

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТЕОПОНТИНА ЧЕЛОВЕКА

ADI-900-142, Osteopontin (human)

Каталог. № : ADI-900-142

Методика от 06-20-2012

Количество : 96

Производитель: Enzo Life
Sciences, (США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

**Только для исследовательских целей.
Не применять для диагностики**

ОПИСАНИЕ

Набор Assay Designs Osteopontin (human) основан на иммуноферментном анализе (EIA) и предназначен для количественного определения остеопонтина в биологических жидкостях человека. Пожалуйста, полностью прочитайте инструкцию перед постановкой анализа. В наборе используются моноклональные антитела к OPN человека, иммобилизованные в лунках микропланшета, для связывания OPN человека, присутствующего в образцах или стандартах. В набор включен стандарт человеческого OPN, рекомбинантный белок. После короткой инкубации избытки реагентов удаляются при промывке и добавляются биотинилированные моноклональные антитела к OPN человека. Эти антитела связывают OPN, захваченный при первой инкубации. После короткой инкубации избыток антител удаляется при промывке и добавляется субстрат. Энзиматическая реакция останавливается и развившееся желтое окрашивание измеряется с помощью микропланшетного ридера 405 нм. Интенсивность развившейся желтой окраски прямо пропорциональна количеству OPN, присутствующего в образцах или стандартах. Считанная ОП используется для расчета концентрации OPN. Более подробные объяснения принципа метода и практические рекомендации по иммуноферментному анализу приведены в книге Chard¹ или Tijssen².

ВВЕДЕНИЕ

Остеопонтин (OPN) является кислым белком внеклеточного матрикса, это молекула адгезии, которая относительно распространена не только в костном матриксе, плазме, моче и молоке, но также выявляется в злокачественных тканях и при атеросклерозе. Фосфорилирование, гликозилирование и взаимодействие с кальцием позволяют интактному и фрагментированному OPN влиять на множество разнообразных реакций, включая ремоделирование ткани, воспаление и выживаемость клеток³.

Было показано, что OPN является достоверным показателем при раке желудка и легких, а также метастатической карциномы⁴⁻⁹. Значительное присутствие OPN в различных опухолях строго коррелирует со стадией заболевания, допуская его важную роль в инвазии, прогрессии и метастазировании опухоли^{10, 11}. Кроме того, OPN ингибирует активность синтазы окисла азота, таким образом, защищая опухолевые клетки от NO-опосредованного цитотоксического воздействия макрофагов¹². OPN обнаруживается в атеросклеротических бляшках и может действовать при многих сосудистых патологиях, обусловленных диабетом.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

ТОЛЬКО ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЕЙ, НЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР.

1. 1 Стоп-раствор, входящий в состав данного набора, является раствором тринатрийфосфата. Это едкое вещество. При работе с данным реагентом необходимо соблюдать меры предосторожности.
2. 2 Активность конъюгата щелочной фосфатазы зависит от присутствия ионов Mg²⁺ и Zn²⁺ и подвержена влиянию хелаторов, например ЭДТА, в концентрациях > 10 мМ
3. 3 Характеристики метода были протестированы для различных типов образцов, однако возможно, что высокие концентрации влияющих веществ могут быть причиной вариабельности результатов анализа.

4. Со стандартом OPN, поставляемым в наборе, кат. № 80-1348, необходимо обращаться с осторожностью, из-за известных и неизвестных эффектов, оказываемых человеческим OPN.
5. Стандарт человеческого OPN должен храниться при температуре ниже -20°C.
6. Подготовку стандартов и образцов необходимо выполнять в полипропиленовых пробирках. Использование стеклянных пробирок снижает стабильность белка.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

1. **OPN Микропланшет (кат. № 80-1344)** - 96-ячеечный микропланшет, со сменными стрипами, покрытый мышинными моноклональными антителами к OPN к эпителию, содержащему последовательность SVVYGLRSKSK человеческого OPN.
2. **OPN раствор антител (кат. № 80-1343)** - 1 флакон 11 мл, содержащий биотинилированные моноклональные антитела к OPN, к эпителию, расположенному после сайта расщепления тромбина, с желтым красителем.
3. **Конъюгат человеческого OPN (кат. № 80-1349)** - 1 флакон 11 мл, содержащий стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой, с голубым красителем.
4. **Рабочий буфер 10, концентрат (кат. № 80-1400)** - 1 флакон 105 мл, содержащий Трис буфер с детергентами.
5. **Концентрат буфера для промывок (кат. № 80-1287)** - 1 флакон 105 мл, содержащий Трис буфер с детергентами.
6. **Стандарт человеческого OPN (кат. № 80-1348)** - 2 флакона содержат лиофилизированный человеческий рекомбинантный OPN, по 16 нг.
7. **rNPP Субстрат (кат. № 80-0075)** - 1 флакон 23 мл, содержащий p-нитрофенилфосфат в буфере. Готов к использованию.
8. **Стоп-раствор (кат. № 80-0247)** - 1 флакон 6 мл, содержащий раствор тринатрийфосфата (TSP). Хранить тщательно закрытым. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: едкое вещество.
9. **Схема постановки анализа human OPN (кат. № 30-0220)** - 1 лист
10. **Пленки для накрывания микропланшета (кат. № 30-0012)** - 3 шт.

ХРАНЕНИЕ

Все компоненты набора, за исключением стандарта, стабильны при 4 °C до истечения срока годности набора. Стандарт должен храниться замороженным при температуре ниже -20 °C.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Деионизированная или дистиллированная вода.
2. Фенилметилсульфонил флюорид (PMSF), Sigma # P7626 или эквивалент.
3. Смесь ингибиторов протеаз (PIC), Sigma # P1860 или эквивалент.
4. Калиброванные пипетки для нанесения объемов от 100 мкл до 1,000 мкл.
5. Дозаторы для внесения объемов 25 мкл и 100 мкл.
6. Одноразовая лабораторная посуда для разведения концентратов буферов.
7. Мерные цилиндры
8. Микропланшетный шейкер
9. Фильтровальная бумага
10. Микропланшетный фотометр с длиной волны измерения 405 нм и фильтром сравнения между 570 и 590 нм
11. Графическая бумага для построения калибровочной кривой.
12. Полипропиленовые пробирки

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Данный набор Assay Designs' EIA может быть использован для измерения концентрации OPN в образцах различных матриц. Значения концентраций в образцах, достаточно разведенных рабочим буфером 10+ ингибиторами, могут быть считаны непосредственно по калибровочной кривой. Более детально с данными по извлечению, в предлагаемых разведениях, можно ознакомиться ниже в инструкции. Однако исследователь **должен проверить** подходят ли рекомендованные разведения для его образцов. Образцы, содержащие высокие концентрации OPN, будут необходимо разводить дополнительно, так, чтобы получаемые значения попадали в измеряемый диапазон.

Культуральная жидкость, моча грудное молоко и ЭДТА плазма могут быть проанализированы данным методом. Такие образцы, как молоко, содержащие видимый преципитат, должны быть очищены перед тестированием. Одна из возможных процедур приведена ниже. Не используйте образцы с сильным гемолизом или липемией. Образцы культуральных жидкостей, включая содержащие фетальную телячью сыворотку, также могут быть протестированы данным методом, если разведены рабочим буфером 10 + смесью ингибиторов. Для расчета концентраций OPN необходимо

использовать только калибровочную кривую, полученную с использованием рабочего буфера + смеси ингибиторов.

Для предотвращения расщепления OPN в моче, грудном молоке и образцах плазмы, необходимо добавлять PMSF до конечной концентрации 1 мМ.

Не рекомендуется использовать сыворотку или гепариновую плазму, так как происходит значительное расщепление OPN в этих матриксах.

Процедура очистки молока

1. Центрифугируйте образцы при 10,000 gcf в течение 15 минут.
2. Используя шприц, аккуратно проткните верхний слой и отберите нижнюю фракцию.
3. Центрифугируйте полученный супернатант при 10,000 gcf в течение 15 минут.
4. Повторите п. 2 и центрифугируйте полученный второй супернатант при 10,000 gcf в течение 15 минут. Полученный образец готов для анализа, после разведения рабочим буфером 10 + смесь ингибиторов.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ

1. Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов, не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке.
2. Дайте реагентам достичь комнатной температуры не менее чем в течение 30 минут перед тем как их открыть.
3. Стандарты и образцы должны быть приготовлены в пластиковой посуде.
4. При пипетировании стандартов смачивайте наконечники перед нанесением, используйте новый одноразовый наконечник для каждого реагента, стандарта и образца
5. Наносите стандарты и образцы на дно лунок.
6. Для предотвращения контаминации наносите остальные реагенты на стенки лунок.
7. В данном наборе использован микропланшет с отдельными стрипами, что позволяет проводить только необходимое количество измерений. Неиспользованные стрипы должны храниться с осушителем при 4 °C в поставляемом пакете. Стрипы надо использовать с поставляемой рамкой-держателем.
8. **Необходимо соблюдать меры предосторожности для снижения контаминации эндогенной щелочной фосфатазой.** Контаминация щелочной фосфатазой, особенно в субстратном растворе, может привести к высоким значениям бланка. Не прикасайтесь голыми руками к наконечникам и другим материалам, используемым при анализе.
9. **Перед добавлением субстрата убедитесь в отсутствии остатков буфера для промывок в лунках.** Любой оставшийся буфер для промывок может вызвать отклонения в результатах анализа.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Буфер для промывок

Разведите 50 мл поставляемого в наборе концентрата буфера для промывок в 950 мл деионизированной воды. Разведенный буфер для промывок может храниться при комнатной температуре до 3 месяцев, но не дольше чем до окончания срока годности.

2. Рабочий буфер 10 + ингибиторы

Приготовьте рабочий буфер 10, разведя 100 мл поставляемого в наборе концентрата рабочего буфера 10 в 900 мл деионизированной воды. Разведенный рабочий буфер может храниться при комнатной температуре до 3 месяцев, но не дольше чем до окончания срока годности.

Непосредственно перед использованием к буферу необходимо добавить PMSF и PIC. При использовании смеси ингибиторов протеаз Sigma кат. № P1860, внесите 0.5 мкл/мл PIC, или эквивалент, до нужной концентрации, согласно спецификации производителя. Добавьте PMSF, Sigma кат. № P7626, до конечной концентрации 1 мМ.

Полученный дополненный рабочий буфер 10 должен быть использован для разведения всех образцов и стандартов, для гарантии максимальной целостности человеческого OPN. Для каждой постановки необходимо приготавливать свежий дополненный рабочий буфер (рабочий буфер 10 + ингибиторы).

3. Стандарты человеческого OPN

Внесите 500 мкл рабочего буфера 10 + ингибиторы во флакон со стандартом человеческого OPN. Оставьте при комнатной температуре на 5 минут. Аккуратно перемешайте. Полученный раствор содержит 32 нг/мл человеческого OPN и используется как пробирка № 1.

Промаркируйте 4 полипропиленовые пробирки с № 2 по № 5. Внесите по 250 мкл рабочего буфера 10 + ингибиторы в пробирки №2 – №5. Внесите 250 мкл стандарта 32 нг/мл в пробирку № 2.

Перемешайте на вортексе. Перенесите 250 мкл полученного раствора из пробирки № 2 в пробирку № 3 и тщательно перемешайте на вортексе. Выполните аналогичную процедуру переноса для пробирок № 4 и № 5.

Концентрации человеческого OPN в стандартах № 1 - № 5 составляют 32, 16, 8, 4 и 2 нг/мл, соответственно. Подробности разведения приведены в листе со схемой постановки анализа OPN.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приведите все реагенты и образцы к комнатной температуре не менее, чем за 30 минут до открытия.

Все образцы и стандарты должны анализироваться в дублях.

1. Определите, используя лист со схемой постановки анализа, необходимое для анализа число стрипов, неиспользованные стрипы верните в пакет с осушителем, тщательно закройте и храните при 4 °C.
2. Внесите по 100 мкл рабочего буфера 10 + ингибиторы в лунки, предназначенные для S0 (стандарт 0 пг/мл).
3. Внесите по 100 мкл стандартов из пробирок №1 – №5 в соответствующие лунки.
4. Внесите по 100 мкл образцов в соответствующие лунки.
5. Постучите аккуратно по микропланшету для полного перемешивания компонентов.
6. Закройте микропланшет и инкубируйте 1 час при комнатной температуре на шейкере (~500 об/мин).
7. Удалите содержимое лунок и промойте их, используя по 400 мкл буфера для промывок в каждую лунку, повторите процедуру еще 3 раза (общее число промывок =4). После последнего цикла промывки удалите остатки промывающего буфера декантированием или аспирацией, переверните микропланшет и постучите им по чистой фильтровальной бумаге для полного удаления остатков буфера.
8. Внесите по 100 мкл желтых антител во все лунки, кроме бланка.
9. Закройте микропланшет и инкубируйте 1 час при комнатной температуре на шейкере (~500 об/мин).
10. Удалите содержимое лунок и промойте их, используя по 400 мкл буфера для промывок в каждую лунку, повторите процедуру еще 3 раза (общее число промывок =4). После последнего цикла промывки удалите остатки промывающего буфера декантированием или аспирацией, переверните микропланшет и постучите им по чистой фильтровальной бумаге для полного удаления остатков буфера.
11. Внесите по 100 мкл голубого конъюгата во все лунки, кроме бланка.
12. Закройте микропланшет и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре на шейкере (~500 об/мин).
13. Удалите содержимое лунок и промойте их, используя по 400 мкл буфера для промывок в каждую лунку, повторите процедуру еще 3 раза (общее число промывок =4). После последнего цикла промывки удалите остатки промывающего буфера декантированием или аспирацией, переверните микропланшет и постучите им по чистой фильтровальной бумаге для полного удаления остатков буфера.
14. Внесите по 100 мкл раствора субстрата во **все** ячейки.
15. Закройте микропланшет и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре на шейкере (~500 об/мин).
16. Внесите по 25 мкл стоп-раствора в каждую ячейку.
17. Бланкируйте микропланшетный фотометр (ридер) по лункам бланка, определимте оптическую плотность (ОП) ячеек при 405. Желательно использовать фильтр сравнения с длиной волны между 570 и 590 нм. Если ридер не может быть бланкирован по лункам бланка, вычитите среднее значение ОП, полученное для бланка, из значений ОП, полученных для всех остальных лунок.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Подсчет концентрации OPN в образцах можно проводить различными способами. Для обработки полученных данных рекомендуется использовать специальное программное обеспечение, с применением 4 параметрической аппроксимации. Если использование такого программного обеспечения невозможно, концентрация OPN в образцах может быть рассчитана следующим образом:

1. Рассчитайте среднюю чистую ОП для каждого стандарта и образца вычитанием среднего значения ОП бланка из среднего значения ОП образца или стандарта:
 - a. средняя чистая ОП = среднее значение ОП - среднее значение ОП бланка
2. Используя линейную графическую бумагу отметьте точки средняя чистая ОП против концентраций OPN в стандартах.

Проведите гладкую линию через полученные точки. Концентрация OPN в исследуемых образцах может быть определена интерполяцией из калибровочной кривой.

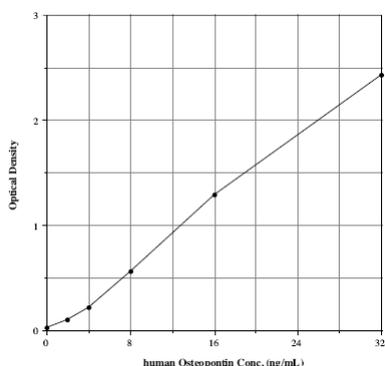
Типичные результаты:

Результаты, приведенные ниже, приводятся только в демонстрационных целях и не должны использоваться для расчетов результатов какой-либо другой постановки.

Образец	Средняя ОП (-бланк)	Средняя чистая ОП	OPN, (нг/мл)
Бланк ОП	(0.067)		
So	0.093	0.026	0
S1	2.494	2.427	32
S2	1.355	1.288	16
S3	0.628	0.561	8
S4	0.283	0.216	4
S5	0.170	0.103	2
Обр. 1	2.057	1.990	24.9
Обр.2	0.319	0.252	4.4

Типичная калибровочная кривая

Ниже приведена типичная калибровочная кривая. Эта кривая **не должна** быть использована для расчета концентрации OPN; калибровочную кривую необходимо строить при каждой постановке теста.



ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Следующие параметры данного набора были определены с использованием указаний, перечисленных в протоколе оценки Национального Комитета по Клиническим Лабораторным Стандартам (NCCLS).

Все процедуры разработки и валидации были выполнены с использованием рабочего буфера 10 + ингибиторы.

Чувствительность

Чувствительность рассчитывали, определяя среднюю ОП шестнадцати (20) повторов 0 нг/мл, и сравнивая со средней ОП шестнадцати (20) повторов стандарта № 5. Предел чувствительности был определен как концентрация человеческого OPN, соответствующая двум стандартным отклонениям от нуля по калибровочной кривой.

Средняя ОП S0 = 0.024 ± 0.002 (8.3%)
 Средняя ОП стандарта № 5 = 0.097 ± 0.005 (5.2%)
 Дельта ОП (2 - 0 нг/мл) = $0.097 - 0.024 = 0.073$
 2 SD's от нулевого стандарта = $2 \times 0.002 = 0.004$

Чувствительность: = $\frac{0.004}{0.073} \times 2 \text{ нг/мл} = 0.110 \text{ нг/мл}$

Линейность

Образец, содержащий 23.287 нг/мл человеческого OPN, был разведен 3 раза 1:2 рабочим буфером 10 + ингибиторы и протестирован с помощью данного метода. Данные были представлены графически, как зависимость актуальной концентрации OPN от измеренной. Полученная линия имела уклон 0.955 и коэффициент корреляции 0.999.

Воспроизводимость

Воспроизводимость внутри серии определялась многократным тестированием (n=24) образцов с низкой, средней и высокой концентрацией OPN в одной постановке.

Воспроизводимость между сериями определялась многократным тестированием (n=12) трех образцов с низкой, средней и высокой концентрацией OPN в разных постановках.

Данные по воспроизводимости, приведенные ниже, представлены как % коэффициента вариаций для концентраций OPN, определенных в указанных постановках, рассчитанных с помощью программного обеспечения с использованием четырехпараметрической аппроксимации.

	OPN, нг/мл	%CV Внутри серии	%CV Между сериями
Низкая	4.36	3.2	
Средняя	11.36	3.7	
Высокая	30.55	5.0	
Низкая	5.05		8.3
Средняя	12.27		9.2
Высокая	26.00		10.1

Перекрестная реактивность

Перекрестную реактивность подобных молекул определяли, растворяя перекрестно реагирующее вещество в рабочем буфере 10 + ингибиторы. Затем эти образцы были протестированы данным методом определения OPN, и была рассчитана измеренная концентрация OPN. % перекрестной реактивности был рассчитан сравнением актуальной концентрацией перекрестно реагирующего вещества в образце и выражен в процентах.

Соединение	% перекрестной реактивности
Человеческий рекомбинантный OPN	100%
Нативный человеческий OPN	111%
Нативный бычий OPN	<0.1%
Мышиный рекомбинантный OPN	<0.1%

Извлечение

Рекомендации по подготовке образцов и стандартов смотрите выше в данной инструкции.

Концентрации человеческого OPN были измерены во множестве различных типов образцов, включая культуральную среду, человеческую мочу, плазму и молоко. Человеческий OPN был добавлен в эти матрицы, которые затем были разведены рабочим буфером 10 + ингибиторы и протестированы данным методом. Замечание: так как концентрация OPN в образцах различается, то могут требоваться различные разведения. Разведения, приведенные ниже, были необходимы для того, чтобы концентрации исследуемых образцов попадали в измеряемый диапазон.

Матрикс	% извлечения	Recommended Dilution*
MDA-MB-435	86.0	$\geq 1:2$
Человеческая моча	113.4	$\geq 1:32$
Человеческая ЭДТА плазма	106.6	$\geq 1:8$
Человеческое молоко	109.7	$\geq 1:6400$

* См. раздел «Подготовка образцов».

Значения человеческого OPN

Перечисленные ниже образцы были протестированы на наличие OPN:

Тип образца	Кол-во протестированных образцов	Диапазон (нг/мл)	Среднее (нг/мл)
ЭДТА плазма	30	14.0 - 45.3	-----
Моча	1	-----	1,894
Молоко	1	-----	55,466



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
 ул. Чорновола, 97
 г. Ивано-Франковск, 76005
 тел.: +38 (0342) 775 122
 факс: +38 (0342) 775 123
 e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»