НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИМІРУ VEGF ЛЮДИНИ В СИРОВАТЦІ, ПЛАЗМІ ТА СУПЕРНАТАНТАХ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

ELH-VEGF, Human VEGF-A ELISA

Кат. № : ***ELH-VEGF*** *Методика від* ***15-04-2016***
Кількість : ***96***
Виробник : ***RayBiotech, Inc. (США)***

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

Для використання в in-Vitro діагностиці

I. ВСТУП

VEGF (судинний ендотеліальний фактор росту) також називають VEGF-A, відповідно до ідентифікації декількох факторів, пов'язаних з VEGF (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E). VEGF робить істотний вплив на проникність судин і є сильним ангіогенним білком в декількох біоаналізах і, ймовірно, також грає роль в неоваскуляризації за фізіологічних умов. VEGF грає роль в розвитку і функціонуванні фолікулів примата і жовтого тіла яєчників, підтримуючи поширення кровоносних судин. Диференціація адипоцитів, феохромоцитів і міоцитів супроводжується контрольованою експресією VEGF. Було продемонстровано, що гальмування активності VEGF шляхом обробки з моноклональними антитілами, специфічними для VEGF, може пригнічувати ріст пухлини в живому організмі.

Набір RayBio® Human VEGF ІФА є імуноферментним аналізом для кількісного виміру людського VEGF в сироватці, плазмі та супернатантах клітинних культур. У цьому аналізі використовують антитіла, специфічні для VEGF людини, нанесеного на 96-лунковий планшет. Стандарти та зразки піпетують в лунки, і VEGF, присутні в зразку, зв'язуються в лунках з іммобілізованим антитілом. Лунки промиваються і додається біотинильоване анти-людське VEGF антитіло. Після вимивання незв'язаного біотинильованого антитіла, в лунки піпетують стрептавідин, кон'югований з HRP. Лунки знову промиваються, додається розчин субстрату TMB і відбувається розвиток забарвлення в пропорції до кількості пов'язаного VEGF. Стоп-розчин змінює колір з синього на жовтий, і інтенсивність забарвлення вимірюється при 450 нм.

II. ЗБЕРІГАННЯ

Набір може зберігатися до 1 року при температурі -20 °C від дати поставки. Запобігати повторних циклів заморожування-відтавання. Набір може зберігатися при температурі 4 °C протягом до 6 місяців. Для тривалого зберігання, рекомендується зберігати при температурі -80 °C. Для зберігання приготованого реагенту, див. таблицю нижче.

III. РЕАГЕНТИ

Компонент	Розмір/Опис	Зберігання/ Стабільність <u>Після Підготовки</u>
Планшет VEGF-A (елемент A)	96 лунок (12 смужок x 8 лунок), з нанесеним анти-VEGF-A людини	1 місяць при 4 °C*
Концентрат промивного буфера (20x) (елемент B)	25 мл 20x концентрованого розчину	1 місяць при 4 °C
Стандарт Білка (елемент C)	2 флакони, VEGF-A людини. 1 флакона достатньо для аналізу кожного стандарту в дублях	1 тиждень при -80 °C
Антитіла виявлення VEGF-A (елемент F)	2 флакони біотинильованого анти-людського VEGF-A (кожен флакон є достатнім для аналізу половини мікропланшета)	5 днів при 4°C
Концентрат HRP-стрептавідин (елемент G)	200 мкл 300x концентрату HRP-кон'югованого стрептавідину	Не зберігати і не використовувати повторно
Реагент TMB одно-крокового субстрату (елемент H)	12 мл 3,3', 5,5' - тетраметилбензидину (ТМБ) в буферному розчині	N/A
Стоп-розчин (елемент I)	8 мл 0.2 M сірчаної кислоти	N/A
Розчинник для аналізів A (елемент D)	30 мл буфера розчинника, 0,09% азид натрію в якості консерванту	N/A
Розчинник для аналізів B (елемент E)	15 мл 5x концентрованого буфера	1 місяць при 4 °C

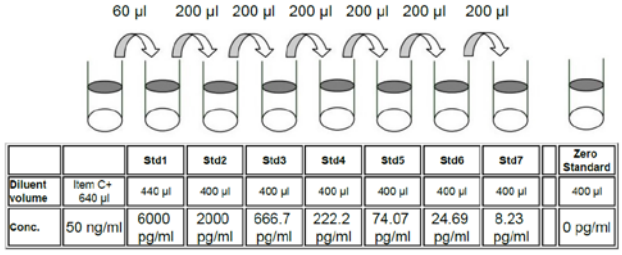
*Повернути невикористані смужки в мішечок, що містить осушувач, запечатати уздовж усього краю.

IV. НЕОБХІДНІ ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ

1. Мікропланшетний рідер, здатний виміряти оптичну щільність при 450 нм.
2. Точні піпетки об'ємом від 2 мкл до 1 мл.
3. Регульовані піпетки об'ємом 1-25 мл для приготування реагентів.
4. 100 мл і 1 л градуйовані циліндри.
5. Фільтрувальний папір.
6. Дистильована або деіонізована вода.
7. Логарифмічний міліметровий папір або програмне забезпечення для аналізу даних ELISA.
8. Пробірки для підготовки розведення стандарту або проби.

V. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Привести всі реагенти і зразки до кімнатної температури (18-25 °C) перед використанням.
2. Розчинник для аналізів B (елемент E) слід розвести в 5 разів деіонізованою або дистильованою водою перед використанням.
3. Розведення зразків: Якщо ваші зразки повинні бути розведені, Розчинник для аналізів A (елемент D) слід використовувати для розведення сироватки і плазми зразків. 1x Розчинник для аналізу B (елемент E) повинен бути використаний для розведення зразків супернатанту культури клітин. Рекомендується розчин для нормальної сироватки/плазми: 2-5 разів.
   Зверніть увагу, що рівні аналізованого білка можуть варіюватися між різними зразками. Оптимальні фактори розведення для кожного зразка повинні визначатися лаборантом.
4. Приготування стандарту: Швидко покрутити флакон з Елементом C. Додати 640 мкл 1x Розчинника для Аналізу A (для зразків сироватки/плазми) або 1x Розчинника для аналізу B (для клітинного культурального середовища) в пробірку з Елементом C для приготування стандартного розчину 50 нг/мл. Повністю розчинити порошок ретельним обережним перемішуванням. Додати 60 мкл стандарту VEGF з флакону Елемента C в пробірку з 440 мкл Розчинника для Аналізу A або 1x Розчинника для аналізу B для приготування стандартного розчину 6,000 пг/мл. Внести 400 мкл Розчинника для Аналізу A або 1x Розчинника для аналізу B в кожну пробірку. Використовуйте стандартний розчин 6,000 пг/мл для отримання серії розведень (див. нижче). Ретельно перемішувати кожну пробірку перед наступною передачею. Розчинник для Аналізу A або 1x Розчинник для аналізу B служить в якості нульового стандарту (0 пг/мл).



5. Якщо Промивний Концентрат (20x) (елемент B) містить видимі кристали, нагріти його до кімнатної температури і обережно перемішати до повного розчинення. Розвести 20 мл Концентрату Промивного Буфера деіонізованою або дистильованою водою для отримання 400 мл 1x Промивного Буфера.
6. Покрутити флакон з Антитілами Виявлення (Елемент F) перед використанням. Додати 100 мкл 1x Розчинника для аналізів B (елемент E) в пробірку для приготування концентрату антитіл виявлення. Піпетувати вгору і вниз, щоб акуратно перемішати (Концентрат можна зберігати при температурі 4 °C протягом 5 днів). Концентрат антитіл виявлення повинен бути розведений в 100 разів з 1x Розчинником для аналізу B (елемент E) і використаний в кроці 5 частини VI "Процедура аналізу".

7. Покрутити флакон з концентратом HRP-стрептавідину (Елемент G) і піпетувати вгору і вниз, щоб акуратно перемішати перед використанням. Концентрат HRP-стрептавідину повинен бути розведений в 300 разів з 1х Розчинником для аналізу B (елемент E).

   Наприклад: Покрутити флакон (Елемент G) і піпетувати вгору і вниз, щоб акуратно перемішати. Додати 40 мкл Концентрату HRP-стрептавідину в пробірку з 12 мл 1х Розчинника для аналізу B (елемент E) для приготування остаточного 300-кратного розведення розчину HRP-стрептавідину (не зберігати розведений розчин для використання на наступний день). Добре перемішати.

VI. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

1. Довести всі реагенти і зразки до кімнатної температури (18-25 °C) перед використання. Рекомендується, щоб всі стандарти і зразки були проаналізовані, щонайменше, в дублях.
2. Помітити 8-лункові смужки відповідно до вашого експерименту.
3. Додати 100 мкл кожного стандарту (див. Підготовка реагентів, крок 3) і зразка у відповідні лунки. Накрити лунки і інкубувати протягом 2,5 годин при кімнатній температурі при обережному струшуванні.
4. Видалити розчин і промити 4 рази з 1х Розчином для Промивання. Промити шляхом заповнення кожної лунки Промивним Буфером (300 мкл) з використанням багатоканальної піпетки або авто промивного пристрою. Повне видалення рідини на кожній стадії є необхідною умовою гарної роботи. Після останньої промивки видалити залишки Промивного Буфера шляхом аспірації або декантування. Перевернути планшет і промокнути чистими паперовими рушниками.
5. Додати 100 мкл 1х підготовлених біотинильованих антитіл (Підготовка реагентів, крок 6) в кожну лунку. Інкубувати протягом 1 години при кімнатній температурі з обережним струшуванням.
6. Видалити розчин. Повторити промивання як в кроці 4.
7. Додати 100 мкл приготованого Розчину стрептавідину (див. Підготовка реагентів, крок 7) в кожну лунку. Інкубувати протягом 45 хвилин при кімнатній температурі з обережним струшуванням.
8. Видалити розчин. Повторити промивання як в кроці 4.
9. Додати 100 мкл реагенту Субстрату TMB (елемент H) в кожну лунку. Витримати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі в темряві з легким струшуванням.
10. Додати 50 мкл Стоп-розчину (Елемент I) в кожну лунку. Зчитати результат при 450 нм негайно.

VII. СУМАРНА ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

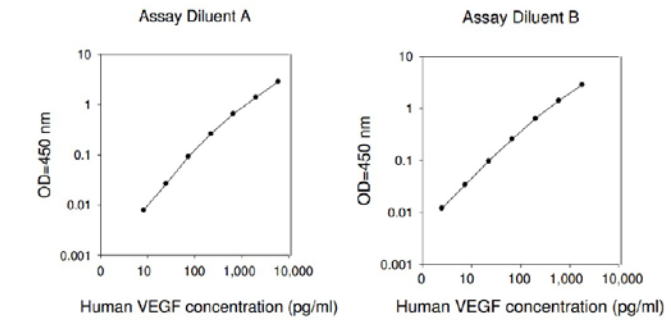
1. Підготувати всі реагенти, зразки і стандарти відповідно до інструкцій.
2. Додати 100 мкл стандарту або зразка в кожну лунку. Витримати 2,5 години при кімнатній температурі.
3. Додати 100 мкл підготовлених антитіл біотину в кожну лунку. Інкубувати 1 годину при кімнатній температурі.
4. Додати 100 мкл приготованого розчину стрептавідину. Інкубувати 45 хвилин при кімнатній температурі.
5. Додати 100 мкл Реагент субстрату TMB одно крокового в кожну лунку. Інкубувати 30 хвилин при кімнатній температурі.
6. Додати 50 мкл стоп розчину в кожну лунку. Зчитати результат при 450 нм негайно.

VIII. ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Розрахувати середню абсорбцію для кожного набору повторюваних стандартів, контролів і зразків і відняти середню оптичну щільність нульового стандарту. Побудувати Стандартну криву на логарифмічній міліметрівці або за допомогою програмного забезпечення Sigma, зі стандартною концентрацією на осі x і абсорбцією на осі y. Намалювати найбільш підходящу пряму лінію через стандартні точки.

A. ТИПОВІ ДАНІ

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



B. ЧУТЛИВІСТЬ

Мінімальна доза VEGF-A людини, яка визначається, становить 10 пг/мл. Мінімальна доза, яка визначається, розраховується як концентрація аналізованої речовини, що є результатом абсорбції, яка на 2 стандартних відхилення вище, ніж бланк (буфер розчинника).

C. ВІДНОВЛЕННЯ

Відновлення визначалось додаванням різних рівнів VEGF-A в наступні типи зразків. Середні значення наведені нижче:

Тип зразка	Середнє відновлення, %	Діапазон, %
Сироватка	104.4	92-115
Плазма	105.7	93-114
Клітини культурального середовища	103.5	92-113

D. ЛІНІЙНІСТЬ

Тип зразка	Сироватка	Плазма	Клітини культурального середовища
1:2 Середнє значення від Очікуваного Діапазон (%)	96 92-113	97 91-114	97 90-111
1:4 Середнє значення від Очікуваного Діапазон (%)	97 91-112	96 88-108	102 91-113

E. ВІДТВОРЮВАНІСТЬ

Всередині серії: CV <10%
Між серіями: CV <12%

IX. СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Даний ІФА не проявляє перехресної реактивності з будь-яким з наступних випробуваних цитокінів: *Human Angiogenin, BDNF, BLC, ENA-78, FGF-4, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13, IL-15, I-309, IP-10, G-CSF, GM-CSF, IFN-gamma, Leptin, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MDC, MIP-1 alpha, MIP-1 beta, MIP-1 delta, PARC, PDGF, RANTES, SCF, TARC, TGF-beta, TIMP-1, TIMP-2, TNF-alpha, TNF-beta, TPO.*

X. МОЖЛИВІ НЕСПРАВНОСТІ І ЇХ УСУНЕННЯ

Проблема	Причина	Усунення
Погана стандартна крива	• Неакуратне піпетування • Неадекватне розведення стандарту	• Перевірити піпетки • Переконайтеся, що Ви покрутили пробірку з елементом C і ретельно розчинили порошок обережним перемішуванням
Слабкий сигнал	• Занадто короткий час інкубації • Неадекватні обсяги реагентів або неправильне розведення	• Переконайтеся, що Ви покрутили пробірку з елементом C і ретельно розчинили порошок обережним перемішуванням • Переконайтеся в достатньому часі інкубації; крок 3 процедури аналізу поміняти на інкубацію протягом ночі • Перевірте піпетки і переконайтеся в належній підготовці
Високий CV	• Неакуратне піпетування	• Перевірте піпетки
Завищений задній фон	• Планшет погано промитий • Забруднений промивний буфер	• Перевірити інструкції щодо належного промивання Якщо використовується промивний пристрій, перевірте, чи всі порти доступні • Приготуйте свіжий промивний буфер
Низька чутливість	• Неналежне зберігання набору • Стоп розчин	• Зберігати стандарт при < -70 °C після відновлення, решту при 4 °C. Зберігати розчин

		субстрату захищеним від світла • Стоп розчин повинен бути доданий в кожну лунку перед аналізом

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

© Переклад українською мовою ТОВ «ДІАМЕБ»