

НАБОР ИФА
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ГРЕЛИНА ЧЕЛОВЕКА, МЫШИ И КРЫСЫ

EIA-GHR-1, Human/Mouse/Rat Ghrelin

Каталог. № : **EIA-GHR-1**
Количество : **96**
Производитель: **RayBiotech, Inc.**
(США)

Методика от **01-02-2014**
Версия **3.2**



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

I. ВВЕДЕНИЕ

Ожирение, которое характеризуется избыточным накоплением жировой ткани в организме, стало одной из важных проблем здравоохранения. Ожирение не только связано с проблемами со здоровьем, опосредованными увеличением веса и повышением нагрузки на легкие, суставы и кости, но является важным фактором риска развития жизнеугрожающих заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет 2 типа и некоторые виды злокачественных новообразований.

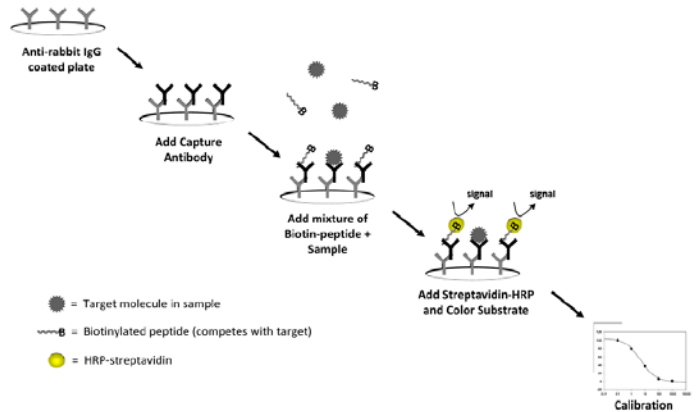
Грелин синтезируется как препрогормон, а затем подвергается протеолитическому процессингу с образованием пептида, состоящего из 28 аминокислот. Синтез грелина происходит преимущественно в эпителиальных клетках, выстилающих дно желудка, в меньших количествах синтезируются в плаценте, почках, гипофизе и гипоталамусе. Грелин привлек внимание как первый циркулирующий гормона голода. Грелин увеличивает потребление пищи и, следовательно, массу жировой ткани в результате эффектов, оказываемых на гипоталамус. Они активизируют клетки дугообразного ядра, включающего нейроны орексигенного нейрпептида Y (NPY). В ответ на воздействие грелина эти нейроны становятся чувствительными к лептину и инсулину.

Грелин также активизирует мезолимбические холинергические – дофаминергические связи, так называемые механизмы естественного удовольствия, например, от продуктов питания. Уровни грелина в плазме крови тучных людей ниже, чем у худощавых лиц, за исключением случаев ожирения, развивающегося у больных с синдромом Прадера-Вилли. У лиц, страдающих расстройством пищевого поведения (анорексия нервозная), отмечаются высокие уровни грелина в плазме крови в сравнении с худощавыми лицами и лицами с нормальной конституцией. Эти данные позволяют предположить, что грелин играет важную роль как в развитии анорексии и ожирения. Уровни грелина у пациентов с кахексией, индуцированной злокачественными новообразованиями, также высокие.

II. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Данный набор RayBio® Ghrelin Enzyme Immunoassay (EIA) Kit предназначен для *in vitro* количественного определения Грелина методом конкурентного ИФА анализа. Дно лунок микропланшета покрыто вторичными антителами к антигенам кролика. После блокирующего этапа и инкубации в лунках микропланшета с антителами к грелину, биотинилированный пептид Грелин, пептид в стандартах или пептид в тестируемых образцах конкурируют за связывание с антителами к грелину. Связавшийся («победивший») пептид грелин впоследствии взаимодействует с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена (SA-HRP), что приводит к развитию окрашивания. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству биотинилированного комплекса пептид-SA-HRP и обратно пропорциональна количеству пептида грелина в стандартах или образцах. Это связано с конкурентным связыванием биотинилированного пептида Грелина и пептида в образцах или стандартах с антителами к Грелину. При использовании стандартов с известной концентрацией пептида Грелина строится стандартная кривая и по ней определяется концентрация пептида грелина в тестируемых образцах.

Принцип конкурентного ИФА



III. РЕАГЕНТЫ

1. Планшет Грелина (элемент А): 96 лунок (12 стрипов x 8 лунок), покрытых вторичным антителом.
2. Концентрат Промышочного Буфера (20x) (элемент В): 25 мл
3. Лиофилизированный стандарт GHR (элемент С): 2 флакона.
4. Лиофилизированные поликлональные антитела анти-GHR (элемент N): 2 флакона.
5. 1x Разбавитель для анализов Е (элемент R): 2 флакона, 25 мл/флакон. Разбавитель как для стандартов так и для образцов, включая сыворотки или плазмы, среды для культивирования клеток или других типов образца.
6. Лиофилизированный биотинилированный пептид GHR (элемент F): 2 флакона.
7. Концентрат HRP-Стрептавидина (элемент G): 600 мкл 100x концентрированного HRP-конъюгированного стрептавидина.
8. Лиофилизированный положительный контроль (элемент M): 1 флакон.
9. Реагент ТМВ одношагового субстрата (элемент H): 12 мл 3,3', 5,5' -тетраметилбензида (ТМБ) в буферном растворе.
10. Стоп-раствор (элемент I): 8 мл 0.2 М серной кислоты.
11. Диаграмма анализа (элемент J).
12. Руководство пользователя (элемент К).

IV. ХРАНЕНИЕ

- Стандарт, Биотинилированный GHR пептид и Положительный контроль должны храниться при температуре -20 °C после прибытия. **Избегайте многократного замораживания-оттаивания.**
- Остальные компоненты набора можно хранить при температуре 4 °C.
- Открытые микропланшетные лунки и антитела (элемент N) могут храниться до 1 месяца при 2-8 °C. Вернуть неиспользованные лунки в мешочек с осушителем и запечатать вдоль всего края.
- При хранении как указано выше, RayBiotech гарантирует качество этого набора в течение 6 месяцев от даты отгрузки.

V. НЕОБХОДИМЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер, способный измерить 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. Программное обеспечение SigmaPlot (или другое программное обеспечение, которое может выполнять 4-параметровую модель логистической регрессии).
8. Пробирки для подготовки разведения стандарта или образца.
9. Орбитальный шейкер
10. Алюминиевая фольга
11. Оберточная бумага Saran.

VI. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Для разведения образца и положительного контроля, см. пункты 5, 6, 7 и 9 Подготовка реагентов.

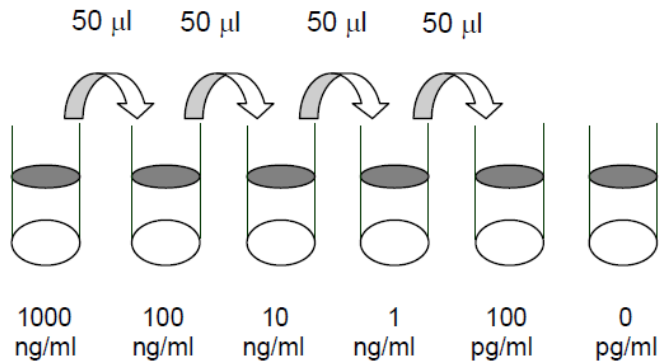
1. Хранить реагенты набора на льду во время приготовления реагентов. Привести планшет к комнатной температуре перед открытием герметичной упаковки.
2. Кратко провести центрифугирование флакона с антителами GHR (элемент N) и восстановить с 5 мкл ddH₂O перед использованием. Добавить 50 мкл 1x Разбавителя для анализа

Е во флакон для получения концентрата антител обнаружения. Пипетировать вверх и вниз, чтобы аккуратно перемешать.

- Концентрат антител затем необходимо развести 1:100 с 1X Разбавителем для анализа Е. Это и будет рабочий раствор антител, который будет использован в шаге 2 процедуры анализа.

ПРИМЕЧАНИЕ: Следующие шаги можно сделать во время процедуры инкубации антител (Шаг 2 Методики анализа).

- Кратко центрифугировать флакон биотинилированного пептида GHR (элемент F) и восстановить с 20 мкл ddH₂O перед использованием. Добавить 5 мкл элемента F к 5 мл 1X Разбавителя для анализа Е. Пипетировать вверх и вниз, чтобы аккуратно перемешать. Конечная концентрация биотинилированного GHR будет 10 нг/мл. Этот раствор будет использоваться только в качестве разбавителя в шаге 5 из раздела «Приготовление реагентов».
- Подготовка Стандартов:** Пометить 6 пробирок со следующими концентрациями: 1000 нг/мл, 100 нг/мл, 10 нг/мл, 1 нг/мл, 100 пг/мл и 0 пг/мл. Пипетировать 450 мкл биотинилированного раствора GHR в каждую пробирку, за исключением 1000 нг/мл (оставить эту пустой). Очень важно, чтобы концентрация биотинилированного GHR составляла 10 нг/мл во всех стандартах.
 - Кратко центрифугировать флакон со Стандартом пептида GHR (элемент С) и развести с 10 мкл ddH₂O. В пробирку, помеченную 1000 нг/мл, пипетировать 8 мкл Элемента С и 792 мкл 10 нг/мл Раствора биотинилированного GHR (приготовленного на стадии 4 выше). Это и есть исходный раствор GHR (1000 нг/мл GHR, 10 нг/мл биотинилированного GHR). Тщательно перемешать. Этот раствор служит в качестве первого стандарта.
 - Для приготовления Стандарта 100 нг/мл, пипетировать 50 мкл исходного раствора GHR в пробирку 100 нг/мл. Тщательно перемешать.
 - Повторить этот шаг с каждой последующей концентрацией, подготовить серии разведений, как показано на рисунке ниже. Каждый раз использовать 450 мкл биотинилированного GHR и 50 мкл предварительного концентрата до тех пор, пока не получится концентрация 100 пг/мл. Перемешивать каждую пробирку тщательно перед следующим внесением.
 - Последняя пробирка (0 пг/мл GHR, 10 нг/мл биотинилированного GHR) служит в качестве нулевого стандарта (или общего связывания).



- Подготовить 10-кратное разведение Элемента F. Чтобы сделать это, добавьте 2 мкл Элемента F к 18 мкл 1X Разбавителя для образцов Е. Этот раствор будет использоваться в шагах 7 и 9.
- Приготовление Положительного Контроля:** Быстро центрифугировать флакон с положительным контролем и развести со 100 мкл ddH₂O перед использованием (элемент М). В пробирку с элементом М добавить 101 мкл 1x Разбавителя для образцов Е. Кроме того, добавить 2 мкл 10-кратно разбавленного Элемента F (приготовленного в шаге 6) в пробирку. Это и есть 2-кратное разведение положительного контроля. Тщательно перемешать. Положительный контроль является образцом клеточной культуральной среды с ожидаемым сигналом между 10% и 30% от общего связывания (70-90% конкуренция) при разведении как описано выше. Разведение может быть продолжено при необходимости, но убедитесь в том, что конечная концентрация биотинилированного GHR составляет 10 нг/мл.
- Если Элемент В (20X Промывочный концентрат) содержит видимые кристаллы, прогреть до комнатной температуры и аккуратно перемешать до полного растворения. Развести 20 мл Концентрата промывочного буфера в деионизированной или

дистиллированной воде для получения 400 мл 1X Промывочного буфера.

- Подготовка образца:** Использовать 1X Разбавитель для образцов Е + биотинилированный GHR для разбавления образцов, в том числе сыворотки/плазмы, клеточной культуральной среды и других типов образцов. Убедитесь в том, что конечная концентрация биотинилированного GHR составляет 10 нг/мл в каждом образце. ПРИМЕР: для приготовления 4-кратного разведения образца, смешайте 2.5 мкл 10-кратно разбавленного Элемента F (приготовленного в шаге 6), 185 мкл 1X Разбавителя для образцов Е, и 62.5 мкл вашего образца; аккуратно перемешать. Общий объем составляет 250 мкл, достаточный для проведения анализа в дублях на планшете. Не используйте разбавитель Элемента F из шага 4 для пробоподготовки. Если вы планируете использовать неразбавленные образцы, Вам все равно необходимо добавить биотинилированный GHR для получения конечной концентрации 10 нг/мл. ПРИМЕР: Добавить 2.5 мкл 10-кратно разбавленного Элемента F к 247.5 мкл образца. ПРИМЕЧАНИЕ: Оптимальные факторы разбавления образца должны быть определены эмпирически, однако вы можете связаться со службой технической поддержки (888-494-8555; techsupport@raybiotech.com) для получения рекомендуемого диапазона для разбавления сыворотки или плазмы.
- Быстро центрифугировать флакон с HRP-Стрептавидином (элемент G) перед использованием. Концентрат HRP-Стрептавидина необходимо развести в 100 раз 1X Разбавителем для образцов Е.

VII. ПРОЦЕДУРА ТЕСТИРОВАНИЯ

- Хранить реагенты на льду во время приготовления реагентов. Рекомендуется тестирование всех стандартов и образцов в двух экземплярах.
- Добавить 100 мкл антител анти-GHR (см. Подготовка реагентов шаг 3) в каждую лунку. Инкубировать в течение 1.5 часов при комнатной температуре при осторожном встряхивании (1-2 цикла/сек.). Также можно инкубировать в течение ночи при 4 °C.
- Удалить раствор и промыть 4 раза с 1x промывочным раствором (200-300 мкл). Промывка может проводиться с использованием многоканальной пипетки или автопромывочного 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 каждого Стандарта (Подготовка реагентов шаг 5), положительного контроля (Подготовка реагентов шаг 7) и образца (Подготовка реагентов шаг 9) в соответствующие лунки. Не забудьте про Бланк лунку (только Рабочий Растворитель). Покрывать лунки и инкубировать в течение 2.5 часов при комнатной температуре с осторожным встряхиванием (1-2 цикла/сек.) или в течение ночи при 4 °C.
- Удалить раствор. Повторить промывку 4 раза как в шаге 3.
- Добавить 100 мкл приготовленного раствора Стрептавидина (см. Подготовка реагентов шаг 10) в каждую лунку. Инкубировать в течение 45 минут при комнатной температуре с осторожным встряхиванием. Рекомендуется, чтобы время инкубации не было короче или длиннее 45 минут.
- Удалить раствор. Повторить промывку 4 раза 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 (1-2 цикла/сек.).
- Добавить 50 мкл стоп-раствора (элемент I) в каждую лунку. Считать результат при 450 нм немедленно.

VIII. СУММАРНАЯ ПРОЦЕДУРА ТЕСТИРОВАНИЯ

- Подготовить все реагенты, образцы и стандарты в соответствии с инструкциями. ↓
- Добавить 100 мкл антитела анти-GHR в каждую лунку. Выдержать 1.5 часа при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °C. ↓
- Добавить 100 мкл стандарта или образца в каждую лунку. Инкубировать 2.5 часа при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °C. ↓
- Добавить 100 мкл приготовленного раствора Стрептавидина. Инкубировать 45 минут при комнатной температуре. ↓

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



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

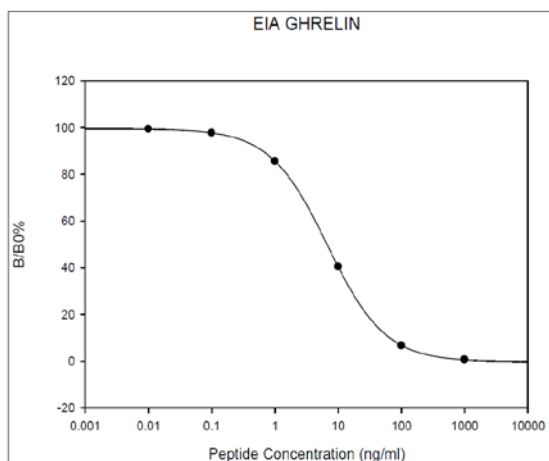
IX. ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Процент поглощения = $(B - OD \text{ бланка}) / (B_0 - OD \text{ бланка})$, где
 B = OD образца или стандарта и
 B₀ = OD нулевого стандарта (общее связывание)

A. ТИПИЧНЫЕ ДАННЫЕ

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



B. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Минимальная определяемая концентрация *GHR* составила 161 пг/мл или 12.46 пМ.

C. ДИАПАЗОН ОБНАРУЖЕНИЯ

0.1-1.000 нг/мл

D. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Внутрисерийная: CV <10%
 Между постановками: CV <15%

X. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Перекрестная реактивность: Данный ИФА не проявляет перекрестной реактивности с любым из следующих испытанных цитокинов: Nesfatin, Ангиотензин II, NPY и APC.

XII. 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 объёмы 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	1. Проверить инструкции по надлежащей

	2. Загрязненный промывочный буфер	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 °C после восстановления, остальные при 4 °C. Хранить раствор субстрата защищенным от света. 2. Стоп раствор должен быть добавлен в каждую лунку перед измерением



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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