

ОБЩИЙ ПРОТОКОЛ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДОВ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ МЕТОДОМ (ИФА)

Peptide Enzyme Immunoassay Protocols

Каталог. № : S-1240
Количество : 96
Производитель : **Bachem – Peninsula (США)**



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

**Набор предназначен только для исследовательских целей.
Не использовать для диагностики**

ХРАНЕНИЕ

После получения набора храните лиофилизированные компоненты и растворитель стандартов при постоянной температуре -20°C до одного года с момента производства набора. Остальные компоненты должны храниться охлажденными ($2-4^{\circ}\text{C}$), также в течение 1 года. Длительное хранение или несоответствующие условия хранения и большие колебания температуры могут привести к накоплению преципитатов в растворе ТМВ и концентрате ИФА буфера. Эти преципитаты не должны значительно влиять на результаты анализа. Однако, если образовались видимые преципитаты, рекомендуется избегать их использования, т.е. позволить им осесть на дно флаконов.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

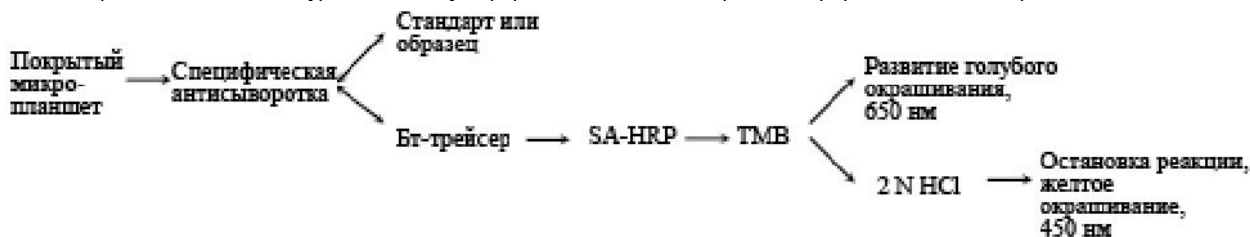
- Концентрат Рабочего буфера (50 мл концентрата 20X).
- Один микропланшет на 96 лунок с пленкой для запечатывания планшета.
- Антисыворотка (лиофилизированный порошок)
- Стандарт (1мкг лиофилизированного порошка)
- Биотинилированный трейсер (лиофилизированный порошок)
- Стрептавидин-HRP (100 мкл концентрата 200X).
- Раствор хромогенного субстрата (11мл ТМБ и перекиси водорода)
- Стоп Раствор 2N HCl (15мл)
- Флуоресцентный Субстратный Раствор FS1 (10.8 мл)
- Флуоресцентный Субстратный Раствор FS2 (1.2 мл)
- Стоп раствор (15 мл)
- Буфер для разведения стандарта 8 мл (свободная от пептида человеческая сыворотка)
- Буфер для разведения стандарта 8 мл (свободная от пептида крысиная сыворотка)
- Документация
- Протоколы

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер с фильтром 450 нм и 650 нм.
- Микропланшетный вошер и шейкер (**опционно**).
- Стерильная деионизированная вода или вода для инъекций (UPS очищенная вода).
- Программное обеспечение для построения калибровочной кривой (**опционно**).
- Пробирки, пипетки и другие различные стандартные лабораторные принадлежности.

ИФА НАБОРЫ - ОСНОВНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ И ПРИНЦИП МЕТОДА

Данные ИФА наборы основаны на конкурентном иммуноферментном анализе, проиллюстрированном на диаграмме:



Антисыворотка иммобилизована в лунках 96-луночного микропланшета. **Бт-трейсер** (биотинилированный трейсер) в постоянной концентрации и немеченый стандарт или образец, содержащий пептид, с различными концентрациями, конкурируют за специфическое связывание с антисывороткой. Захваченный Бт-трейсер затем связывается с **SA-HRP** (конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена), который, в свою очередь, при добавлении **ТМВ** (3,3',5,5'-тетраметилбензидин дигидрохлорид), образует растворимый голубой продукт.

Последовательность стандартного пептида приведена в листе данных, а также в каталоге и на сайте производителя (www.BACHEM.com), как "**антигенная последовательность**" (последовательности больших белков обычно не приводятся).

Стандарт используется для построения калибровочной кривой в диапазоне, указанном в характеристике набора. Калибровочные кривые S-образные (строятся с полулогарифмических координатах), но для некоторых наборов калибровочная кривая может оказаться практически линейной на всем диапазоне измеряемых значений. Диапазон измеряемых значений - это диапазон концентраций стандартов, около середины или около IC50 калибровочной кривой. Неизвестные концентрации в исследуемых образцах определяются сравнением абсорбции образцов с калибровочной кривой.

В наборы включены реагенты, в количествах, достаточных для выполнения 96 определений.

ВАРИАЦИИ - ТОЧНОСТЬ – ЭКСТРАКЦИЯ - ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

IC50 набора, или вид калибровочной кривой могут несколько различаться, но это не влияет на точность определения в диапазоне измеряемых значений. Набор точно измеряет концентрацию пептидов в образцах, если выполняются следующие условия:

А) Образцы и стандарты должны анализироваться с использованием одинаковых растворителей и в одинаковых условиях (один микропланшет).

В) Антисыворотка, используемая в наборе, не должна существенно перекрестно реагировать с другими факторами, присутствующими в образце. Таблицы перекрестной реактивности включены в каждый набор. Пользователи могут пожелать протестировать перекрестную реактивность с другими пептидами, которые приведены в каталоге производителя.

С) Пептиды в образце должны быть идентичны стандарту набора. В идеале синтетический стандарт из набора прекрасно имитирует нативный пептид. Иногда, однако, существуют семейства нативных пептидов, обладающих общей или близкой последовательностью. Кроме того, нативные пептиды могут быть энзиматически или спонтанно модифицированы, могут существовать комплексы, могут существовать другие структурные формы. В этих случаях данный набор может не определять точную концентрацию конкретного вида нативного пептида, но он может быть использован для измерения относительной концентрации.

Д) Необходимо проводить экстракцию образцов сывороток.

Факторы, присутствующие в сыворотке, могут связываться с компонентами набора и влиять на измерения. Таким образом, может потребоваться экстрагировать пептиды из образцов сыворотки перед измерениями. Концентрации некоторых антигенов могут быть измерены непосредственно в сыворотке, без экстракции. В этом случае в каталоге производителя указан специально разработанный набор **без экстракции**, который может быть использован для анализа образцов человеческой или крысиной сыворотки.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- **Разные протоколы и листы данных.** Существует семь разных протоколов и один для флюоресценции. На вложенном листе данных указано, какой протокол следует использовать.
- **ИФА буфер и растворитель.** Антисыворотка и Бт-трейсер всегда восстанавливайте и используйте с ИФА буфером. Стандарты и образцы готовьте с "разбавителем стандартов"(или разбавителем). Для наборов EIAH & EIAF разбавителем также является ИФА-буфер, но для наборов без экстракции (EIAS) это крысиная или человеческая сыворотка, поставляемые с набором. Если не наблюдается заметной интерференции между компонентами набора, можете использовать собственный вариант разбавителя для образцов и стандартов – покада получаете стандартную кривую, схожую с таковой, приведенной в листе данных.
- **Комнатная температура.** Исследуемые образцы и все компоненты набора должны достичь комнатной температуры перед использованием.
- **Шейкирование** (опционно) может помочь снизить разброс дублей (рекомендуется 60 грм).
- **Лунки бланка.** Бланк - это фоновое окрашивание, которое будет вычитаться из всех других полученных значений ОП. Не путайте бланк с "Стандартом SO ", который не содержит стандарта пептида и для которого будет получена максимальная ОП. Считывание бланка не влияет на расчет концентраций, таким образом, он опционален.

СХЕМА ПОСТАНОВКИ

Приведенная ниже Схема микропланшета для постановки с калибровочной кривой из 7 точек:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	Blk	U1	U1	U9	U9	U17	U17	U25	U25	U33	U33
B	S1	S1	U2	U2	U10	U10	U18	U18	U26	U26	U34	U34
C	S2	S2	U3	U3	U11	U11	U19	U19	U27	U27	U35	U35
D	S3	S3	U4	U4	U12	U12	U20	U20	U28	U28	U36	U36
E	S4	S4	U5	U5	U13	U13	U21	U21	U29	U29	U37	U37
F	S5	S5	U6	U6	U14	U14	U22	U22	U30	U30	U38	U38
G	S6	S6	U7	U7	U15	U15	U23	U23	U31	U31	U39	U39
H	S0	S0	U8	U8	U16	U16	U24	U24	U32	U32	U40	U40

Blk = бланк, S = стандарты, U = образцы с неизвестными концентрациями.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- **Экстракция образцов.** Экстракцию особенно рекомендуется проводить в образцах сыворотки. Это может быть не так важно для некоторых образцов культур клеток. Подробности смотрите в разделе "Рекомендуемый протокол экстракции образцов". Набор может быть использован без экстракции, но это может привести к получению неожиданных результатов из-за возможного связывания между сывороточными белками и компонентами набора. **Если приобретен «набор без экстракции», то он может быть использован для измерений в человеческой или крысиной сыворотке или плазме (согласно назначению) без проведения экстракции.**
- **Концентрации образцов.** Концентрация молекулы анализа должна лежать в диапазоне измеряемых значений (в области около IC50). Если невозможно установить диапазон концентраций в образце, его можно приготовить в нескольких разведениях, так, чтобы одна из концентраций попала в диапазон измеряемых значений.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ НАБОРА

Лиофилизированные компоненты набора не должны быть растворены до тех пор, пока они не используются для постановки. Пожалуйста, проверьте лист данных для соответствующего протокола.

- **Все реагенты должны достичь комнатной температуры в невскрытом виде.** Не вскрывайте реагенты или микропланшет, пока они находятся в охлажденном состоянии. Они должны достичь комнатной температуры до вскрытия, чтобы избежать накопления влаги.
- **ИФА буфер.** Разведите концентрат ИФА буфера до 1000 мл стерильной деионизированной водой или водой для инъекций (18МОм) и тщательно перемешайте.
- **Стандарт.** Внесите 1мл буфера для разведения стандарта во флакон с лиофилизированным стандартом пептида (1 мг) и перемешайте на вортексе. Если образцы экстрагированы и ресуспендированы в ИФА буфере, как описано ниже, используйте для разведения ИФА буфер. В противном случае используйте собственный буфер, так, чтобы стандарты и образцы обрабатывались одинаково. В «наборах без экстракции» для разведения поставляется человеческая или крысиная сыворотка, не содержащая пептида, но все же при постановке можно использовать свой собственный буфер для разведения, в том случае, если он не связывается существенно с антисывороткой.
- **Стандартная кривая.** Приготовьте серийные разведения стандартов для покрытия диапазона этого набора. Сверьтесь с листом данных по допустимому диапазону.
- **Антисыворотка.** Внесите 5 мл ИФА буфера (10 мл для протокола VII) и перемешайте на вортексе.
- **Бт-трейсер.** Внесите 5 мл ИФА буфера во флакон с лиофилизированным биотинилированным пептидом и перемешайте на вортексе.
- **Раствор EIAF субстрата.** Смешайте 90% раствора субстрата FS1 и 10% раствора субстрата FS2 (9:1, v:v)

ПРОТОКОЛ I (Std.Ab.Bt)

1 - Внесите в каждую лунку микропланшета:

По 50 мкл стандарта или образца (в растворителе)

По 25 мкл антисыворотки (в ИФА буфере)

По 25 мкл Бт-трейсера (в ИФА буфере)

В лунки бланка внесите 50 мкл растворителя, 25 мкл ИФА буфера и 25 мкл Бт-трейсера.

2 - Инкубируйте при комнатной температуре 2 часа.

- 3 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз, по 300 мкл на лунку. Промывайте лунки аккуратно, не допускайте перекрестной контаминации в лунках, особенно во время первого цикла промывки. Полностью удаляйте жидкость из лунок на каждом цикле промывки, резким движением запястья переверните планшет и сбросьте содержимое планшета в раковину, затем аккуратно постучите перевернутым микропланшетом по сухой фильтровальной бумаге. Внесите 300 мкл ИФА буфера в каждую лунку и аккуратно потрясите микропланшет в течение нескольких секунд. Тщательная промывка очень важна.
- 4 - Внесите по 100 мкл на лунку конъюгата стрептавидин-HRP. Встряхните или центрифугируйте флакон с конъюгатом SA-HRP, для того чтобы собрать всю жидкость на дне флакона. Разведите 1/200 в ИФА буфере (60 мкл/12 мл) и перемешайте на вортексе. Внесите по 100 мкл во все лунки, включая лунки бланка.
- 5 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час.
- 6 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз (См. шаг 3).
- 7 - Внесите по 100 мкл на лунку раствора ТМВ. Внесите во все лунки, включая лунки бланка.
- 8 - Инкубируйте при комнатной температуре (обычно 30 - 60 минут). Вы можете считать ОП развившегося окрашивания при длине волны 650 нм и использовать полученные данные для расчетов.
- 9 - Остановите реакцию внесением по 100 мкл 2 N HCl на лунку.
- 10 - Считайте абсорбцию при длине волны 450 нм в течение 10 минут.

ПРОТОКОЛ II (Std.Ab1hr.BtON)

- 1 - Внесите в каждую лунку микропланшета:

По 50 мкл стандарта или образца (в растворителе)

По 25 мкл антисыворотки (в ИФА буфере)

В лунки бланка внесите 50 мкл растворителя, 25 мкл ИФА буфера.

- 2 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час. Более короткая инкубация может дать меньшую чувствительность набора.

- 3 - Растворите Бт-трейсер (в ИФА буфере) и внесите по 25 мкл на лунку.

- 4 - Инкубируйте при 4°C в течение ночи. Более короткое время инкубации может привести к низкому сигналу. Для лучших результатов приведите к комнатной температуре перед продолжением.

5 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз, по 300 мкл на лунку. Промывайте лунки аккуратно, не допускайте перекрестной контаминации в лунках, особенно во время первого цикла промывки. Полностью удаляйте жидкость из лунок при каждом цикле промывки, резким движением запястья переверните планшет и сбросьте содержимое планшета в раковину, затем аккуратно постучите перевернутым микропланшетом по сухой фильтровальной бумаге. Внесите 300 мкл ИФА буфера в каждую лунку и аккуратно потрясите микропланшет в течение нескольких секунд. Тщательная промывка очень важна.

- 6 - Внесите по 100 мкл на лунку конъюгата стрептавидин-HRP.

Встряхните или центрифугируйте флакон с конъюгатом SA-HRP, для того чтобы собрать всю жидкость со дна флакона. Разведите 1/200 в ИФА буфере (60 мкл/12 мл) и перемешайте на вортексе. Внесите по 100 мкл во все лунки, включая лунки бланка.

- 7 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час.

- 8 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз (см. шаг 5).

- 9 - Внесите по 100 мкл на лунку раствора ТМВ. Внесите во все лунки, включая лунки бланка.

- 10 - Инкубируйте при комнатной температуре (обычно 30 - 60 минут). Вы можете считать ОП развившегося окрашивания при длине волны 650 нм и использовать полученные данные для расчетов.

- 11 - Остановите реакцию внесением по 100 мкл 2 N HCl на лунку.

- 12 - Считайте абсорбцию при длине волны 450 нм в течение 10 минут.

ПРОТОКОЛ III (Std.Ab1hr.Bt)

- 1 - Внесите в каждую лунку микропланшета:

По 50 мкл стандарта или образца (в растворителе)

По 25 мкл антисыворотки (в ИФА буфере)

В лунки бланка внесите 50 мкл растворителя, 25 мкл ИФА буфера.

- 2 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час. Более короткое время предварительной инкубации может привести к низкой чувствительности.

- 3 - Растворите Бт-трейсер (в ИФА буфере) и внесите по 25 мкл на лунку.

- 4 - Инкубируйте при комнатной температуре 2 часа.

5 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз, по 300 мкл на лунку. Промывайте лунки аккуратно, не допускайте перекрестной контаминации в лунках, особенно во время первого цикла промывки. Полностью удаляйте жидкость из лунок на каждом цикле промывки, резким движением запястья переверните планшет и сбросьте содержимое планшета в раковину, затем аккуратно постучите перевернутым микропланшетом по сухой фильтровальной бумаге. Внесите 300 мкл ИФА буфера в каждую лунку и аккуратно потрясите микропланшет в течение нескольких секунд. Тщательная промывка очень важна.

6 - Внесите по 100 мкл на лунку конъюгата стрептавидин-HRP. Встряхните или центрифугируйте флакон с конъюгатом SA-HRP, для того чтобы собрать всю жидкость со дна флакона. Разведите 1/200 в ИФА буфере (60 мкл/12 мл) и перемешайте на вортексе. Внесите по 100 мкл во все лунки, включая лунки бланка.

- 7 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час.

- 8 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз (см. шаг 5).

- 9 - Внесите по 100 мкл на лунку раствора ТМВ. Внесите во все лунки, включая лунки бланка.

- 10 - Инкубируйте при комнатной температуре (обычно 30 - 60 минут). Вы можете считать ОП развившегося окрашивания при длине волны 650 нм и использовать полученные данные для расчетов.

- 11 - Остановите реакцию внесением по 100 мкл 2 N HCl на лунку.

- 12 - Считайте абсорбцию при длине волны 450 нм в течение 10 минут.

ПРОТОКОЛ IV (Std.AbON.Bt)

- 1 - Внесите в каждую лунку микропланшета:

По 50 мкл стандарта или образца (в растворителе)

По 25 мкл антисыворотки (в ИФА буфере)

В лунки бланка внесите 50 мкл растворителя, 25 мкл ИФА буфера.

- 2 - Инкубируйте при 4°C в течение ночи. Более короткое время предварительной инкубации может привести к низкой чувствительности.

- 3 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час. За это время Микропланшет достигнет комнатной температуры.

- 4 - Растворите Бт-трейсер (в ИФА буфере) и внесите по 25 мкл на лунку.

- 5 - Инкубируйте при комнатной температуре 2 часа.

6 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз, по 300 мкл на лунку. Промывайте лунки аккуратно, не допускайте перекрестной контаминации в лунках, особенно во время первого цикла промывки. Полностью удаляйте жидкость из лунок при каждом цикле промывки, резким движением запястья переверните планшет и сбросьте содержимое планшета в раковину, затем аккуратно постучите перевернутым микропланшетом по сухой фильтровальной бумаге. Внесите 300 мкл ИФА буфера в каждую лунку и аккуратно потрясите микропланшет в течение нескольких секунд. Тщательная промывка очень важна.

7 - Внесите по 100 мкл на лунку конъюгата стрептавидин-HRP. Встряхните или центрифугируйте флакон с конъюгатом SA-HRP, для того чтобы собрать всю жидкость со дна флакона. Разведите 1/200 в ИФА буфере (60 мкл/12 мл) и перемешайте на вортексе. Внесите по 100 мкл во все лунки, включая лунки бланка.

- 8 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час.

- 9 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз (См. шаг 6).

- 10 - Внесите по 100 мкл на лунку раствора ТМВ. Внесите во все лунки, включая лунки бланка.
- 11 - Инкубируйте при комнатной температуре (обычно 30 - 60 минут). Вы можете считать ОП развившегося окрашивания при длине волны 650 нм и использовать полученные данные для расчетов.
- 12 - Остановите реакцию внесением по 100 мкл 2 N HCl на лунку.
- 13 - Считайте абсорбцию при длине волны 450 нм в течение 10 минут.

ПРОТОКОЛ V ([Ab1hr.Std2hr.BtON](#))

- 1 - Внесите в каждую лунку микропланшета по 25 мкл антисыворотки (в ИФА буфере). В лунки бланка внесите 25мкл ИФА буфера.
- 2 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час.
- 3 - Внесите по 50 мкл стандартов и образцов (в растворителе). Не промывайте микропланшет перед внесением. Внесите 50 мкл растворителя в лунки бланка.
- 4 - Инкубируйте при комнатной температуре 2 часа. Более короткое время предварительной инкубации может привести к низкой чувствительности.
- 5 - Растворите Бт-трейсер (в ИФА буфере) и внесите по 25 мкл на лунку.
- 6 - Инкубируйте при 4°C в течение ночи. Для лучших результатов приведите к комнатной температуре перед продолжением.
- 7 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз, по 300 мкл на лунку. Промывайте лунки аккуратно, не допускайте перекрестной контаминации в лунках, особенно во время первого цикла промывки. Полностью удаляйте жидкость из лунок на каждом цикле промывки, резким движением запястья переверните планшет и сбросьте содержимое планшета в раковину, затем аккуратно постучите перевернутым микропланшетом по сухой фильтровальной бумаге. Внесите 300 мкл ИФА буфера в каждую лунку и аккуратно потрясите микропланшет в течение нескольких секунд. Тщательная промывка очень важна.
- 8 - Внесите по 100 мкл на лунку конъюгата стрептавидин-HRP. Встряхните или центрифугируйте флакон с конъюгатом SA-HRP, для того чтобы собрать всю жидкость на дне флакона. Разведите 1/200 в ИФА буфере (60 мкл/12 мл) и перемешайте на вортексе. Внесите по 100 мкл во все лунки, включая лунки бланка.
- 9 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час.
- 10 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз (см. шаг 7).
- 11 - Внесите по 100 мкл на лунку раствора ТМВ. Внесите во все лунки, включая лунки бланка.
- 12 - Инкубируйте при комнатной температуре (обычно 30 - 60 минут). Вы можете считать ОП развившегося окрашивания при длине волны 650 нм и использовать полученные данные для расчетов.
- 13 - Остановите реакцию внесением по 100 мкл 2 N HCl на лунку.
- 14 - Считайте абсорбцию при длине волны 450 нм в течение 10 минут.

ПРОТОКОЛ VI ([Std.Ab.BtON](#))

- 1 - Внесите в каждую лунку микропланшета:
 - По 50 мкл стандарта или образца (в растворителе)
 - По 25 мкл антисыворотки (в ИФА буфере)
 - По 25 мкл Бт-трейсера (в ИФА буфере)

В лунки бланка внесите 50 мкл растворителя, 25 мкл ИФА буфера и 25 мкл Бт-трейсера.

- 2 - Инкубируйте при 4°C в течение ночи. Для лучших результатов приведите к комнатной температуре перед продолжением.
- 3 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз, по 300 мкл на лунку. Промывайте лунки аккуратно, не допускайте перекрестной контаминации в лунках, особенно во время первого цикла промывки. Полностью удаляйте жидкость из лунок на каждом цикле промывки, резким движением запястья переверните планшет и сбросьте содержимое планшета в раковину, затем аккуратно постучите перевернутым микропланшетом по сухой фильтровальной бумаге. Внесите 300 мкл ИФА буфера в каждую лунку и аккуратно потрясите микропланшет в течение нескольких секунд. Тщательная промывка очень важна.
- 4 - Внесите по 100 мкл на лунку конъюгата стрептавидин-HRP. Встряхните или центрифугируйте флакон с конъюгатом SA-HRP, для того чтобы собрать всю жидкость на дне флакона. Разведите 1/200 в ИФА буфере (60 мкл/12 мл) и перемешайте на вортексе. Внесите по 100 мкл во все лунки, включая лунки бланка.
- 5 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час.
- 6 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз (см. шаг 3).
- 7 - Внесите по 100 мкл на лунку раствора ТМВ. Внесите во все лунки, включая лунки бланка..
- 8 - Инкубируйте при комнатной температуре (обычно 30 - 60 минут). Вы можете считать ОП развившегося окрашивания при длине волны 650 нм и использовать полученные данные для расчетов.
- 9 - Остановите реакцию внесением по 100 мкл 2 N HCl на лунку.
- 10 - Считайте абсорбцию при длине волны 450 нм в течение 10 минут.

ПРОТОКОЛ VII ([Ab2hr.washStd2hr.BtON](#))

Замечание: только для этого протокола – антитела должны разводиться в 10 мл ИФА-буфера.

- 1 - Внесите в каждую лунку микропланшета
 - По 100 мкл антисыворотки (в ИФА буфере). В лунки бланка внесите 100 мкл ИФА буфера.
- 2 - Инкубируйте при комнатной температуре 2 часа.
- 3 - Промойте микропланшет ИФА буфером 3 раза, по 300 мкл на лунку. Промывайте лунки аккуратно, не допускайте перекрестной контаминации в лунках, особенно во время первого цикла промывки. Полностью удаляйте жидкость из лунок на каждом цикле промывки, резким движением запястья переверните планшет и сбросьте содержимое планшета в раковину, затем аккуратно постучите перевернутым микропланшетом по сухой фильтровальной бумаге. Внесите 300 мкл ИФА буфера в каждую лунку и аккуратно потрясите микропланшет в течение нескольких секунд.
- 4 - Внесите 100 мкл стандарта или образца (в растворителе). (Внесите 100 мкл растворителя в лунки бланка.)
- 5 - Инкубируйте при комнатной температуре 2 часа. Более короткое время предварительной инкубации может привести к низкой чувствительности.
- 6 - Растворите Бт-трейсер (в ИФА буфере) и внесите по 25 мкл на лунку.
- 7 - Инкубируйте при 4°C в течение ночи. Для лучших результатов приведите к комнатной температуре перед продолжением.
- 8 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз, по 300 мкл на лунку. Промывайте лунки аккуратно, не допускайте перекрестной контаминации в лунках, особенно во время первого цикла промывки. Тщательная промывка очень важна. См. шаг 3.
- 9 - Внесите по 100 мкл на лунку конъюгата стрептавидин-HRP. Встряхните или центрифугируйте флакон с конъюгатом SA-HRP, для того чтобы собрать всю жидкость со дна флакона. Разведите 1/200 в ИФА буфере (60 мкл/12 мл) и перемешайте на вортексе. Внесите по 100 мкл во все лунки, включая лунки бланка.
- 10 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час.
- 11 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз (См. шаг 3 и 8).
- 12 - Внесите по 100 мкл на лунку раствора ТМВ. Внесите во все лунки, включая лунки бланка.
- 13 - Инкубируйте при комнатной температуре (обычно 30 - 60 минут). Вы можете считать ОП развившегося окрашивания при длине волны 650 нм и использовать полученные данные для расчетов.
- 14 - Остановите реакцию внесением по 100 мкл 2 N HCl на лунку.
- 15 - Считайте абсорбцию при длине волны 450 нм в течение 10 минут.

ПРОТОКОЛ EIAF (IIIF Std.Ab1hr.Bt)

- 1 - Внесите в каждую лунку микропланшета

По 50 мкл стандарта или образца (в растворителе)

По 25 мкл антисыворотки (в ИФА буфере)

В лунки бланка внесите 50 мкл растворителя, 25 мкл ИФА буфера

2 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час. Более короткое время предварительной инкубации может привести к низкой чувствительности.

3 - Растворите Бт-трейсер (в ИФА буфере) и внесите по 25 мкл на лунку.

4 - Инкубируйте при комнатной температуре 2 часа.

5 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз, по 300 мкл на лунку. Промывайте лунки аккуратно, не допускайте перекрестной контаминации в лунках, особенно во время первого цикла промывки. Полностью удаляйте жидкость из лунок при каждом цикле промывки, резким движением запястья переверните планшет и сбросьте содержимое планшета в раковину, затем аккуратно постучите перевернутым микропланшетом по сухой фильтровальной бумаге. Внесите 300 мкл ИФА буфера в каждую лунку и аккуратно потрясите микропланшет в течение нескольких секунд. Тщательная промывка очень важна.

6 - Внесите по 100 мкл на лунку конъюгата стрептавидин-HRP. Встряхните или центрифугируйте флакон с конъюгатом SA-HRP, для того чтобы собрать всю жидкость на дне флакона. Разведите 1/200 в ИФА буфере (60 мкл/12 мл) и перемешайте на вортексе. Внесите по 100 мкл во все лунки, включая лунки бланка.

7 - Инкубируйте при комнатной температуре 1 час.

8 - Промойте микропланшет ИФА буфером 5 раз (См. шаг 5).

9 - Внесите по 100 мкл на лунку комбинированного раствора субстрата. Убедитесь в его приготовлении смешиванием 90% субстратного раствора FS1 и 10% субстратного раствора FS2 (9:1, v:v). Внесите во все лунки, включая лунки бланка.

10 - Инкубируйте при комнатной температуре (60 минут). Вы можете считать плашку после установления флуориметра на возбуждении 325 нм/эмиссия 420 нм перед 60 минут и использовать данные для расчета, но прерывание реакции (следующий шаг) даст сигнал посильнее.

13 - Остановите реакцию внесением по 100 мкл стоп-раствора на лунку.

14 - Считайте флюоресценцию (на возбуждении 325 нм/эмиссия 420 нм)

АНАЛИЗ ДАННЫХ

Постройте калибровочную кривую и рассчитайте результаты. Для построения калибровочной кривой рекомендуется использовать соответствующее программное обеспечение. Микропланшетные ридеры обычно имеют такое программное обеспечение. Это, однако, не обязательно, и можно построить калибровочную кривую вручную, используя полулогарифмическую графическую бумагу. Также можно использовать табличную программу. Для последнего варианта рекомендуется использовать следующую процедуру. Установите таблицу, как показано ниже (рис.2) (значения в таблице приводятся только как иллюстрация и не обязательно типичны для конкретного набора).

Выделите область 8 x 12, соответствующую схеме микроплшета и внесите данные по ОП с ридера с соответствующие клетки. Рассчитайте среднее значение ОП лунок бланка в другой клетке (указано стрелками от клеток A1 и A2). Введите концентрации стандартов (См. в нг/мл на рисунке).

Рассчитайте средние значения ОП стандартов и вычите значение фонового окрашивания (бланк), как указано стрелками для последнего стандарта (клетки H1 и H2).

Постройте точки калибровочной кривой в полулогарифмической системе координат. Откладывайте средние значения ОП по оси Y (за вычетом среднего значения бланка) и оп оси X концентрации стандартов в нг/мл.

Используйте уравнение, приведенное ниже, для расчета значений в колонке "FIT" и построите гладкую линию по значениям FIT против концентраций стандартов. Затем измените параметры a (max), b (угол наклона), c (IC50), и d (min), до тех пор, пока не получите удовлетворительную аппроксимацию, a-d

$$y = (a-d)/(1 + (x/c)^b) + d$$

Затем рассчитайте средние значения ОП образцов и вычите среднее значение бланка (см. стрелки от клеток A3 и A4, и стрелки ведущие к "Average"). Для расчета концентраций в образцах, в нг/мл, можно использовать обратное уравнение.

$$X = c * ((y-a)/(d-y))^{1/b}$$

Внимание: При расчете концентраций образцов в помощью обратного уравнения, если $y = d$ или $y > a$ или $y < d$, значение лежит вне измеряемого диапазона и расчет даст либо ошибку, либо будет получена бессмысленная отрицательная концентрация.

ПРЕДЛАГАЕМЫЙ ПРОТОКОЛ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ ОБРАЗЦОВ

В наборе поставляется избыточное количество стандарта, который можно использовать для определения, если требуется экстракция. Например, при работе с сывороткой, ее можно обогатить известным количеством стандарта и проверить точность измерений с и без экстракции. Процедура экстракции элиминирует потенциально влияющие вещества, такие как альбумин. Экстракция может быть также необходима для концентрирования образца до диапазона измеряемых значений. Как и при любых процедурах очистки, извлечение определенного вещества не является полным.

Таким образом, для более точных измерений рекомендуется оптимизация и количественная оценка процедуры экстракции. Так как невозможно предоставить точный протокол оптимизации и количественной оценки экстракции, в набор включено достаточное количество стандарта, которое может быть использовано в этих целях.

Метод экстракции на колонке C18 Sep

Данный базовый протокол предназначен помочь пользователям, у которых небольшой опыт экстракции образцов. Он может быть применен к образцам различных биологических жидкостей, но не является оптимизированным протоколом для какого-либо конкретного антигена.

Необходимые материалы:

- Колонка SEP-COLUMN, содержащая 200 мг C18, кат. №Y-1000.
- Буфер А (BUFF-A): 1% трифторуксусная кислота (TFA, HPLC чистая). (Для подкисления образцов плазмы для удаления влияющих белков, таких как альбумин).
- Буфер В (BUFF-B): 60% ацетонитрил (HPLC чистый), 1% TFA и 39% дистиллированной воды. (Для элюирования пептида с колонки C18).
- Можно заказать набор для экстракции (кат. № S-5000), который включает SEP-колонки и буферы.

Получение и подготовка образцов плазмы

1. Соберите образцы крови (2-6 мл) в охлажденный шприц и перенесите в полипропиленовую пробирку, содержащую ЭДТА (1 мг/мл крови) в качестве антикоагулянта и аprotинин (500 КМЕ/мл крови) в качестве ингибитора протеаз, при 4°C. Не используйте гепарин в качестве антикоагулянта, так как он может влиять на результаты анализа. Возможно использовать вакутейнеры с ЭДТА.
2. Центрифугируйте кровь при 1,600g в течение 15 минут при 4°C.
3. Соберите верхний слой (плазму).
4. Переходите к процедуре экстракции немедленно или замораживайте образцы при -70°C для хранения.

Процедура экстракции

1. Добавьте равный объем буфера А к образцу плазмы.
2. Центрифугируйте при 6,000 x g - 17,000 x g в течение 20 минут при 4°C.
3. Перенесите супернатант в новую пробирку, удалив любой возможный осадок.
4. Уравновесьте колонку SEP-COLUMN, промыв ее 1 мл буфера В, а затем 3 x 3 мл буфером А.
5. Нанесите полученный супернатант плазмы на уравновешенную колонку SEP-Column.
6. Медленно промойте колонку буфером А (3 мл, дважды) и выбросите смыв. Можно использовать вакуумный насос (10 сек/капля).
7. Медленно элюируйте пептид буфером В (3 мл, один раз) и соберите элюент в полипропиленовую пробирку. Можно использовать

вакуумный насос, как описано в предыдущем шаге.

8. Лиофилизируйте элюент, используя сухой лед /метаноловую баню для замораживания образца и центрифужный концентратор для выпаривания.
9. Растворите сухой остаток в нужном объеме ИФА буфера, так, чтобы концентрация определяемого пептида была близка к IC50 (в диапазоне измеряемых значений).

ПОИСК И РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Большая часть проблем вызвана плохой техникой выполнения или изменениями протокола. Кроме того, необходимо убедиться в том, что срок годности набора не истек и что набор хранился в соответствующих условиях. Пожалуйста, внимательно прочитайте раздел «ХРАНЕНИЕ» данной инструкции.

- Можно ли выполнить больше одной постановки данным набором?
 - Хотя производитель не гарантирует характеристики данного набора при повторной или последующей постановках, пользователь может попробовать использовать набор в нескольких постановках, при условии, что растворенные специфическая антитисыворотка, стандарт и Бт-трейсер хранятся при температуре -20°C или ниже, а остальные компоненты набора хранились охлажденными (2-4°C), в сухом месте. Замораживание аликвот растворенных компонентов может позволить увеличить количество постановок.
- Какие могут быть причины неточного считывания?
 - Значения ОП, превышающие диапазон измеряемых значений микропланшетного ридера.
 - Грязные или жирные доньшки лунок - протрите 70% спиртом.
 - Пузырьки воздуха или пена в лунках.
- Калибровочная кривая не выглядит правильной.
 - Если считывание проводилось не сразу, то верхняя часть калибровочной кривой сглаживается. Рекомендуется проводить считывание несколько раз в период развития голубого окрашивания (при 650 нм). Голубое окрашивание будет менее интенсивно по сравнению с окрашиванием остановленной реакции (желтое, 450 нм), но данные будут достоверны, и снижается риск потери данных нижней части калибровочной кривой.
 - Некоторые калибровочные кривые могут быть практически линейны, это возможно для отдельных анализов, сравните с типичными графиками для некоторых продуктов, приведенными в каталоге производителя.
- Значение IC50 не такое, как ожидается.
 - Значение IC50, приводимое для каждого продукта, основывается на концентрации приготовленных стандартов до того, как они добавлены в рабочий буфер.
 - Разница в 2 -3 раза может быть нормальной для некоторых наборов и может быть вызвана временем, необходимым для уравнивания связывания трейсера и стандарта. Это особенно верно для протоколов с преинкубацией. Если возможно, всегда включайте собственный проверенный стандарт с концентрацией, близкой к IC50 для проверки точности метода.
 - В случае, если калибровочная кривая практически линейная, точное значение IC50 не может быть рассчитано.
 - Использование избыточных количеств антитисыворотки или трейсера, или использование деградировавшего стандарта повышает значение IC50.
- Слишком высокий коэффициент вариации в дублях.
 - Существуют только простые объяснения этого факта: плохое смешивание, некачественная техника пипетирования или неточные пипетки, наборы реагентов не достигли комнатной температуры перед использованием, перекрестное загрязнение образцов, например, попадание капель или разбрызгивание, пузырьки или пена в лунках, следы пальцев или грязь на доньшках лунок, и т.д.
- ОП ниже, чем ожидается.
 - Интенсивность окрашивания не значительно влияет на точность определений, до тех пор, пока угол наклона в измеряемом диапазоне нормальный, но, если интенсивность окрашивания очень низкая, при условии, что прошло достаточно времени, это может означать, что было добавлено недостаточное количество одного из компонентов (антитисыворотка, Бт-трейсер, SA-HRP или ТМВ) или один из этих компонентов деградировал из-за неправильного хранения или повторных циклов замораживания/оттаивания.
- Калибровочная кривая выглядит правильной, но результаты неправдоподобные.
 - Возможно использование различных растворителей или разные условия анализа образцов и стандартов.
 - Антитисыворотка может связываться с другим пептидом со схожими антигенными свойствами.
 - Потеря антигена в процессе экстракции или при экстракции не были элиминированы влияющие вещества.
 - Убедитесь, что антиген, для измерения которого предназначен набор (антигена набора) тот же, который требуется определить. Иногда антиген набора является только частью целого нативного белка. В этом случае набор может быть использован для определения относительной концентрации, но не полностью целого белка.
- Будет ли работать набор EIAF с любым флуориметром?
 - Световой сигнал, излучаемый лунками образца будет иметь различные характеристики в зависимости от используемого инструмента.

ЛИТЕРАТУРА – См. оригинал инструкции, стр. 21.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Были протестированы физические и химические свойства реагентов, входящих в состав набора. Реагенты не содержат ингредиентов, классифицируемых как опасные для здоровья и составляющих более 1% от смеси или которые можно выделить из смеси в концентрациях, превышающих допустимые пределы согласно OSHA (Закон о технике безопасности и гигиене труда, США).

Опасные вещества

Стандарт поставляется в лиофилизированном виде. Лиофилизованная антитисыворотка содержит Твин-20 и тимерозал. Концентрат ИФА буфера содержит Tris и тимерозал. Буфер поставляется в жидком виде. SA-HRP содержит 0.01% метилизотиазолин, 0.01% бромнитродидоксан и 10 ppm Proclin 300 в качестве консерванта.

Физические и химические данные

Компоненты стабильны в закрытых контейнерах при нормальных температуре и давлении. Опасная полимеризация не известна.

Данные о пожарной опасности

Компоненты не являются горючими веществами и обладают ничтожной способностью воспламеняться при нагревании или при нахождении рядом с огнем. Противопожарные действия должны соответствовать воспламенившимся материалам.

Опасность для здоровья

Компоненты могут быть вредными при проглатывании, ингаляции или попадании на кожу и могут вызывать раздражения кожи или глаз. При попадании в глаза промойте глаза большим количеством воды и обратитесь к врачу. При попадании на кожу, промойте большим количеством воды с мылом.

Реактивность

Компоненты стабильны в закрытых контейнерах при нормальных температуре и давлении.

Разбрызгивание (проливание) и утилизация

При разбрызгивании (проливание) проветрите помещение или промойте место разбрызгивания (пролива). Утилизируйте согласно национальным требованиям.

Хранение и использование

Для предотвращения нежелательных контактов носите защитные очки, перчатки и лабораторную одежду. Указанная информация считается

достоверной, но не является всеобъемлющей и должна использоваться только как рекомендации. Решение о ее пригодности для принятия необходимых мер предосторожности остается в ответственности пользователя.
 Производитель Peninsula Laboratories, LLC не несет какой-либо ответственности за повреждения, возникшие в результате использования данного продукта.

ГАРАНТИЯ И ОГРАНИЧЕНИЕ ОТВЕТСТВЕННОСТИ

Смотри инструкцию на английском языке.



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

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»

Рис.2

Data Analysis

II - Replace the cell contents below with your own data, according to the given layout.

Copy and paste the plate reader data into here: (Make sure the layout is correct)

	Duplicates		Duplicates		Duplicates		Duplicates		Duplicates		Duplicates	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.000	0.000	1.001	1.001	1.009	1.009	1.017	1.017	1.025	1.025	1.033	1.033
B	0.277	0.175	1.002	1.002	1.010	1.010	1.018	1.018	1.026	1.026	1.034	1.034
C	0.346	0.290	1.003	1.003	1.011	1.011	1.019	1.019	1.027	1.027	1.035	1.035
D	0.527	0.476	1.004	1.004	1.012	1.012	1.020	1.020	1.028	1.028	1.036	1.036
E	0.818	0.938	1.005	1.005	1.013	1.013	1.021	1.021	1.029	1.029	1.037	1.037
F	1.398	1.361	1.006	1.006	1.014	1.014	1.022	1.022	1.030	1.030	1.038	1.038
G	1.609	1.608	1.007	1.007	1.015	1.015	1.023	1.023	1.031	1.031	1.039	1.039
H	1.605	1.547	1.008	1.008	1.016	1.016	1.024	1.024	1.032	1.032	1.040	1.040
	0.000		Blank average									

III - Enter standards concentration below in the ng/ml column

Note: To include So in the plot enter an arbitrary small number (e.g. 0.01) but not ZERO in C69
 Note: To extrapolate the "fit" red curve add more concentrations immediately above (C61 and C60) and below Std data points (C68).

	ng/ml	signal	FIT	stdev
Enter S1	10.000	0.226	0.242	0.0718
Enter S2	2.500	0.318	0.303	0.0393
Enter S3	0.625	0.501	0.492	0.0355
Enter S4	0.156	0.878	0.899	0.0848
Enter S5	0.039	1.379	1.361	0.0263
Enter S6	0.010	1.609	1.621	0.0007
S0 (zero)	0.001		1.752	

4 - Adjust parameters a b c d (green cells) to optimize the fit.

1.609 1.000 0.159 0.226 ← parameters first bet (please adjust green cells)

0.876 3 0.150 0.8781 0.159

Calculations of initial curve parameters

1.752 0.936 0.123 0.217

(max) a | slope) b | IC50) c | (min) d

After you dump your data in the B46:M53 area the first plot you'll see above will not be perfectly fitted to your data. You must adjust the parameters in the green cells above to optimize the fit of the red curve to your data.

0.0325 ← This number gets smaller as the fit gets better

5 - Read unknown concentrations below. NOTE: trust results only if ODs are within the measuring range.

SPIKED (if you have "spiked" samples with known concentrations enter them in the F column)
 ▼ If the signal readings are as expected the result will be 100% X-reactivity

Smpls	duplic.	1duplic 2	Average	ng/ml	ng/ml	%Xreact
U1	1.001	1.001	1.001	0.117	10000	0%
U2	1.002	1.002	1.002	0.117	10000	0%
U3	1.003	1.003	1.003	0.117	10000	0%