

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРОТИРОЗИНА

HK501, Nitrotyrosine

Каталог. № : HK501

Версия 12-2012

Количество : 96

Производитель: Нусултбиотек (Нидерланды)



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 использования в исследовательских целях.
Не для диагностического или терапевтического использования**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА Нитротирозина предназначен для использования в *in-Vitro* диагностике для количественного определения Нитротирозина в плазме и других биологических образцах. Этот комплект предназначен только для научно-исследовательского лабораторного использования и не предназначен для использования в диагностических или терапевтических процедурах.

Анализ должен проводиться квалифицированными специалистами лаборатории.

2. ВВЕДЕНИЕ

Нитротирозин был идентифицирован как маркер воспаления и продукции NO. Нитротирозин образуется в присутствии активного метаболита NO. К продукции нитротирозина ведут различные пути, включая образование пероксинитрита. Так как нитротирозин является стабильным конечным продуктом окисления пероксинитрита, оценка его концентрации в плазме может быть полезна как маркер NO-зависимых повреждений *in vivo*. Так как NO_x является только индикатором усиления продукции NO, ассоциированный белок нитротирозин может быть более подходящим маркером для повреждения, индуцированного реактивными промежуточными продуктами азота, дериватов NO. Более того, большинство циркулирующих в кровотоке протеинов имеют более длительный период полужизни чем уровни NO_x. Присутствие нитротирозина было показано при различных воспалительных процессах, включая образование атеросклеротических бляшек, целиакию, ревматоидный артрит, хроническую почечную недостаточность и септический шок. В норме в плазме присутствуют низкие, неопределяемые уровни нитротирозина.

Нитрозилирование аминокислоты тирозина проявляется как для свободного тирозина, так и в белках.

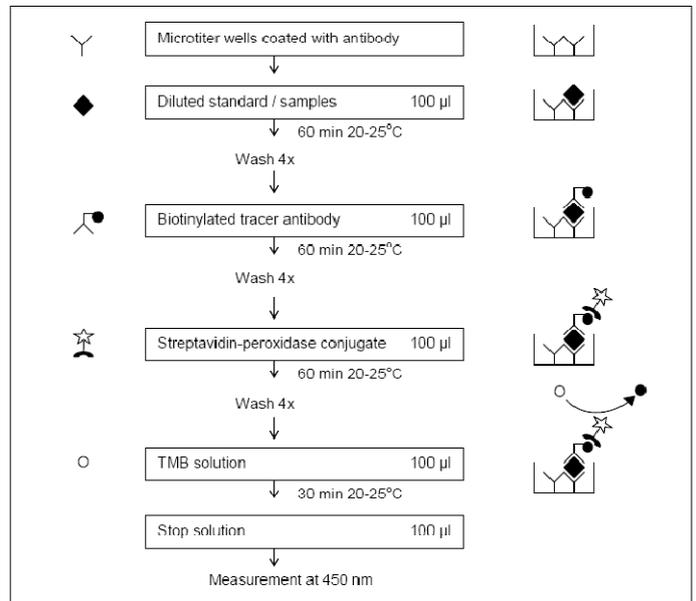
3. ОСОБЕННОСТИ НАБОРА

- Время работы от 3 1/2 часа.
- Минимальная концентрация, которая может быть измерена, составляет 2 нМ.
- Диапазон измеряемых концентраций от 2 до 1,500 нМ.
- Рабочий объем 100 мкл/лунку.

Перекрестная реактивность

Методом ИФА выявляются протеины, содержащие нитротирозин. Так как анализ обнаруживает модифицированную аминокислоту, то он полезен для белков всех видов.

4. ОБЗОР ПРОТОКОЛА



- Нитротирозин ELISA представляет собой готовый к использованию твердофазный иммуферментный анализ, основанный на принципе сэндвича с продолжительностью работы 3 1/2 часа.
- Эффективный формат с 2 пластинами с двенадцатью одноразовыми 8-луночными полосками позволяет свободный выбор размера пакета для анализа.
- Образцы и стандарты инкубируют в лунках, покрытых антителами, определяющими нитротирозин.
- Биотинилированное антитело индикатора будет связываться с захваченным нитротирозином.
- 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 нитротирозина (логарифмически).
- Концентрация образцов, которые тестируются одновременно со стандартами нитротирозина, может быть определена по стандартной кривой.

5. СОСТАВЛЯЮЩИЕ НАБОРА И ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ

Таблица 1/1 HK501-01

Компонент набора	№ позиции	Количество	Цветовой код
Буфер для промывки 40x	WB01	1 флакон (20 мл)	Серый
Буфер для разведения 10x	DB81	1 флакон (10 мл)	Золотистый
Стандарт		1 флакон, 1 мл лиофилизированный	Желтый
Индикатор, биотинилированный		1 флакон, 1 мл лиофилизированный	Зеленый
Стрептавидин-пероксидаза	CON03	1 пробирка, 0.25 мл в растворе	Коричневый
TMB субстрат	TMB050/T MB100	1 флакон (11 мл)	Коричневый
Стоп раствор	STOP110	1 флакон (20 мл)	Красный
12 предварительно покрытых микротитровальных полосок		1 планшет	
Сертификат контроля качества		1	
Инструкция		1	
Листок для записи информации		2	

Таблица 1/2 НК501-02

Компонент набора	№ позиции	Количество	Цветовой код
Буфер для промывки 40х	WB01	1 флакон (20 мл)	Серый
Буфер для разведения 10х	DB81	1 флакон (10 мл)	Золотистый
Стандарт		1 флакон, 1 мл лиофилизированный	Желтый
Индикатор, биотинилированный		2 флакона, 1 мл лиофилизированный	Зеленый
Стрептавидин-пероксидаза	CON03	1 пробирка, 0.25 мл в растворе	Коричневый
ТМВ субстрат	TMB050/TMB100	1 флакон (22 мл)	Коричневый
Стоп раствор	STOP110	1 флакон (20 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. В случае, если используется моечное устройство, прилагаемый промывочный буфер не требуется. Дополнительный промывочный буфер может быть заказан отдельно. Пожалуйста, свяжитесь с вашим местным дистрибьютором.
- Полипропиленовые емкости.
- Калиброванный ELISA ридер, способный измерять оптическую плотность при 450 нм.

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.
- Флаконы стандарта, индикатора и стрептавидин-пероксидазы должны быть открыты после восстановления. 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.
- ТМВ 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 промойте большим количеством воды и обратитесь 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.
- Стандарт является веществом человеческого происхождения. Он был проверен на различные вирусы и найден отрицательным. Поскольку ни один тестовый метод не может дать полной гарантии того, что инфекционные агенты отсутствуют, обращаться с этим реагентом следует как с любой потенциально инфекционной человеческой сывороткой или кровью. Обращайтесь со всеми материалами, находящимися в контакте с этим реагентом, в соответствии с указаниями по профилактике передачи инфекции.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор и обработка

Плазма

Образцы свежесобранной крови хранить на льду. Если используется сыворотка, отделить сыворотку от крови после свертывания крови в течение 20 минут с помощью центрифугирования (1500хg при 4 °С в течение 15 минут). Переместить сыворотку крови в новую пробирку из полипропилена.

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 нитротирозин. Использовать образцы в течение 24 часов после размораживания. Избегать нескольких циклов замораживания-оттаивания, что может привести к потере активности нитротирозина 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

Нитротирозин может быть измерен точно, если образцы сыворотки или плазмы крови разводят, по крайней мере, 10-кратно перед использованием поставляемым буфером для разведения в полипропиленовых пробирках. Обратите внимание, что самые надежные результаты получают с ЭДТА плазмой.

Замечание относительно рекомендуемого разведения образца

Рекомендуемое разбавление для образцов следует использовать в качестве ориентира. Восстановление нитротирозина 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 нитротирозина. Не использовать полистироловые пробирки или пластины образцов для приготовления или разбавления образцов.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

Промывочный буфер

Подготовьте промывочный буфер путем смешивания 20 мл 40х промывочного буфера с 780 мл дистиллированной или деионизированной воды, что достаточно для 2 x 96 тестов. Там, где требуется меньший объем, подготовьте необходимый объем буфера

для промывки путем разбавления 1 части 40х промывочного буфера с 39 частями дистиллированной или деионизированной воды.

Буфер для разведения

Подготовить буфер для разведения путем смешивания 10 мл 10-кратного буфера разбавления с 90 мл дистиллированной или деионизированной воды, которого будет достаточно для 2 x 96 тестов. Там, где требуется меньший объем, подготовьте необходимый объем буфера для разведения путем разбавления 1 части 10х буфером для разбавления с 9 частями дистиллированной или деионизированной воды. Концентрированный буфер разбавления может содержать кристаллы. В случае, если кристаллы не исчезают при комнатной температуре в течение 1 часа, концентрированный буфер для разбавления можно нагреть до 37 °С. Не трясите раствор.

Стандартный раствор

Стандарт восстанавливается путем инъекции 1 мл дистиллированной или деионизированной воды. Приготовить каждый Нитротирозин стандарт в полипропиленовых пробирках путем серийного разведения восстановленного стандарта буфером для разведения, как показано на рис. 1.

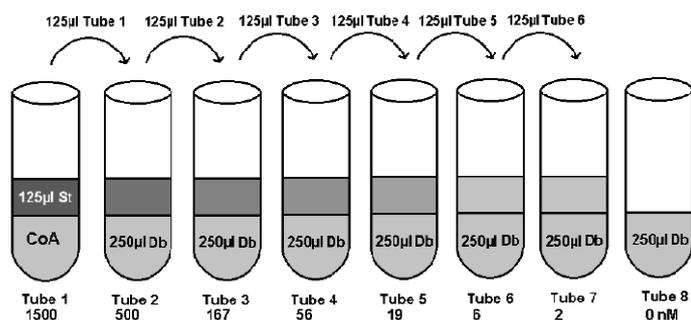


Рисунок 1

* CoA: сертификат контроля качества, Rec. St.: Восстановленный стандарт, W/Db: Буфер для разведения/промывки

Раствор индикатора

Индикатор восстанавливается путем инъекции 1 мл дистиллированной или деионизированной воды. Развести 1 мл восстановленного индикатора с 11 мл буфера для разведения, что является достаточным для 1 x 96 тестов. Там, где требуется меньший объем, подготовить необходимый объем индикатора путем разбавления 1 части восстановленного индикатора с 11 частями буфера для разведения.

Раствор стрептавидин-пероксидазы

Развести 0.25 мл восстановленной стрептавидин-пероксидазы с 24.75 мл буфера для разведения, что является достаточным для 2 x 96 тестов. Там, где требуется меньший объем, подготовить необходимый объем стрептавидин-пероксидазы путем разбавления 1 части восстановленной стрептавидин-пероксидазы с 99 частями буфера для разведения.

9. ПРОТОКОЛ ИФА

Привести все реагенты к комнатной температуре (20 - 25 °С) 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 °С.
2. Переместить 100 мкл в двух экземплярах стандарта, образцов, или контролей в соответствующие лунки. Не прикасайтесь к боковой или нижней части лунки.
3. Накройте 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 лунки.
 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 лунки.
 13. Накройте лоток новой адгезивной пленкой, инкубировать лоток в течение 20-30 минут при комнатной температуре. Не подвигать 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 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, находятся 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.
- Для обеспечения точности результатов необходимо надлежащим образом накрывать планшет во время инкубации.
- Утилизация отходов должна проводиться в соответствии с правилами лаборатории.

	•	•			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

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 4, могут быть использованы только в качестве ориентира в случае неожиданных результатов анализа.

Таблица 2

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



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