



НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АПЕЛИНА КОНЕЧНОЙ ТОЧКИ С

Тест для количественного определения пептида Apelin C-Terminus

Кат.№ EIA-APC-1
Производитель: RayBiotech, Inc. (США)

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

Методика от 16-04-2013
Версия 3.2

Для использования в in-Vitro диагностике

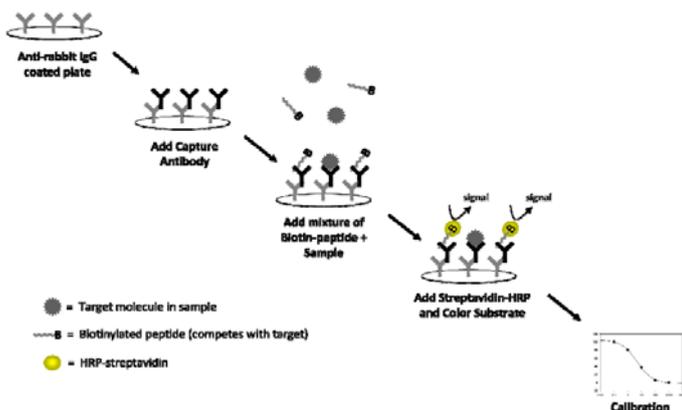
I. ВВЕДЕНИЕ (См. оригинал инструкции).

II. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Данный набор предназначен для количественного анализа по обнаружению пептида Апелина конечной точки С и основан на принципе конкурентного иммуноферментного анализа.

Микропланшет в наборе предварительно покрыт анти-кроличьим вторичным антителом. После стадии блокирования и инкубации пластины с антителами анти-Апелина конечной точки С, и биотинилированные пептиды Apelin C-Terminus, и стандарт пептида или целевой пептид в образцах, взаимодействуют конкурентно с антителами Apelin C-Terminus. Неконкурентные (связанные) биотинилированные пептиды Apelin C-Terminus затем взаимодействуют со Стрептавидин-пероксидазой хрена (SA-HRP), который катализирует реакцию проявления цвета. Интенсивность колориметрического сигнала прямо пропорциональна количеству биотинилированного комплекса пептид-SA-HRP и обратно пропорциональна количеству пептида Apelin C-Terminus в стандарте или образцах. Это происходит из-за конкурентного связывания антител Apelin C-Terminus между биотинилированными пептидами Apelin C-Terminus и пептидами в стандарте или образцах. Стандартная кривая с известной концентрацией пептида Apelin C-Terminus может быть установлена и, соответственно, концентрация пептида Apelin C-Terminus в образцах может быть рассчитана.

Принцип конкурентного ИФА



III. РЕАГЕНТЫ

1. Планшет Apelin C-Terminus (элемент А): 96 лунок (12 стрипов x 8 лунок), покрытых вторичным антителом.
2. Концентрат промывочного буфера (20x) (элемент В): 25 мл
3. Лиофилизированный стандарт Apelin C-Terminus (элемент С): 2 флакона.
4. Лиофилизированные поликлональные антитела анти-Apelin (элемент N): 2 флакона.
5. 1x Разбавитель для анализов Е (элемент R): 2 флакона, 25 мл/флакон. Разбавитель как для стандартов так и для образцов, включая сыворотки или плазмы, среды для культивирования клеток или других типов образцов.
6. Лиофилизированный биотинилированный пептид Apelin (элемент F): 2 флакона.

7. Концентрат HRP-Стрептавидина (элемент G): 600 мкл 100x концентрат HRP-конъюгированного стрептавидина.
8. Лиофилизированный положительный контроль (элемент М): 1 флакон.
9. Реагент TMB одношагового субстрата (элемент Н): 12 мл 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) в буферном растворе.
10. Стоп-раствор (элемент I): 8 мл 0.2 М серной кислоты.
11. Диаграмма анализа (элемент J).
12. Руководство пользователя (элемент К).

IV. ХРАНЕНИЕ

- Стандарт, Биотинилированный пептид и Положительный контроль должны храниться при температуре -20 °С после прибытия. **Избегайте многократного замораживания - оттаивания.**
- Остальные компоненты набора можно хранить при температуре 4 °С.
- Открытые микропланшетные лунки и антитела (элемент N) могут храниться до 1 месяца при 2-8 °С. Вернуть неиспользованные лунки в мешочек с осушителем и запечатать вдоль всего края.
- При хранении как указано выше, RayBiotech гарантирует качество этого набора в течение 6 месяцев от даты отгрузки.

V. НЕОБХОДИМЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер, способный измерить оптическую плотность при 450 нм.
2. Точные пипетки объемом от 2 мкл до 1 мл.
3. Регулируемые пипетки объемом 1-25 мл для приготовления реагентов.
4. 100 мл и 1 л градуированные цилиндры.
5. Фильтровальная бумага.
6. Дистиллированная или деионизированная вода.
7. Программное обеспечение SigmaPlot (или другое программное обеспечение, которое может выполнять четырехпараметровую модель логистической регрессии).
8. Пробирки для подготовки разведения стандарта или пробы.
9. Орбитальный шейкер
10. Алюминиевая фольга
11. Оберточная бумага Saran.

VI. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Для разведения образца и положительного контроля, см. пункты 5, 6, 7 и 9 Подготовка реагентов.

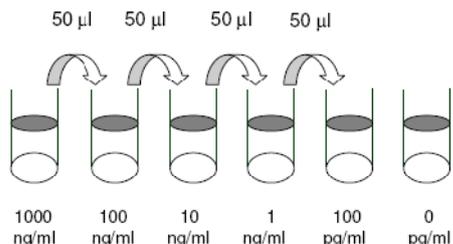
1. Хранить реагенты набора на льду во время приготовления реагентов. Привести планшет к комнатной температуре перед открытием герметичной упаковки.
2. Кратко провести центрифугирование флакона с антителами APC (элемент N) и восстановить с 5 мкл ddH₂O перед использованием. Добавить 50 мкл 1x Разбавителя для анализа Е во флакон для получения концентрата антител обнаружения. Пипетировать вверх и вниз, чтобы аккуратно перемешать.
3. Концентрат антител затем необходимо развести 1:100 с 1x Разбавителем для анализа Е. Это и будет рабочий раствор антител, который будет использован в шаге 2 процедуры анализа.

ПРИМЕЧАНИЕ: Следующие шаги можно сделать во время процедуры инкубации антител (Шаг 2 Методики анализа).

4. Быстро центрифугировать флакон биотинилированного пептида Apelin (элемент F) и восстанавливать с 20 мкл ddH₂O перед использованием. Добавить 5 мкл элемента F к 5 мл 1X Разбавителя для анализов Е. Пипетировать вверх и вниз, чтобы аккуратно перемешать. **Конечная концентрация биотинилированного C-Terminus Apelin будет 50 нг/мл.** Этот раствор будет использоваться только в качестве разбавителя в шаге 5 из раздела «Приготовление реагентов».
5. **Подготовка Стандартов:** Пометить 6 пробирок со следующими концентрациями: 1000 нг/мл, 100 нг/мл, 10 нг/мл, 1 нг/мл, 100 пг/мл и 0 пг/мл. Пипетировать 450 мкл биотинилированного раствора Apelin C-Terminus в каждую пробирку, за исключением 1000 нг/мл (оставить эту пустой). **Очень важно, чтобы концентрация биотинилированного Apelin C-Terminus составляла 50 нг/мл во всех стандартах.**
 - a. Быстро центрифугировать флакон со Стандартом пептида Apelin (элемент С) и развести с 10 мкл ddH₂O. В пробирку, помеченную 1000 нг/мл, пипетировать 8 мкл Элемента С и 792 мкл 50 нг/мл Раствора биотинилированного Apelin C-Terminus (приготовленного на стадии 4 выше). Это и есть исходный раствор Apelin C-Terminus (1000 нг/мл Apelin C-Terminus, 50 нг/мл биотинилированного Apelin C-Terminus).

Тщательно перемешать. Этот раствор служит в качестве первого стандарта.

- b. Для приготовления Стандарта 100 нг/мл, пипетировать 50 мкл исходного раствора *Apelin C-Terminus* в пробирку 100 нг/мл. Тщательно перемешать.
- c. Повторить этот шаг с каждой последующей концентрацией, подготовить серии разведений, как показано на рисунке ниже. Каждый раз использовать 450 мкл биотинилированного *Apelin C-Terminus* и 50 мкл предварительного концентрата до тех пор, пока не получится концентрация 100 пг/мл. Перемешивать каждую пробирку тщательно перед следующим внесением.
- d. Последняя пробирка (0 пг/мл *Apelin C-Terminus*, 50 нг/мл биотинилированного *Apelin C-Terminus*) служит в качестве нулевого стандарта (или общего связывания).



6. Подготовить 10-кратное разведение Элемента F. Чтобы сделать это, добавьте 2 мкл Элемента F к 18 мкл 1X Разбавителя для образцов E. Этот раствор будет использоваться в шагах 7 и 9.
7. Приготовление Положительного Контроля: Быстро центрифугировать флакон с положительным контролем и развести со 100 мкл ddH₂O перед использованием (элемент M). В пробирку с элементом M добавить 101 мкл 1x Разбавителя для образцов E. Кроме того, добавить 2 мкл 10-кратно разбавленного Элемента F (приготовленного в шаге 6) в пробирку. Это и есть 2-кратное разведение положительного контроля. Тщательно перемешать. Положительный контроль является образцом клеточной культуральной среды с ожидаемым сигналом между 10% и 30% от общего связывания (70-90% конкуренция) при разведении как описано выше. Разведение может быть продолжено при необходимости, но убедитесь в том, что конечная концентрация биотинилированного *Apelin C-Terminus* составляет 50 нг/мл.
8. Если Элемент B (20X Промывочный концентрат) содержит видимые кристаллы, прогреть до комнатной температуры и аккуратно перемешать до полного растворения. Развести 20 мл Концентрата промывочного буфера в деионизированной или дистиллированной воде для получения 400 мл 1X Промывочного буфера.
9. Подготовка образца: Использовать 1X Разбавитель для образцов E + биотинилированный APC для разбавления образцов, в том числе сыворотки/плазмы, клеточной культуральной среды и других типов образцов. *Убедитесь в том, что конечная концентрация биотинилированного Apelin C-Terminus составляет 50 нг/мл в каждом образце.* ПРИМЕР: для приготовления 4-кратного разведения образца, смешайте 2,5 мкл 10-кратно разбавленного Элемента F (приготовленного в шаге 6), 185 мкл 1X Разбавителя для образцов E, и 62,5 мкл вашего образца; аккуратно перемешать. Общий объем составляет 250 мкл, достаточный для проведения анализа в дуплях на планшете. *Не используйте разбавитель Элемента F из шага 5 для пробоподготовки. Если вы планируете использовать неразбавленные образцы, Вам все равно необходимо добавить биотинилированный Apelin C-Terminus для получения конечной концентрации 50 нг/мл.* ПРИМЕР: Добавить 2,5 мкл 10-кратно разбавленного Элемента F к 247,5 мкл образца. ПРИМЕЧАНИЕ: Оптимальные факторы разбавления образца должны быть определены эмпирически, однако вы можете связаться со службой технической поддержки (888-494-8555; techsupport@raybiotech.com) для получения рекомендуемого диапазона для разбавления сыворотки или плазмы.
10. Быстро центрифугировать флакон с HRP-Стрептавидином (элемент G) перед использованием. Концентрат HRP-Стрептавидина необходимо развести в 100 раз 1X Разбавителем для образцов E.

VII. ПРОЦЕДУРА ТЕСТИРОВАНИЯ

1. Хранить реагенты на льду во время приготовления реагентов. Рекомендуется тестирование всех стандартов и образцов в двух экземплярах.
2. Добавить 100 мкл антител анти-*Apelin C-Terminus* (см. Подготовка реагентов шаг 3) в каждую лунку. Инкубировать в течение 1,5 часов при комнатной температуре при осторожном встряхивании (1-2 цикла/сек.). Также можно инкубировать в течение ночи при 4 °C.
3. Удалить раствор и промыть 4 раза с 1x промывочным раствором (200-300 мкл). Промывка может проводиться с использованием многоканальной пипетки или автопромывочного устройства. Полное удаление жидкости на каждой стадии является необходимым условием хорошей работы. После последней промывки, удалить оставшийся промывочный буфер путем аспирации или декантации. Перевернуть планшет и промокнуть чистыми бумажными полотенцами.
4. Добавить 100 мкл каждого Стандарта (Подготовка реагентов шаг 5), положительного контроля (Подготовка реагентов шаг 7) и образца (Подготовка реагентов шаг 9) в соответствующие лунки. Не забудьте про Бланк лунку (только Рабочий Растворитель). Покрыть лунки и инкубировать в течение 2,5 часов при комнатной температуре с осторожным встряхиванием (1-2 цикла/сек.) или в течение ночи при 4 °C.
5. Удалить раствор. Повторить промывку 4 раза как в шаге 3.
6. Добавить 100 мкл приготовленного раствора Стрептавидина (см. Подготовка реагентов шаг 10) в каждую лунку. Инкубировать в течение 45 минут при комнатной температуре с осторожным встряхиванием. Рекомендуется, чтобы время инкубации не было короче или длиннее 45 минут.
7. Удалить раствор. Повторить промывку 4 раза как в шаге 3.
8. Добавить 100 мкл Реагента Субстрата ТМВ одношагового (элемент H) в каждую лунку. Выдержать в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте с легким встряхиванием (1-2 цикла/сек.).
9. Добавить 50 мкл стоп-раствора (элемент I) в каждую лунку. Считать результат при 450 нм немедленно.

VIII. СУММАРНАЯ ПРОЦЕДУРА ТЕСТИРОВАНИЯ

1. Подготовить все реагенты, образцы и стандарты в соответствии с инструкциями.
 - ↓
2. Добавить 100 мкл антитела *Apelin C-Terminus* в каждую лунку. Выдержать 1,5 часа при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °C.
 - ↓
3. Добавить 100 мкл стандарта или образца в каждую лунку. Инкубировать 2,5 часа при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °C.
 - ↓
4. Добавить 100 мкл приготовленного раствора Стрептавидина. Инкубировать 45 минут при комнатной температуре.
 - ↓
5. Добавить 100 мкл Реагент субстрата ТМВ одношагового в каждую лунку. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.
 - ↓
6. Добавить 50 мкл стоп раствора в каждую лунку. Считать результат при 450 нм немедленно.

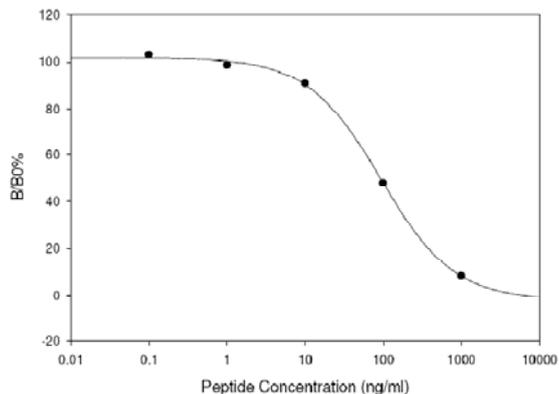
IX. ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитать среднюю абсорбцию для каждого набора повторяющихся стандартов, контролей и образцов, и вычесть среднюю оптическую плотность нулевого стандарта. Построить Стандартную кривую на логарифмической миллиметровой бумаге или с помощью программного обеспечения Sigma, со стандартной концентрацией на оси x и абсорбцией на оси y. Нарисовать наиболее подходящую прямую линию через стандартные точки.

Процент поглощения = $(V - OD \text{ бланка}) / (V_0 - OD \text{ бланка})$, где
 V = OD образца или стандарта и
 V₀ = OD нулевого стандарта (общее связывание)

A. ТИПИЧНЫЕ ДАННЫЕ

Эти стандартные кривые для демонстрации только. Стандартная кривая должна быть построена для каждого анализа.

**В. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ**

Минимальная определяемая концентрация *Apelin C-Terminus* составила 29.1 пг/мл.

С. ДИАПАЗОН ОБНАРУЖЕНИЯ

0,1-1,000 нг/мл

Д. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Внутрисерийная: CV <10%

Между постановками: CV <15%

Х. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Перекрестная реактивность: Данный ИФА не проявляет перекрестной реактивности с любым из следующих испытанных цитокинов: Ghrelin, Nesfatin и NPY.

Этот набор предназначен для определения *C-Terminus* пептида 77-аа *Apelin* и, следовательно, ожидается, что возможно обнаружение всех активных форм *Apelin*, включая *Apelin-36*, *Apelin-31*, *Apelin-28* и *Apelin-13*.

XI. ЛИТЕРАТУРА(См. в оригинале инструкции).**XII. ВОЗМОЖНЫЕ НЕИСПРАВНОСТИ И ИХ УСТРАНЕНИЕ**

Проблема	Причина	Решение
1. Плохая стандартная кривая	1. Неаккуратное пипетирование 2. Неверное разведение стандарта	1. Проверить пипетки 2. Убедитесь, что Вы покрутили пробирку с элементом С и тщательно растворили порошок осторожным перемешиванием.
2. Слабый сигнал	1. Слишком короткое время инкубации 2. Неадекватные объёмы реагентов или неправильное разведение	1. Убедитесь в достаточном времени инкубации; шаг 2 процедуры анализа поменять на инкубацию в течение ночи 2. Проверьте пипетки и убедитесь в надлежащей подготовке
3. Высокий CV	1. Неаккуратное пипетирование	1. Проверьте пипетки
4. Завышенный задний фон	1. Планшет плохо промыт 2. Загрязненный промывочный буфер	1. Проверить инструкции по надлежащей промывке. Если используется промывочное устройство, проверьте, все ли порты доступны. 2. Приготовьте свежий промывочный буфер
5. Низкая чувствительность	1. Ненадлежащее хранение набора 2. Стоп раствор	1. Храните стандарт при < -20 °С после восстановления, остальные при 4 °С. Хранить раствор субстрата защищенным от света. 2. Стоп раствор должен быть добавлен в каждую лунку перед измерением

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