



НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРДИОТРОФИНА-1 МЕТОДОМ ИФА

Тест для количественного определения Кардиотрофина
СТ-1 в сыворотке человека

Кат.№ ELH-CT1-001
Производитель: RayBiotech, Inc. (США)

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

Методика от 01-03-2012

Для использования in-Vitro диагностике

I. ВВЕДЕНИЕ

Набор RayBio® Human CT-1 (кардиотрофин-1) ELISA предназначен для количественного измерения человеческого СТ-1 в сыворотке крови (концентрация человеческого СТ-1 является довольно низкой в нормальной сыворотке/плазме, он может быть не обнаружен в этом анализе), плазме, супернатантах культуральных клеток и моче. Этот анализ используют антитело, специфичное для человеческого СТ-1, нанесенного на 96-луночный планшет. Стандарты и образцы пипетируются в лунки и СТ-1, присутствующий в образце, связывается с лунками иммобилизованным антителом. Лунки промываются и добавляется биотинилированное анти-человеческое СТ-1 антитело. После вымывания несвязанного биотинилированного антитела, в лунки пипетируется конъюгированный с пероксидазой хрена стрептавидин. Лунки снова промываются и в них добавляется раствора субстрата ТМБ, происходит окрашивание в количестве, пропорциональном количеству связанного СТ-1. Стоп-раствор меняет цвет с синего на желтый, и интенсивность окраски измеряется при 450 нм.

II. РЕАГЕНТЫ

1. Планшет СТ-1 (элемент А): 96 лунок (12 стрипов x 8 лунок), покрытых анти-человеческим СТ-1.
2. Концентрат промывочного буфера (20x) (элемент В): 25 мл 20x концентрированного раствора.
3. Стандарты (элемент С): 2 флакона, рекомбинантный человеческий СТ-1.
4. Разбавитель для анализов (элемент Е): 15 мл 5x концентрированного буфера. Для разбавления Стандарта/Образца (образцы сыворотки/плазмы /клетки культуральной среды/моча).
5. Антитела обнаружения СТ-1 (элемент F): 2 флакона биотинилированного анти-человеческого СТ-1 (каждый флакон является достаточным для анализа половины микропланшета).
6. Концентрат HRP-Стрептавидина (элемент G): 200 мкл 600x концентрата HRP-конъюгированного стрептавидина.
7. Реагент ТМБ одношагового субстрата (элемент Н): 12 мл 3,3', 5,5' -тетраметилбензидина (ТМБ) в буферном растворе.
8. Стоп-раствор (элемент I): 8 мл 0.2 М серной кислоты.

III. ХРАНЕНИЕ

Может храниться до 6 месяцев при 2- 8 °С от даты отгрузки. Стандартный (рекомбинантный белок) должен храниться при температуре -20 °С или -80 °С (рекомендуется при -80 °С) после восстановления. Открытые микропланшетные лунки или реагенты могут храниться в течение 1 месяца при 2-8 °С. Вернуть неиспользованные лунки в пакет с осушителем, запечатать вдоль всего края.

Примечание: набор может быть использован в течение одного года, если он хранился при -20 °С.

Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

IV. НЕОБХОДИМЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер, способный измерять 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. Логарифмическая миллиметровая бумага или программное обеспечение для анализа данных ELISA.

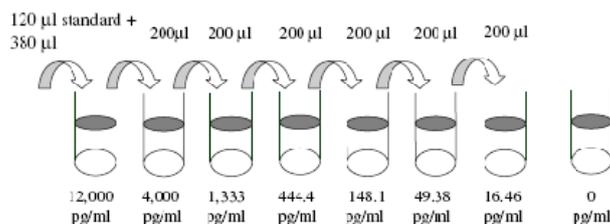
8. Пробирки для подготовки разведения стандарта или пробы.

V. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Приведите все реагенты и образцы до комнатной температуры (18 - 25 °С) перед использованием.
2. Разведение образцов: Если ваши образцы должны быть разбавлены, 1x Разбавитель для анализа (элемент Е) должен быть использован для разведения сыворотки/плазмы/ культуры супернатанта/мочи.
Рекомендуемое разведение для нормальной сыворотки/плазмы: 2 раза *.

*Обратите внимание, что уровни анализируемого белка могут варьироваться между различными образцами. Оптимальные факторы разбавления для каждого образца должны определяться лаборантом.

3. Разбавитель для анализов (элемент Е) следует развести в 5 раз деионизированной или дистиллированной водой перед использованием.
4. Приготовление стандарта: **Быстро покрутить флакон с элементом С.** Добавить 400 мкл 1x Разбавителя анализа (элемент Е) во флакон с элементом С для приготовления 50 нг/мл стандартного раствора. **Полностью растворить порошок тщательным осторожным перемешиванием.** Добавить 120 мкл стандарта СТ-1 из флакона элемента С в пробирку с 380 мкл 1x Разбавителя анализа для приготовления 12,000 пг/мл стандартного раствора. Внесите по 400 мкл 1x Разбавителя анализа в каждую пробирку. Используйте стандартный раствор 12,000 пг/мл для получения серии разбавлений (см. ниже). Тщательно перемешивать каждую пробирку перед следующей передачей. 1x Разбавитель анализов служит в качестве нулевого стандарта (0 пг/мл).



5. Если промывочный концентрат (20x) (элемент В) содержит видимые кристаллы, нагреть его до комнатной температуры и осторожно перемешать до полного растворения. Развести 20 мл Концентрата промывочного раствора деионизированной или дистиллированной водой до получения 400 мл 1x промывочного буфера.
6. Быстро покрутить флакон с антителами обнаружения (элемент F) перед использованием. Добавить 100 мкл 1x Разбавителя анализов в пробирку для приготовления концентрата антител обнаружения. Пипетировать вверх и вниз, чтобы аккуратно перемешать (Концентрат можно хранить при температуре 4 °С в течение 5 дней). Концентрат антител обнаружения должен быть разведен в 80 раз с 1x Разбавителем для анализа и использован в шаге VI "Процедура анализа".
7. Быстро покрутить флакон с Концентратом HRP-Стрептавидина (элемент G) и пипетировать вверх и вниз, чтобы аккуратно перемешать перед использованием. Концентрат HRP-Стрептавидина должен быть разведен в 600 раз с 1x Разбавителем анализа.

Например: Быстро покрутить флакон (элемент G) и пипетировать вверх и вниз, чтобы аккуратно перемешать. Добавить 20 мкл Концентрата HRP-Стрептавидина в пробирку с 12 мл 1x Разбавителя для анализа для приготовления окончательного 600 кратного разведения раствора HRP-Стрептавидина (не хранить разбавленный раствор для использования на следующий день). Хорошо перемешать.

VI. ПРОЦЕДУРА ТЕСТИРОВАНИЯ

1. Приведите все реагенты и образцы до комнатной температуры (18-25 °С) до использования. Рекомендуется, чтобы все стандарты и образцы были проанализированы, по крайней мере, в дублях.
2. Добавить 100 мкл каждого стандарта (см. Подготовка реагентов шаг 2) и образца в соответствующие лунки. Накрыть лунку и

инкубировать в течение 2,5 часов при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °С при осторожном встряхивании.

- Удалить раствор и промыть 4 раза с 1х промывочным раствором. Вымойте заполнения каждую лунку промывочным буфером (300 мкл) с использованием многоканальной пипетки или авто промывочного 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.
- Добавить 100 мкл 1х подготовленных биотинилированных антител (Подготовка реагентов шаг 6) в каждую лунку. Инкубировать в течение 1 часа при комнатной температуре с осторожным встряхиванием.
- Удалить раствор. Повторить промывку как в шаге 3.
- Добавить 100 мкл приготовленного раствора Стрептавидина (см. Подготовка реагентов шаг 7) в каждую лунку. Инкубировать в течение 45 минут при комнатной температуре с осторожным встряхиванием.
- Удалить раствор. Повторить промывку как в шаге 3.
- Добавить 100 мкл Реагента Субстрата ТМВ одношагового (элемент Н) в каждую лунку. Выдержать в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте с легким встряхиванием.
- Добавить 50 мкл стоп-раствора (элемент I) в каждую лунку. Считать результат при 450 нм немедленно.

VII. СУММАРНАЯ ПРОЦЕДУРА ТЕСТИРОВАНИЯ

- Подготовить все реагенты, образцы и стандарты в соответствии с инструкциями.



- Добавить 100 мкл стандарта или пробы в каждую лунку. Выдержать 2,5 часа при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °С.



- Добавить 100 мкл подготовленных антител биотина в каждую лунку. Инкубировать 1 час при комнатной температуре.



- Добавить 100 мкл приготовленного раствора Стрептавидина. Инкубировать 45 минут при комнатной температуре.



- Добавить 100 мкл Реагент субстрата ТМВ одношагового в каждую лунку. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.



- Добавить 50 мкл стоп раствора в каждую лунку. Считать результат при 450 нм немедленно.

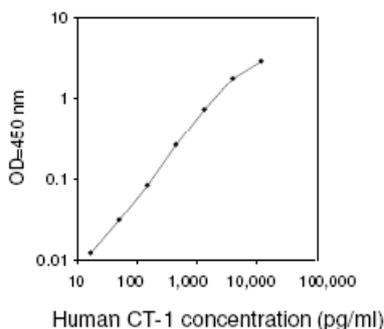
VIII. ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитать среднюю абсорбцию для каждого набора повторяющихся стандартов, контролей и образцов, и вычест 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.

A. ТИПИЧНЫЕ ДАННЫЕ

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

Assay Diluent C



V. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Минимальная определяемая доза СТ-1, как правило, менее 20 пг/мл.

C. ВОССТАНОВЛЕНИЕ

Восстановление определялась добавлением различных уровней СТ-1 в нормальные человеческие сыворотки, плазмы и среды для культивирования клеток. Средние Извлечения приведены ниже:

Тип образца	Среднее восстановление, %	Диапазон, %
Сыворотка	132.4	120-142
Плазма	101.2	70-134
Клетки культуральной среды	98.20	76-112

D. ЛИНЕЙНОСТЬ

Тип образца	Сыворотка	Плазма	Клетки культуральной среды
1:2 Среднее значение от Ожидаемого Диапазон (%)	96.71 85-115	131.1 120-140	102.0 93-110
1:4 Среднее значение от Ожидаемого Диапазон (%)	75.89 69-86	106.0 97-113	77.31 70-88

E. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Внутрисерийная: CV <10%

Между постановками: CV <12%

IX. СПЕЦИФИКА

Перекрестная реактивность: Данный ИФА не проявляет перекрестной реактивности с любым из следующих испытанных цитокинов: *human Angiogenin, BDNF, BLC, ENA-78, FGF-4, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13, IL-15, IL-309, IP-10, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, Leptin (OB), MCP-1, MCP-3, MDC, MIP-1α, MIP-1 β, MIP-1, MMP-1, -2, -3, -10, PARC, RANTES, SCF, TARC, TGF-β, TIMP-1, TIMP-2, TNF-α, TNF-β, TPO, VEGF.*

X. 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 объемы 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

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