неправильное хранение набора ИФА. 2. Стоп-раствор. 3. Загрязнение реагентов.	Хранить компоненты набора для исследования следуя рекомендациям настоящего руководства пользователя. Защищать раствор субстрата от света. Стоп-раствор должен добавляться в каждую лунку перед измерением. Использовать чистые стерильные наконечники. Удалить загрязненные реагенты.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua