

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АДІПОНЕКТИНУ

EA2500-1, Human Adiponectin ELISA

Каталог. № : EA2500-1

Версія 6.9

Кількість : 96

Виробник : AssayPro, (США)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні збігатися.

ВСТУП

Адипонектин, також відомий як Adipocyte Complement-Related Protein масою 30 кДа (ACRP30), являє собою білок сироватки, який секретується, виражений виключно в диференційованих адипоцитах. Дослідження показують, що знижені концентрації адипонектину плазми пов'язані з ожирінням, резистентністю до інсуліну (1), первинною артеріальною гіпертонією (2), запаленням і атеросклерозом (3), а також гострим інфарктом міокарда (4). З іншого боку, підвищений рівень адипонектину призводить до нефротичного синдрому (5, 6).

ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір AssayMax людського Адипонектину ELISA призначений для виявлення Адипонектину в сечі, плазмі, сироватці, молоці, слині і супернатантах клітинних культур людини. Цей аналіз використовує кількісну методику імуоферментного аналізу типу сендвіч, яка вимірює Адипонектин менш, ніж за 3 години. Поліклональні антитіла, специфічні для Адипонектину, були попередньо нанесені на мікропланшет. Адипонектин в стандартах і зразках затиснутий імобілізованим антитілом і специфічним біотинильованим поліклональним антитілом Адипонектину, який розпізнається кон'югатом стрептавідин-пероксидази. Всі незв'язані матеріали потім вимиваються і субстрат ферменту пероксидази додається. Розвиток кольору зупиняється, і інтенсивність кольору вимірюється.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Підготувати все реагенти (робочий буфер для розведення, промивний буфер, стандарти, біотинильоване антитіло і SP-кон'югат) відповідно до інструкції, перед запуском тесту.
- Підготуйте всі зразки до проведення аналізу. Коефіцієнт розбавлення для зразків вказаний в цьому Протоколі. Тим не менш, користувач повинен самостійно визначити оптимальний коефіцієнт розведення.
- Осадити частинки у флаконі SP-кон'югату і у флаконі біотинильованих антитіл перед їх відкриттям і використанням.
- Цей набір призначений для використання в дослідницьких цілях.
- Набір не слід використовувати після закінчення терміну придатності.
- Стоп розчин є кислим розчином.

РЕАГЕНТИ

- Мікропланшет Людського Адипонектину:** 96-лунковий полістироловий мікропланшет (12 стрипів по 8 лунок), покритий поліклональними антитілами до Адипонектину.
- Ущільнювальні стрічки:** Кожен комплект містить 3 нарізані, чутливі до тиску стрічки ущільнювачів, які можуть бути підігнані під формат індивідуального аналізу.
- Стандарт Людського Адипонектину:** Адипонектин в буферній білкової основі (125 нг, ліофілізований).
- Біотинильоване антитіло Людського Адипонектину (100x):** 100x біотинильованих поліклональних антитіл до Адипонектину (80 мкл).
- Концентрат розчинника MIX (10x):** 10x концентрована буферна білкова основа (30 мл).
- Концентрат промивного буфера (20x):** 20x концентровані буферні поверхнево-активні речовини (30 мл, 2 пляшки).
- Кон'югат стрептавідин-пероксидази (SP-кон'югат):** 100x концентрат (80 мкл).
- Субстрат хромогену:** готовий до використання стабілізований пероксидазо хромогенний субстрат тетраметилбензидину (8 мл).
- Стоп розчин:** 0,5 N соляної кислоти для зупинки реакції хромогенного субстрату (12 мл).

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

- Зберігайте компоненти набору при температурі 2-8 °C або -20 °C після прибуття до закінчення терміну придатності.
- Зберігайте SP-кон'югат і біотинильоване антитіло при -20 °C.
- Зберігайте мікропланшет, концентрат розріджувача (10x), миючий буфер, стоп розчин, і субстрат хромогену при температурі 2-8 °C.
- Невикористані лунки мікропланшетів можуть бути повернуті в пакет з фольги з осушувачем і запечатані. Зберігати до 1 місяця у вакуумному ексікаторі.
- Розріджувач (1x) зберігати до 1 місяця при 2-8 °C.
- Зберігати стандарт при 2-8 °C перед відновленням з розріджувачем і при -20 °C, після відновлення з розріджувачем.

ІНШІ НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ

- Мікропланшетний зчитувальний пристрій, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм.
- Піпетки (1-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл і багатоканальна).
- Деіонізована або дистильована вода класу реагенту.

ЗАБІР, ПІДГОТОВКА ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКА

- Плазма:** Зібрати плазму, використовуючи 1/10 об'єму 0.1 M цитрату натрію в якості антикоагулянту. Центрифугувати зразки при 3000g протягом 10 хвилин. Розвести зразки 1:500 в розріджувачі MIX і проаналізувати. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °C або нижче протягом 3 місяців. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання (EDTA або гепарінова плазма також можуть бути використані в якості антикоагулянтів).
- Сироватка:** Зразки повинні бути зібрані в сироваткову сепараторну пробірку. Після формування згустку, центрифугувати зразки при 3000g протягом 10 хвилин. Видалити сироватку. Розвести зразки 1:500 в розріджувачі MIX і проаналізувати. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °C або нижче протягом 3 місяців. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.
- Супернатанти Культури клітин:** Центрифугувати культуральне середовище при 3000g протягом 10 хвилин. Зібрати супернатанти і аналізувати. Зберігати зразки при -20 °C або нижче. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.
- Сеча:** Провести забір сечі з використанням ємності для збору сечі. Центрифугувати зразки при 800g протягом 10 хвилин і аналізувати. Зберігати зразки при -20 °C або нижче протягом 3 місяців. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.
- Слина:** Провести забір слини, використовуючи пробірку. Центрифугувати зразки при 800g протягом 10 хвилин і аналізувати. Зберігати зразки при -20 °C або нижче протягом 3 місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.
- Молоко:** Провести забір молока з використанням пробірки. Центрифугувати зразки при 800g протягом 10 хвилин. Розвести зразки 1:2 у розріджувачі MIX і проаналізувати. Нерозбавлені проби можна зберігати при -20 °C або нижче протягом 3 місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

- Свіжорозведені реагенти привести до кімнатної температури перед використанням.
- MIX концентрат для розведення (10x):** Якщо кристали утворилися в концентраті, акуратно перемішати, поки кристали повністю не розчиняться. Розвести концентрат для розведення MIX 1:10 очищеною водою. Зберігати до 1 місяця при 2-8 °C.
- Стандарт Людського Адипонектину:** Відновити 125 нг стандарту людського Адипонектину з 2.5 мл розріджувача MIX для отримання стандартного розчину 50 нг/мл. Дозволити стандарту відстоятися протягом 10 хвилин, злегка помішуючи, перед розведеннями. Підготувати точки стандарту в двох або трьох повторах послідовним розведенням стандартного розчину (50 нг/мл) 1:2 з рівним об'ємом MIX розріджувача для отримання розчинів 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 і 0.781 нг/мл. Розріджувач MIX служить в якості нульового стандарту (0 нг/мл). Будь-який розчин, який залишився, повинен бути заморожений при -20 °C і використаний протягом 30 днів.

Standard Point	Dilution	[Acpr30] (ng/ml)
P1	Standard (50 ng/ml)	50.00
P2	1 part P1 + 1 part MIX Diluent	25.00
P3	1 part P2 + 1 part MIX Diluent	12.50
P4	1 part P3 + 1 part MIX Diluent	6.250
P5	1 part P4 + 1 part MIX Diluent	3.125
P6	1 part P5 + 1 part MIX Diluent	1.563
P7	1 part P6 + 1 part MIX Diluent	0.781
P8	MIX Diluent	0.000

- **Антитіла біотинильованого людського Адипонектину (100х):** Коротко центрифугувати біотинильовані антитіла і розвести потрібну кількість антитіл 1:100 з MIX розріджувачем. Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °С.
- **Концентрат буфера для промивок (20х):** Якщо кристали утворилися в концентраті, обережно перемішати до тих пір, поки кристали повністю не розчиняться. Розвести концентрат промивного буфера 1:20 з хімічно чистою водою.
- **SP кон'югат (100х):** Коротко центрифугувати SP Кон'югат і розвести потрібну кількість кон'югату 1:100 з MIX розріджувачем. Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °С.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

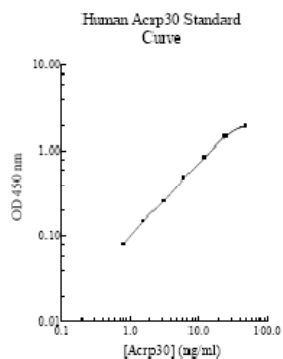
- Приготуйте всі реагенти, робочі розведення стандарту і зразки, як описано в даній інструкції. Перед початком аналізу всі реагенти повинні досягти кімнатної температури. Тестування виконується при кімнатній температурі (20-30 °С).
- Дістаньте зайві стрипи з рамки-утримувача і негайно помістіть їх назад в оригінальний алюмінієвий пакет з осушувачем. Ретельно закрийте пакет для запобігання попадання вологи і зберігайте його у вакуумному ексікаторі.
- Внесіть по 50 мкл стандартів або зразків у відповідні лунки. Закрийте лунки адгезивною плівкою та інкубуйте 1 годину. Встановіть таймер після внесення останнього зразка.
- Промийте лунки 5 разів, використовуючи по 200 мкл буфера для промивок на лунку на один цикл промивки. На кожному кроці перевертайте мікропланшет, зливайте рідину з лунок, потім постукайте 4-5 разів по фільтрувальному папері, для повного видалення залишків рідини з лунок. При використанні машини, промити шість разів 300 мкл промивного буфера, а потім пластину перевернути, видалити вміст; вдарити 4-5 разів по абсорбуючому матеріалу, щоб повністю видалити рідину.
- Внесіть по 50 мкл біотинильованих антитіл анти-Адипонектину в усі лунки і інкубуйте протягом 1 години.
- Промийте мікропланшет як описано вище.
- Внесіть по 50 мкл кон'югату стрептавідин-пероксидази в усі лунки та інкубуйте 30 хвилин. Увімкніть мікропланшетний рідер і запустіть програму заздалегідь.
- Промийте мікропланшет як описано вище.
- Внесіть по 50 мкл хромогенного субстрату в усі лунки та інкубуйте 10 хвилин або до розвитку оптимального фарбування. Акуратно постукайте по краю мікропланшетів для ретельного перемішування і видаліть бульбашки повітря за допомогою наконечника для піпетки.
- Внесіть по 50 мкл стоп-розчину в усі лунки. Фарбування зміниться з блакитного на жовте.
- Зчитайте абсорбцію (ОП) за допомогою мікропланшетного рідера при довжині хвилі 450 нм негайно. Якщо доступна корекція хвилі, відняти показання при 570 нм від тих, які отримані при 450 нм, щоб виправити оптичні неточності. В іншому випадку, зчитати результати тільки при 450 нм. Будь ласка, зверніть увагу, що деякі нестабільні чорні частинки можуть сконцентруватися в найвищих точках після зупинки реакції протягом приблизно 10 хвилин, що знизить покази.

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

- Розрахуйте середнє значення поглинання (ОЩ) для кожного триплета стандартів і зразків.
- Для побудови калібрувальної кривої використовуйте напівлогарифмічний графічний папір, відкладаючи по осі ординат (Y) середнє значення ОЩ при 450 нм для кожного стандарту, а по осі абсцис (X) відповідні значення концентрацій стандартів. Оптимальна крива може бути отримана регресійним аналізом з використанням log-log або 4-параметричної логістичної апроксимації.
- Визначте концентрації в зразках з калібрувальної кривої і помножьте отримане значення на відповідний коефіцієнт розведення.

КАЛІБРУВАЛЬНА КРИВА

- Наведена нижче калібрувальна крива дана тільки в демонстраційних цілях. Калібрувальна крива повинна бути включена в кожну постановку.



РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Цей аналіз розпізнає як природний, так і рекомбінантний людський Адипонектин. Він може виявити і глобулярний домен, і повноформатний Адипонектин.
- Мінімально обумовлена концентрація Адипонектину складає ~ 0.7 нг/мл.
- Коефіцієнт варіації всередині та між серіями складає 4.3% і 7.2%, відповідно.

ЛІНІЙНІСТЬ

Розведення зразка	Середній Відсоток від Очікуваного значення, %	
	Плазма	Сироватка
1:250	90	96
1:500	98	98
1:1000	104	105

Розведення зразка	Середній Відсоток від Очікуваного значення, %	
	Слина	Молоко
Без розведення	91	93
1:2	97	98
1:4	104	103

Розведення зразка	Середній Відсоток від Очікуваного значення, %	
	Сеча	
Без розведення	89	
1:2	98	
1:4	103	

ВІДНОВЛЕННЯ

Значення доданого Стандарту	2 - 20 нг/мл
Відновлення, %	94 - 114 %
Середнє значення, %	99 %

Референсне Значення

- Нормальний рівень Адипонектину плазми знаходиться в діапазоні від 3 до 14 мкг/мл.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com