



НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ LL-37 МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Набор для количественного определения Человеческого LL-37 в образцах плазмы и супернатанта культуры клеток человека

Кат. № : HK321
 Производитель : Hycultbiotech (Нидерланды)

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

Методика от 11-2012

Только для лабораторных исследований.
 Не для клинических или диагностических целей

1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Набор предназначен для количественного определения Человеческого LL-37 в образцах плазмы и супернатанта культуры клеток человека. Набор предназначен только для лабораторных исследований, но не для диагностических или терапевтических процедур.

Анализ должен проводиться опытным лабораторным персоналом.

2. ВВЕДЕНИЕ

Кателицидины – семейство антимикробных белков, главным образом обнаружены в пероксидаза-отрицательных гранулах нейтрофилов. Эти соединения синтезируются в виде препробелков. Человеческий катионный антимикробный белок (hCAP)18 является на сегодняшний день единственным идентифицированным человеческим кателицидином. hCAP18 (18 kD) также присутствует в субпопуляциях лимфоцитов и моноцитов, в сквамозном эпителии (рта, языка, пищевода, шейки матки и вагины), пульмонарном эпителии, кератиноцитах во время воспалительных кожных заболеваний и при эпидидимите. Было показано, что антибактериальный С-концевой hCAP18, LL-37 (37 аминокислот) проявляет антимикробную активность как против грам-отрицательных, так и против грам-положительных бактерий. Этот кателицин оказывает синергический антибактериальный эффект с дефензинами. Например, недостаточность LL-37 в слюне согласуется с наличием заболевания пародонтита у пациентов с болезнью Kostmann. Более того, он функционирует в качестве хемотаксического агента для нейтрофилов, моноцитов и Т-клеток. LL-37 устойчив к протеолитическому разрушению и в ограниченной степени цитотоксичен по отношению к клеткам млекопитающих. Установлено, что нормальное содержание LL-37 в плазме составляет 25-250 нг/мл. Во время инфекционных заболеваний концентрация этого белка повышается.

3. ОСОБЕННОСТИ НАБОРА

- Рабочее время 3 ½ часа.
- Минимально определяемая концентрация составляет 0.1 нг/мл.
- Диапазон измерения концентрации составляет 0.1-100 нг/мл.
- Рабочий объем равен 100 мкл/лункку.

Перекрестная реактивность

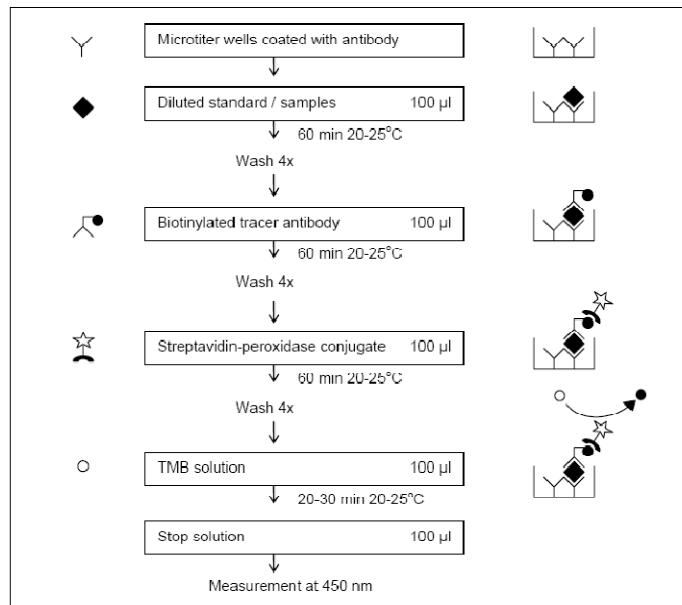
Потенциальные перекрестно-реагирующие протеины, выявленные ИФА человеческого LL-37:

Таблица 1

Вещество от животного:	Реактивность
Корова	Отсутствует
Собака	Отсутствует
Коза	Отсутствует
Лошадь	Отсутствует
Мышь	Отсутствует
Кролик	Отсутствует
Крыса	Отсутствует
Овца	Отсутствует
Свинья	Отсутствует

Перекрестная реакция для других видов или белков/пептидов не тестировалась.

4. ОБЗОР ПРОТОКОЛА



- Человеческий LL-37 ELISA представляет собой готовый к использованию твердофазный иммуноферментный анализ, основанный на принципе сэндвича с продолжительностью работы 3 1/2 часа.
- Эффективный формат пластины с двенадцатью одноразовыми 8-луночными полосками позволяет свободный выбор размера пакета для анализа.
- Образцы и стандарты инкубируют в лунках, покрытых антителами, определяющими человеческие LL-37.
- Биотинилированное антитело индикатора будет связываться с захваченным человеческим LL-37.
- Конъюгат стрептавидин-пероксидазы будет связываться с биотинилированным антителом индикатора.
- Конъюгат стрептавидин-пероксидазы реагирует с субстратом, тетраметилбензидин (TMB).
- Ферментная реакция останавливается добавлением лимонной кислоты.
- Поглощение при 450 нм измеряется с помощью спектрофотометра. Стандартная кривая получается путем построения оптической плотности (линейно) по сравнению с соответствующими концентрациями стандартов человеческого LL-37 (логарифмически).
- Концентрация образцов человеческого LL-37, которые тестируются одновременно со стандартами, может быть определена по стандартной кривой.

5. СОСТАВЛЯЮЩИЕ НАБОРА И ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ

Таблица 2 HK321-01

Компонент набора	№ позиции	Количество	Цветовой код
Буфер для промывки/разведения A 20x	WBDB51	1 флакон (60 мл)	Бесцветный
Буфер для промывки/разведения B 40x	WBDB31	1 флакон (30 мл)	Бесцветный
Буфер для разведения образца A 20x	DB96	1 флакон (10 мл)	Бесцветный
Буфер для разведения образца B 40x	DB95	1 флакон (5 мл)	Бесцветный
Стандарт		2 флакона, лиофилизированный	Белый
Индикатор, биотинилированный		1 флакон, 1 мл лиофилизированный	Белый
Стрептавидин-пероксидаза 100x	CON03	1 пробирка, 0.25 мл в растворе	Коричневый
TMB субстрата	TMB050/TMB 100	1 флакон (11 мл)	Коричневый
Стоп раствор	STOP110	1 флакон (22 мл)	Красный
12 предварительно покрытых микротитровальных полосок		1 планшет	

Сертификат контроля качества		1	
Инструкция		1	
Листок для записи информации		2	

Таблица 2/1 HK321-02

Компонент набора	№ позиции	Количество	Цветовой код
Буфер для промывки/разведения A 20x	WBDB51	1 флакон (60 мл)	Бесцветный
Буфер для промывки/разведения B 40x	WBDB31	1 флакон (30 мл)	Бесцветный
Буфер для разведения образца A 20x	DB96	1 флакон (10 мл)	Бесцветный
Буфер для разведения образца B 40x	DB95	1 флакон (5 мл)	Бесцветный
Стандарт		4 флакона, лиофилизированный	Белый
Индикатор, биотинилированный		2 флакона, 1 мл лиофилизированный	Белый
Стрептавидин-пероксидаза 100x	CON03	1 пробирка, 0.25 мл в растворе	Коричневый
TMB субстрата	TMB050/TMB 100	1 флакон (22 мл)	Коричневый
Стоп раствор	STOP110	1 флакон (22 мл)	Красный
12 предварительно покрытых микротитровальных полосок		2 планшета	
Сертификат контроля качества		1	
Инструкция		1	
Листок для записи информации		2	

- После получения, хранить отдельные компоненты при температуре 2 - 8 °С. Не замораживать.
- Не использовать компоненты по истечении срока годности, указанного на этикетке.
- Стандарт, индикатор и стрептавидин-пероксидаза являются стабильными в лиофилизированной форме до истечения срока годности, указанного на этикетке, при хранении при 2 - 8 °С.
- Точная концентрация стандарта указана на этикетке флакона и в свидетельстве о контроле качества.
- После разведения стандарт, индикатор и стрептавидин-пероксидаза стабильны в течение 1 месяца, если хранить при температуре 2 - 8 °С.
- После получения пакет из фольги для пластины герметически запечатать. Любые нарушения вышеупомянутых условий могут влиять на производительность пластины при анализе.
- Неиспользованные полоски немедленно поместить в упаковку, содержащую осушитель, и запечатать. Качество гарантируется до истечения срока годности, если хранить при температуре 2 - 8 °С.

Необходимые, но не поставляемые материалы

- Калиброванные микропипетки и одноразовые наконечники.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Моечное устройство для планшета: автоматическое или ручное.
- Полипропиленовые емкости.
- Калиброванный ELISA ридер, способный измерять оптическую плотность при 450 нм.
- Адгезивные пленки могут быть заказаны отдельно. Пожалуйста, свяжитесь с вашим местным дистрибьютором.
- Центрифуга для пробирок 1 мл.

6. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для использования в исследовательских целях, а не для диагностического или терапевтического использования.
- Этот набор должен использоваться только квалифицированным персоналом лаборатории.
- Ни при каких обстоятельствах не добавлять азид натрия в качестве консерванта в любой из компонентов.
- Не использовать компоненты набора по истечении срока годности.
- Не смешивать реагенты из разных наборов и партий. Реагенты были стандартизированы в качестве единого целого для данной

партии. Используйте только реагенты, поставляемые производителем.

- Анализ был оптимизирован для указанного стандартного диапазона. Не изменяйте Стандартный диапазон.
- Открывать флаконы осторожно: флаконы запечатаны под вакуумом.
- Не глотать никакой из компонентов набора.
- Реагенты содержат 2-хлорацетамид в качестве консерванта. 2-хлорацетамид вреден при попадании на кожу и токсичен при проглатывании. При несчастном случае или если вы почувствовали недомогание, немедленно обратитесь к врачу.
- TMB субстрат является светочувствительным, избегать попадания яркого света. Раствор должен быть бесцветным до использования.
- Стоп раствор содержит 2% щавелевой кислоты и может вызвать раздражение или ожог дыхательной системы, кожи и глаз. Избегать прямого контакта с кожей и глазами. Если контакт происходит, немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу.
- Время инкубации, температура инкубации и пипетируемые объемы, отличные от указанных, могут давать ошибочные результаты.
- Не использовать повторно лунки или не помещать реагенты обратно в бутылки.
- Обращаться со всеми биологическими образцами как с потенциально опасными и способными передавать заболевания.
- Гемолизированные, гиперлипемические или загрязненные образцы могут давать ошибочные результаты.
- Использовать полипропиленовые емкости для приготовления стандарта и образцов. Не использовать полистироловые пробирки или пластины образцов.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор и хранение

Плазма

Имейте в виду, что человеческий LL-37 высвобождается из нейтрофилов в сыворотку в процессе коагуляции крови. Это может привести к ложно положительным результатам. Исходя из этого, рекомендуется использование "осторожной плазмы", которая может быть получена как указано ниже.

Хранить свежесобраные образцы крови на льду. Если используется плазма, отделить плазму от крови в течение 20 минут после забора крови центрифугированием (1500xg при 4 °С в течение 15 минут). Будьте осторожны не потревожить белые кровяные тельца. Центрифугировать повторно перемещенную плазму во избежание загрязнения белыми кровяными тельцами: 1500xg при 4 °С в течение 15 минут.

Самые надежные результаты получаются, если используется ЭДТА плазма.

Хранение

Хранить образцы при температуре ниже -20 °С, предпочтительно при -70 °С в полипропиленовых пробирках. Хранение при температуре -20 °С может повлиять на восстановленный человеческий LL-37. Использовать образцы в течение 24 часов после размораживания. Избегать нескольких циклов замораживания-оттаивания, что может привести к потере активности человеческого LL-37 и дать ошибочные результаты.

Не использовать гемолизированные, гиперлипемические, или загрязненные образцы.

Перед выполнением анализа, образцы должны быть доведены до комнатной температуры (18 - 25 °С) и осторожно перемешаны. Подготовить всех образцы (контроль и тестовые образцы) до начала тестовой процедуры. Избегайте вспенивания.

Процедура разведения

Образцы плазмы

Человеческие LL-37 могут быть измерены точно, если образцы плазмы разводят, по крайней мере, 20x перед использованием поставляемым буфером для разведения в полипропиленовых пробирках.

Самые надежные результаты получаются, если используется ЭДТА плазма.

Замечание относительно рекомендуемого разведения образца

Рекомендуемое разведение для образцов следует использовать в качестве ориентира. Восстановление человеческого LL-37 из неразбавленного образца не является 100% и может изменяться от

образца к образцу. При тестировании менее разбавленных образцов желательно проводить эксперименты по восстановлению для определения влияния матрицы на обнаружение человеческого LL-37. Не использовать полистироловые пробирки или пластины образцов для приготовления или разбавления образцов.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Привести все реагенты к комнатной температуре (20 - 25 °C) перед использованием. Вернуть в надлежащие условия для хранения сразу же после использования.

Буфер для промывки/разведения

Подготовьте 20x концентрированный буфер для промывки/разведения А путем смешивания 60 мл с 540 мл дистиллированной или деионизированной воды. Подготовьте 40x концентрированный буфер для промывки/разведения В путем смешивания 30 мл с 570 мл дистиллированной или деионизированной воды. Окончательно смешать оба раствора в равных пропорциях и тщательно перемешать. Буфер для промывки/разведения является достаточным для 2 x 96 тестов.

Там, где требуется меньшее количество тестов, подготовьте необходимый объем путем разбавления 1 части 20x концентрированного буфера для промывки/разведения А с 9 частями дистиллированной или деионизированной воды и 1 часть 40x концентрированного буфера для промывки/разведения В с 19 частями дистиллированной или деионизированной воды. Окончательно смешайте оба раствора в равных пропорциях и тщательно перемешайте.

Концентрированный буфер может содержать кристаллы. Если кристаллы не растворяются при комнатной температуре в течение 1 часа, буфер может быть подогрет до 37 °C. Не встряхивать раствор.

Буфер для разведения образцов

Подготовьте 20x концентрированный буфер для разведения А путем смешивания 10 мл с 90 мл дистиллированной или деионизированной воды. Подготовьте 40x концентрированный буфер для разведения В путем смешивания 5 мл с 95 мл дистиллированной или деионизированной воды. Окончательно смешать оба раствора в равных пропорциях и тщательно перемешать. Буфер для промывки/разведения является достаточным для 2 x 96 тестов.

Там, где требуется меньшее количество тестов, подготовьте необходимый объем путем разбавления 1 части 20x концентрированного буфера для разведения А с 9 частями дистиллированной или деионизированной воды и 1 часть 40x концентрированного буфера для разведения В с 19 частями дистиллированной или деионизированной воды. Окончательно смешайте оба раствора в равных пропорциях и тщательно перемешайте.

Концентрированный буфер может содержать кристаллы. Если кристаллы не растворяются при комнатной температуре в течение 1 часа, буфер может быть подогрет до 37 °C. Не встряхивать раствор.

Раствор стандарта

Стандарт восстанавливается путем инъекции 1 мл дистиллированной или деионизированной воды. Приготовить каждый человеческий LL-37 стандарт в полипропиленовых пробирках путем серийного разведения восстановленного стандарта буфером для разведения, как показано на рисунке 1*. После восстановления стандарт не оставлять на хранение для повторного использования.

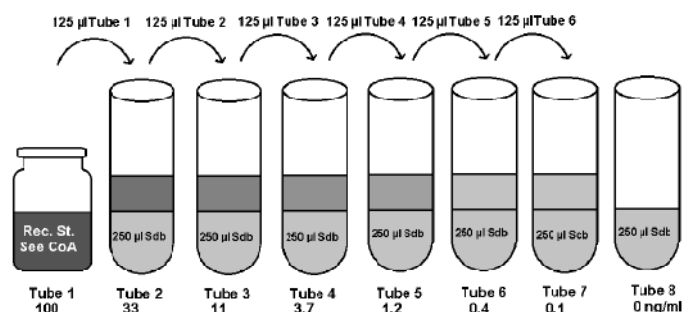


Рисунок 1

*) CoA: сертификат контроля качества, Rec. St.: Восстановленный стандарт, Sdb: Буфер для разведения образцов

Раствор индикатора

Индикатор восстанавливают пипетированием 1 мл

дистиллированной или деионизированной воды. Развести 1 мл восстановленного индикатора с 11 мл буфера для промывки/разведения, что достаточно для 1 x 96 тестов. В случае, если меньший объем необходим, получить желаемый объем индикатора разбавлением 1 части восстановленного индикатора с 11 частями буфера для промывки/разведения.

Раствор стрептавидин-пероксидазы

Развести 0.25 мл 100x концентрата стрептавидин-пероксидазы с 24.75 мл буфера для разведения, которая является достаточным для 2 x 96 тестов. В случае, если меньший объем необходим, получить желаемый объем стрептавидин-пероксидазы разбавлением 1 части 100x концентрата стрептавидин-пероксидазы с 99 частями буфера для разведения.

9. ПРОТОКОЛ ИФА

Привести все реагенты к комнатной температуре (20 - 25 °C) перед использованием.

1. Определить необходимое количество тестируемых лунок, поместить необходимые микролуночные полоски в поставляемую рамку, и заполнить лист сбора данных. Вернуть неиспользованные полоски в пакет для хранения с осушителем, запечатать и хранить при 2 - 8 °C.
2. Переместить 100 мкл в двух экземплярах стандарта, образцов, или контролей в соответствующие лунки. Не прикасайтесь к боковой или нижней части лунки.
3. Накрыть адгезивной пленкой. Постучать по лотку для устранения любых воздушных пузырей. Избегать разбрызгивания жидкости на крышку.
4. Инкубировать полоски или пластину в течение 1 часа при комнатной температуре.
5. Промыть пластины 4 раза с промывочным раствором с использованием промывочного устройства или следующим образом:
 - a. Осторожно снимите герметик пластины, избегая разбрызгивания.
 - b. Освободить пластину путем ее переворачивания и встряхивания содержимого над раковиной, держать перевернутой и высушить сухим толстым слоем ткани.
 - c. Добавить 200 мкл промывочного буфера в каждую лунку, подождать 20 секунд, освободить пластину как описано в пункте 5b.
 - d. Повторите процедуру промывки 5b/5c три раза.
 - e. Очистить пластину и аккуратно высушить сухим толстым слоем ткани.
6. Добавить 100 мкл разведенного индикатора в каждую лунку с использованием того же порядка пипетирования как это применяется в шаге 2. Не прикасайтесь к боковой или нижней части лунок.
7. Накройте лоток адгезивной пленкой. Инкубируйте лоток в течение 1 часа при комнатной температуре.
8. Повторите процедуру промывания, описанную в шаге 5.
9. Добавить 100 мкл разведенной стрептавидин-пероксидазы в каждую лунку, используя тот же порядок пипетирования, применяемый в шаге 2. Не прикасайтесь к боковой или нижней части лунок.
10. Накройте лоток адгезивной пленкой. Инкубируйте лоток в течение 1 часа при комнатной температуре.
11. Повторите процедуру промывания, описанную в шаге 5.
12. Добавить 100 мкл ТМВ субстрата в каждую лунку, используя тот же порядок пипетирования, что и в шаге 2. Не прикасайтесь к боковой или нижней части лунок.
13. Накрыть лоток новой адгезивной пленкой, инкубировать лоток в течение 20-30 минут при комнатной температуре. Не подвергать полоски действию прямых солнечных лучей. Покрытие пластин с алюминиевой фольгой рекомендуется.
14. Остановить реакцию добавлением 100 мкл стоп-раствора в той же последовательности и интервалами, используемыми в шаге 12. Тщательно смешать растворы в лунках, осторожно вращая пластину. Аккуратно постучать по лотку, чтобы устранить любые воздушные пузырьки в лунках.
15. Считать результаты в течение 30 минут после добавления стоп-раствора при 450 нм с использованием считывающего устройства, следуя инструкциям изготовителя прибора.

10. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитать среднюю абсорбцию для каждого набора повторяющихся стандартов, контроля и образцов.
- Если отдельные значения абсорбции отличаются более чем на 15% от соответствующего среднего значения, то результат

Таблица 3

считается сомнительным и образец должен быть протестирован повторно.

- Средняя оптическая плотность нулевого стандарта должна быть менее 0,3.
- Построить стандартную кривую с использованием компьютерной программы. Средняя оптическая плотность концентрации каждого стандарта откладывается на вертикальной (Y) оси против соответствующей концентрации на горизонтальной (X) оси (логарифмическая шкала). Пример стандартной кривой см. в сертификате контроля качества, включенного в комплект. Если стандарт находится вне диапазона, результат тестирования образцов не является надежным. Испытание должно быть повторено.
- Если образцы были разбавлены, концентрация, считываемая со стандартной кривой, должна быть умножена на коэффициент разбавления.
- Образцы, которые дают среднюю оптическую плотность выше абсорбции для самых высоких стандартов концентрации, находящаяся вне диапазона анализа. Эти образцы должны быть повторно протестированы с высшим разведением.

11. ТЕХНИЧЕСКИЕ СОВЕТЫ

- Пользователь должен быть подготовлен и знаком с ИФА и процедурой испытаний.
- Если вы не знакомы с техникой ИФА, рекомендуется выполнить пробный анализ до тестирования образцов. Выполнить анализ со стандартной кривой только следуя инструкциям.
- Неправильная или недостаточная промывка на любой стадии процедуры приведет либо к ложным положительным, либо ложным отрицательным результатам. Полностью освободить лунки перед внесением промывочного буфера, заполнить промывочным буфером, как указано для каждого цикла и не позволять лункам оставаться непокрытыми или сухими в течение длительного периода.
- Поскольку определенные условия могут отличаться от анализа к анализу, стандартная кривая должна быть построена для каждого анализа. Если стандарт вне диапазона, результат тестирования образцов не является надежным. Испытание должно быть повторено.
- Не смешивать реагенты из разных партий или с другими реагентами и полосками. Остатки не следует смешивать с содержимым только что открытой ампулы.
- Каждый раз, когда набор используется, свежие разведения стандарта, образца, индикатора, стрептавидин-пероксидазы и буферов должны быть приготовлены.
- Крышки и флаконы не являются взаимозаменяемыми. Крышками закрывать только соответствующие флаконы.
- Во избежание перекрестного загрязнения, менять наконечники для добавления реагентов для каждого стандарта, между добавлением образцов, а также между добавлением реагента. Кроме того, используйте отдельные резервуары для каждого реагента.
- Утилизация отходов должна проводиться в соответствии с правилами лаборатории.

12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Сертификат контроля качества, поставляемый с набором, является специфичным для партии и используется для проверки результатов, полученных вашей лабораторией. Значения поглощений, указанных в Сертификате контроля качества, будут использоваться только в качестве ориентира. Результаты, полученные Вашей лабораторией, могут отличаться.

Этот тест предназначен для устранения помех от растворимых рецепторов, связывающих белков, и других факторов, присутствующих в биологических образцах. До тех пор, пока все факторы не будут протестированы Hycult Biotech иммуноферментным анализом, возможности интерференции не могут быть исключены.

Для оптимальной работы данного комплекта рекомендуется работать согласно надлежащей лабораторной практике.

13. УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Гарантийные претензии и жалобы в отношении недостатков необходимо предъявлять до истечения срока годности продукта. Письменную жалобу, содержащую номер партии продукта и экспериментальные данные, отправить на электронный адрес support@hycultbiotech.com.

Предложения, приведенные ниже в таблице 3, могут быть использованы только в качестве ориентира в случае неожиданных результатов анализа.

Низкая абсорбция	Высокая абсорбция	Слабые копии	Все лунки положительные	Все лунки отрицательные	Возможная причина
•	•		•	•	Материалы набора или реагенты загрязнены или закончился их срок годности
•					Используются неправильные реагенты
•		•	•		Лиофилизированные реагенты не восстановлены как следует
•	•	•	•	•	Некорректные разведения или ошибки пипетирования
•		•			Неподходящие пластиковые материалы использовались для подготовки стандарта и/или образцов
•	•				Неверные время инкубации или температура
					Особенно в случае инкубации при 37 °C: пластины не инкубировались равномерно
•					Анализ проводился раньше, чем реагенты были приведены к комнатной температуре
•	•	•	•	•	Не соблюдалась процедура тестирования
				•	Пропущен реагент или шаг
		•			Плохое перемешивание образцов
	•		•		Низкое качество воды
		•			Полоски оставались неувлажненными слишком долго во время/после промывки
	•	•	•		Плохая промывка
		•			Перекрестное загрязнение от других образцов или положительного контроля
			•		ТМВ раствор непрозрачный или бесцветный
•	•				Неверный фильтр в считывающем устройстве микропланшета
	•	•			Воздушные пузырьки
		•			Неточное запечатывание планшета после использования
•					Неправильные условия хранения
•					Лампа в считывающем устройстве не функционирует оптимально

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»
Ул. Черновола, 97,
г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua