

# НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IL15 ЛЮДИНИ

## EIA-VAS, EIAM-VAS, EIAR-VAS, Human/Mouse/Rat Vasopressin EIA

Каталог. №: VAS

Кількість : 96

Виробник : RayBiotech, Inc. (США)

Методика від 01-12-2015



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

### I. ВСТУП

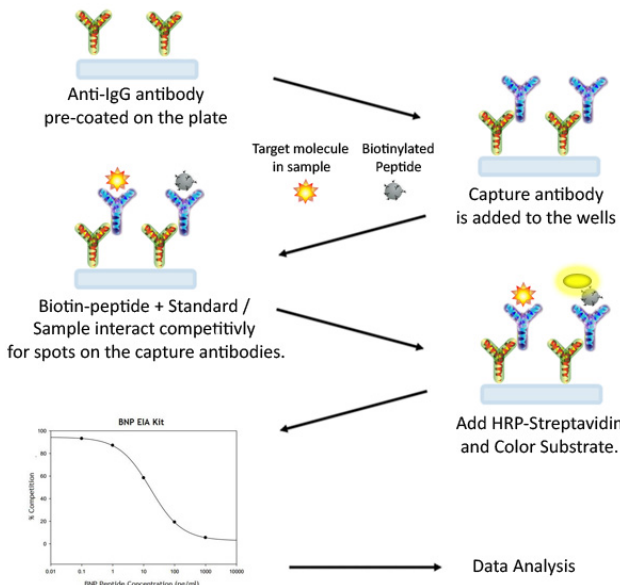
(Див. оригінал інструкції).

### II. ЗАГАЛЬНИЙ ОПИС

Набір RayBio® Vasopressin EIA є імуоферментним аналізом для кількісного виявлення пептиду Вазопресину, заснований на принципі конкурентного ферментного імуоаналізу.

У цьому аналізі, біотинильований пептид Вазопресину вводиться в зразки і стандарти. Зразки та стандарти потім додаються в планшет, де біотинильований пептид Вазопресину конкурує з ендogenous (неміченим) Вазопресинном за зв'язування з антитілом анти-Вазопресину. Після стадії промивки, будь-який пов'язаний біотинильований Вазопресин потім взаємодіє з пероксидазою хрому (HRP)-стрептавідином, який каталізує реакцію розвитку кольору. Інтенсивність колориметричного сигналу прямо пропорційна кількості захопленого біотинильованого пептиду вазопресину і обернено пропорційна кількості ендogenous вазопресину в стандарті або зразках. Стандартна крива з відомою концентрацією пептиду вазопресину може бути побудована і концентрація вазопресину пептиду в зразках може бути відповідно розрахована.

### III. ЯК ЦЕ ПРАЦЮЄ



### IV. ЗБЕРІГАННЯ

Весь набір може зберігатися до 6 місяців при -20 - -80 °C від дати відвантаження. Для тривалого зберігання, рекомендується зберігати при температурі -80 °C. **Уникнути повторних циклів заморожування-відтавання.** Щодо зберігання приготованих реагентів див. таблицю нижче.

### V. РЕАГЕНТ

Компонент	Розмір/Опис	Зберігання/Стабільність після підготовки
Мікропланшет Вазопресину (Елемент А)	96 лунок (12 смужок x 8 лунок), покриті вторинним антитілом	1 місяць при 4 °C*
Концентрат промивного буфера (20X)	25 мл 20X концентрованого розчину	1 місяць при 4 °C

(Елемент В)		
Стандарт Пептиду Вазопресину (Елемент С)	2 флакона Пептиду Вазопресину. 1 флакона достатньо для запуску кожного стандарту у двох примірниках	Перший стандарт: 2-3 дні при 4 °C Додаткові розведення: не зберігати
Поліклональне антитіло анти-Вазопресину (Елемент N)	2 флакона анти-Вазопресину	1 місяць при 4 °C
5X Розріджувач для Аналізу В (Елемент Е)	15 мл 5X концентрованого буфера. Розріджувач для обох стандартів і зразків в тому числі сироватки, плазми, культивованого середовища клітин або інших типів зразків	1 місяць при 4 °C
Біотинильований Пептид Вазопресину (Елемент F)	2 флакони Біотинильованого Пептиду Вазопресину, 1 флакона достатньо для аналізу всієї пластини	2-3 дні при 4 °C
Концентрат HRP-стрептавідину (Елемент G)	600 мкл 1000X концентрованого HRP-кон'югованого стрептавідину	Не зберігати та не використовувати повторно
Позитивний Контроль (Елемент M)	1 флакон Позитивного Контролю	2-3 дні при 4 °C
Реагент однопрокового субстрату TMB (TMB) в буферному розчині (Елемент H)	12 мл 3,3',5'-тетраметилбензидину (TMB) в буферному розчині	N/A
Стоп-розчин (Елемент I)	8 мл 0.2 M сірчаної кислоти	N/A

\* Повернути невикористані лунки в пакет, що містить осушувач, запечатати уздовж всієї кромки.

### VI. НЕОБХІДНІ ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ

- Мікропланшетний рідер, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 nm.
- Точні піпетки об'ємом від 2 мкл до 1 мл.
- Регульовані піпетки об'ємом 1-25 мл для приготування реагентів.
- 100 мл і 1 л градуйовані циліндри.
- Фільтрувальний папір.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Програмне забезпечення SigmaPlot (або інше програмне забезпечення, яке може виконувати 4-параметрові логістичні регресивні моделі).
- Пробірки для підготовки розведення стандарту або зразка.
- Орбітальний шейк ер.
- Алюмінієва фольга.
- Пластикові обгортки.

### VII. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Тримайте реагенти на льоду під час кроків підготовки реагентів.

#### A. Підготовка Планшета і Антитіла Анти-Вазопресину

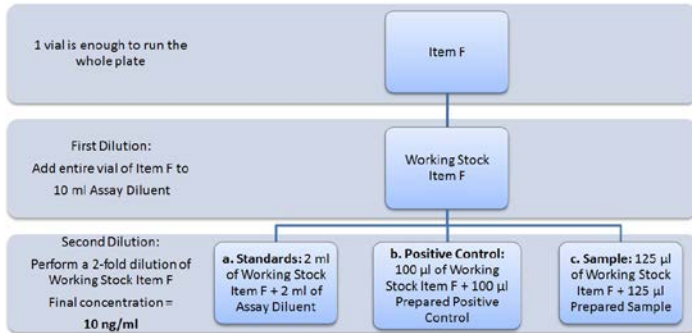
- Привести планшет до кімнатної температури перед відкриттям запечатаного пакета.
- Позначити 8-лункові смужки відповідно для проведення аналізу.
- Розчинник для Зразків В (Елемент Е) слід розбавити в 5 раз деіонізованою або дистильованою водою.
- Швидко центрифугувати флакон з антитілами анти-Вазопресину (Елемент N). Додати 50 мкл 1X Розчинника для Зразків В у флакон для приготування концентрату антитіла. Піпетувати вниз/вверх, щоб акуратно перемішати.
- Концентрат антитіла повинен бути розведений в 100 раз 1X Розчинником для Зразків В. Це і буде робочий розчин антитіла анти-Вазопресину, який буде бути використаний на стадії 2 Процедури Аналізу (Розділ VIII).

*Примітка: Наступні кроки можуть бути проведені під час процедури інкубації антитіла (крок 2 Процедури Аналізу).*

#### B. Підготовка Біотинильованого Вазопресину (Елемент F)

- Коротко центрифугувати флакон біотинильованого вазопресину (Елемент F) перед використанням.
- Див. зображення нижче для правильного приготування Елемента F. Перемістити весь вміст флакона з Елементом F в пробірку, що містить 10 мл 1X Розчинника для Зразків В. Це Робочий Розчин Елемента F. Піпетувати вгору/вниз, щоб акуратно перемішати.  
*Кінцева концентрація біотинильованого Вазопресину буде 20 нг/мл.*

- Друге Розведення Елемента F для Стандартів: Додати 2 мл Робочого Розчину Елемента F до 2 мл 1X Розчинника для Аналізів В. Кінцева концентрація біотинильованого Вазопресину буде **10 нг/мл**.
- Друге Розведення Елемента F для Позитивного Контролю: Додати 100 мкл Робочого Розчину Елемента F до 100 мкл підготовленого Позитивного Контролю (Елемент М). (Див. Розділ D для підготовки Позитивного Контролю). Кінцева концентрація біотинильованого Вазопресину буде **10 нг/мл**.
- Друге Розведення Елемента F для зразків: Додати 125 мкл Робочого Розчину Елемента F до 125 мкл підготовленого зразка (див. розділ E для підготовки зразка). Це розведення в 2 рази вашого зразка. Кінцева концентрація біотинильованого Вазопресину буде **10 нг/мл**.

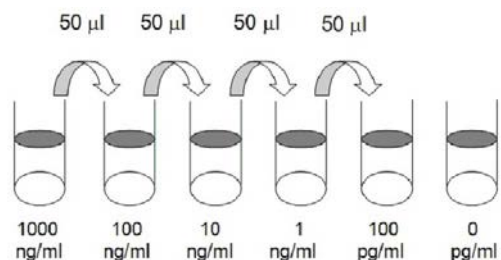


### С. Підготовка стандартів

- Помітити 6 мікропробірок з наступними концентраціями: 1000 нг/мл, 100 нг/мл, 10 нг/мл, 1 нг/мл, 100 пг/мл і 0 пг/мл. Піпетувати 450 мкл робочого розчину біотинильованого Вазопресину Елемента F (підготовленого на стадії 6а) в кожну пробірку, крім 1000 нг/мл (залишити цю одну порожньою).

*Дуже важливо переконатися, що концентрація біотинильованого Вазопресину 10 нг/мл усіх стандартів.*

- Коротко центрифугувати флакон Стандарту Вазопресину (Елемент С). Піпетувати 8 мкл Елемента С і 792 мкл 10 нг/мл робочого розчину біотинильованого Вазопресину (отриманого на етапі 6а) в пробірку 1000 нг/мл. Ретельно перемішати. Цей розчин служить як перший стандарт (1000 нг/мл стандарту Вазопресину, 10 нг/мл біотинильованого Вазопресину).
- Для приготування стандарту 100 нг/мл, піпетувати 50 мкл 1000 нг/мл стандарту Вазопресину в пробірку 100 нг/мл. Ретельно перемішати.
- Повторити цей крок з кожною наступною концентрацією, з підготовкою серії розведень, як показано на малюнку нижче. Кожен раз використовуйте 450 мкл біотинильованого Вазопресину і 50 мкл попередньої концентрації аж до отримання 100 пг/мл. Змішайте кожну пробірку ретельно перед наступним внесенням.



### D. Підготовка Позитивного контролю

- Коротко центрифугувати флакон Позитивного Контролю (Елемент М).
- Зверніться до кроку 6b. Це розведення в 2 рази Позитивного Контролю. Кінцева концентрація біотинильованого Вазопресину повинна бути 10 нг/мл.

Позитивний контроль є зразком середовища культури клітин, який служить контролем системи щоб переконатися, що компоненти набору працюють. Отримана ОЩ не використовуватиметься в будь-яких розрахунках; якщо не спостерігаються позитивні результати, будь ласка, зв'яжіться з відділом технічної підтримки RayBiotech. Позитивний контроль може бути розведений ще більше, якщо необхідно, але переконайтеся, що кінцева концентрація біотинильованого Вазопресину 10 нг/мл.

### E. Підготовка зразків

- Якщо Ви хочете провести 2-кратне розбавлення вашого зразка, перейдіть до кроку 6c. Якщо Ви хочете провести вище розбавлення вашого зразка, розбавити зразок з 1X Розчинником для Аналізу В перед виконанням кроку 6c.  
ПРИКЛАД (зробити 4-кратне розведення зразка):
  - Розвести зразок в 2 рази (62.5 мкл зразка + 62.5 мкл 1X Розчинника для Зразків В).
  - Виконати крок 6c (125 мкл робочого розчину Елемента F + 125 мкл зразка, отриманого вище).

Загальний обсяг становить 250 мкл, достатньо для лунок в дублях на мікропланшеті.

Дуже важливо переконатися, що кінцева концентрація біотинильованого Вазопресину **10 нг/мл**.

Примітка: Оптимальні коефіцієнти розведення зразка повинні бути визначені емпірично, однак ви може звернутися до служби технічної підтримки (888-494-8555; techsupport@raybiotech.com) для отримання рекомендованих факторів розведення сироватки.

### F. Приготування Промивного Буфера і HRP

- Якщо Елемент В (20X Промивний Концентрат) містить видимі кристали, нагріти до кімнатної температури і акуратно перемішати до повного розчинення.
- Розвести 20 мл Концентрату Промивного Буфера деіонізованою або дистильованою водою, щоб отримати 400 мл 1X Промивного Буфера.
- Коротко центрифугувати HRP-стрептавідин (Елемент G) перед використанням.
- Розвести концентрат HRP-стрептавідину в 1000 разів з 1X Розчинником для Аналізу В.

### VIII. ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

- Тримайте реагенти на льоду під час кроків підготовки реагентів. Рекомендується, щоб всі стандарти і зразки були проаналізовані, щонайменше, в дублях.
- Додати 100 мкл Антитіл анти-Вазопресину (Елемент N) (див. Підготовка реагентів крок 3) в кожну лунку. Інкубувати протягом 1.5 годин при кімнатній температурі при обережному струшуванні (1-2 цикли/секунду). Також можна інкубувати протягом ночі при 4 °C.
- Видалити розчин і промити 4 рази з 1X Буфером Промивного Розчину (200-300 мкл кожен). Промивку проводити з використанням багатоканальної піпетки або автоматизованого промивного пристрою. Повне видалення рідини на кожній стадії є необхідною умовою хорошої роботи. Після останньої промивки видалити залишки Промивного Буфера шляхом аспірації або декантації. Перевернути планшет і промокнути чистими паперовими рушниками.
- Додати 100 мкл кожного стандарту (див. Підготовка реагентів Розділ С), Позитивного Контролю (див. Підготовка реагентів Розділ D) і зразка (див. Підготовка реагентів Розділ E) у відповідні лунки. Включити лунку Бланка (тільки Розчинник для Аналізу). Накрити лунки і інкубувати протягом 2.5 годин при кімнатній температурі з обережним струшуванням (1-2 цикли/секунду). Також можна інкубувати протягом ночі при 4 °C.
- Видалити розчин і промити 4 рази як в Кроці 3.
- Додати 100 мкл приготованого Розчину Стретавідину (див. Підготовка Реагентів крок 7) у кожну лунку. Інкубувати протягом 45 хвилин при кімнатній температурі з обережним струшуванням. Рекомендується, щоб час інкубації не був коротший або довший ніж 45 хвилин.
- Видалити розчин і промити 4 рази як в Кроці 3.
- Додати 100 мкл реагенту однокрокового Субстрату ТМБ (Елемент H) в кожну лунку. Витримати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі в темряві з легким струшуванням (1-2 цикли/секунду).
- Додати 50 мкл стоп-розчину (Елемент I) у кожну лунку. Зчитати результат при 450 нм негайно.

### IX. СУМАРНА ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

- Підготувати всі реагенти, зразки і стандарти відповідно до інструкцій.
- Додати 100 мкл анти-Вазопресину в кожну лунку. Інкубувати 1.5 години при кімнатній температурі або протягом ночі при 4 °C.
- Додати 100 мкл стандарту або зразка в кожну лунку. Витримати 2.5 години при кімнатній температурі або протягом ночі при 4 °C.
- Додати 100 мкл приготованого розчину Стретавідину. Інкубувати 45 хвилин при кімнатній температурі.
- Додати 100 мкл однокрокового Реагенту субстрату ТМБ в кожну лунку. Інкубувати 30 хвилин при кімнатній температурі.

6. Додати 50 мкл Стоп Розчину в кожну лунку. Зчитати результат при 450 нм негайно.

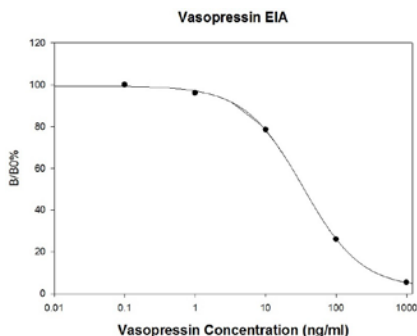
#### X. ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Розрахувати середню абсорбцію для кожного набору дублікатів стандартів, контролів і зразків, і відняти середню оптичну щільність нульового стандарту. Побудувати Стандартну криву використовуючи SigmaPlot (або інше програмне забезпечення, яке може виконувати 4-параметрові логістичні регресивні моделі), зі стандартною концентрацією на осі x і абсорбцією на осі y. Намалювати найбільш підходящу пряму лінію через стандартні точки.

Відсоток поглинання =  $(B - \text{ОЩ бланка}) / B_0 - \text{ОЩ бланка}$ , де  
 $B$  = ОЩ зразка або стандарту і  
 $B_0$  = ОЩ нульового стандарту (загальне зв'язування)

#### A. ТИПОВІ ДАНІ

Ці стандартні криві призначені тільки для демонстрації. Стандартна крива повинна бути побудована для кожного аналізу.



#### B. ЧУТЛИВІСТЬ

Мінімальні концентрації вазопресину, які визначаються, становлять 0.75 нг/мл.

#### C. Діапазон виявлення

0.1-1,000 нг/мл

#### D. Відтворюваність

Intra-аналіз: CV < 10%  
 Inter-аналіз: CV < 15%

#### E. Схема Аналізу

Рекомендоване розташування на пластини:

Blank	Blank	SA1	SA1	SA9	SA9	SA17	SA17	SA25	SA25	SA33	SA33
Total Binding	Total Binding	SA2	SA2	SA10	SA10	SA18	SA18	SA26	SA26	SA34	SA34
Standard1	Standard1	SA3	SA3	SA11	SA11	SA19	SA19	SA27	SA27	SA35	SA35
Standard2	Standard2	SA4	SA4	SA12	SA12	SA20	SA20	SA28	SA28	SA36	SA36
Standard3	Standard3	SA5	SA5	SA13	SA13	SA21	SA21	SA29	SA29	SA37	SA37
Standard4	Standard4	SA6	SA6	SA14	SA14	SA22	SA22	SA30	SA30	SA38	SA38
Standard5	Standard5	SA7	SA7	SA15	SA15	SA23	SA23	SA31	SA31	SA39	SA39
Pos Control	Pos Control	SA8	SA8	SA16	SA16	SA24	SA24	SA32	SA32	SA40	SA40

Ключ:

Бланк = тільки Буфер

Загальне Зв'язування = Тільки Біотин-Вазопресин

Стандарт 1 = 1000 нг/мл

Стандарт 2 = 100 нг/мл

Стандарт 3 = 10 нг/мл

Стандарт 4 = 1 нг/мл

Стандарт 5 = 100 пг/мл

Позитивний Контроль = Біотин з Елементом M

#### XI. СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Перехресна реактивність: Цей набір не демонструє перехресну реактивність ні з одним з цитокінів: Грелін, Nesfatin, Ангіотензин II, NPY і APC.

#### XIII. МОЖЛИВІ НЕСПРАВНОСТІ ТА ЇХ УСУНЕННЯ

Проблема	Причина	Усунення
Погана стандартна крива	<ul style="list-style-type: none"> <li>Неакуратне піпетування</li> <li>Неадекватне розведення стандарту</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Перевірити піпетки</li> <li>Переконайтеся, що Ви покрутили пробірку з елементом С і ретельно розчинили порошок обережним перемішуванням</li> </ul>
Слабкий сигнал	<ul style="list-style-type: none"> <li>Занадто короткий час інкубації</li> <li>Неадекватні обсяги реагентів або неправильне розведення</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Переконайтеся, що Ви покрутили пробірку з елементом С і ретельно розчинили порошок обережним</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>перемішуванням</li> <li>Переконайтеся в достатньому часі інкубації; крок 2 процедури аналізу поміняти на інкубацію протягом ночі</li> <li>Перевірте піпетки і переконайтеся в належній підготовці</li> </ul>
Високий CV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Неакуратне піпетування</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Перевірте піпетки</li> </ul>
Завищений задній фон	<ul style="list-style-type: none"> <li>Планшет погано промитий</li> <li>Забруднений промивний буфер</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Перевірити інструкції щодо належного промивання</li> <li>Якщо використовується промивний пристрій, перевірте, чи всі порти доступні</li> <li>Приготуйте свіжий промивний буфер</li> </ul>
Низька чутливість	<ul style="list-style-type: none"> <li>Неналежне зберігання набору</li> <li>Стоп розчин</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Зберігати стандарт при &lt; -70 °C після відновлення, решту при 4 °C. Зберігати розчин субстрату захищеним від світла</li> <li>Стоп розчин повинен бути доданий в кожну лунку перед аналізом</li> </ul>



#### 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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)