

НАБІР

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АПОЛІПОПРОТЕЇНУ Е У ЗРАЗКАХ ПЛАЗМИ, СИРОВАТКИ, СМР І СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЛЮДИНИ

EA8003-1, Human Apolipoprotein E ELISA

Каталог. № : EA8003-1
Кількість : 96
Виробник : AssayPro, (США)

Версія 2.9



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні збігатися.

ВСТУП

Аполіпопротеїн Е (АроЕ) є поліморфним білком (34 кДа) з 299 амінокислот і присутній в усіх фракціях ЛП в плазмі. Він синтезується в першу чергу в печінці і є основним апопротеїном з хіломікронів. АроЕ має важливе значення для нормального катаболізму багатих тригліцидами ліпопротеїнів складових і серцево-судинних захворювань (1). АроЕ також має важливе значення в ряді інших важливих біологічних процесів, у тому числі хворобі Альцгеймера, когнітивній функції, імунній регуляції, клітинній сигналізації та інфекційних захворюваннях. Є три поширені ізоформи білка: АроЕ-3 нормальна; в той час як АроЕ-2 і АроЕ-4 не функціональними. Дефіцит АроЕ викликає гіперліпопротеїнемію типу III і передчасний атеросклероз (2, 3). АроЕ є основним генетичним фактором ризику для захворювання з пізнім початком хвороби Альцгеймера і когнітивного дефіциту, пов'язаних зі старінням (4-7). АроЕ-4 посилює ВІЛ-1 вхід клітин in vitro і генотип АроЕ Е4/Е4 прискорює прогресування ВІЛ-інфекції (8).

ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір AssayMax людського Аполіпопротеїну Е ELISA призначений для виявлення Аполіпопротеїну Е в плазмі, сироватці, СМР і супернатантах клітинних культур людини. Цей аналіз використовує кількісну методику імуноферментного аналізу типу сандвіч, яка вимірює АроЕ менш, ніж за 4 години. Поліклональні антитіла, специфічні для АроЕ, були попередньо нанесені на мікропланшет. АроЕ в стандартах і зразках затиснутий і мобілізований антитілом і специфічним біотинильованим поліклональним антитілом АроЕ, який розпізнається кон'югатом стрептавідин-пероксидази. Всі незв'язані матеріали потім вимиваються і субстрат ферменту пероксидази додається. Розвиток кольору зупиняється, і інтенсивність кольору вимірюється.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Підготувати все реагенти (робочий буфер для розведення, промивний буфер, стандарти, біотинильоване антитіло і SP-кон'югат) відповідно до інструкції, перед запуском тесту.
- Підготуйте всі зразки до проведення аналізу. Коефіцієнт розбавлення для зразків вказаний в цьому Протоколі. Тим не менш, користувач повинен самостійно визначити оптимальний коефіцієнт розведення.
- Осадити частинки у флаконі SP-кон'югату і у флаконі біотинильованих антитіл перед їх відкриттям і використанням.
- Стоп розчин є кислим розчином.
- Цей набір призначений для використання в дослідницьких цілях.
- Набір не слід використовувати після закінчення терміну придатності.

РЕАГЕНТИ

- Мікропланшет Людського АроЕ:** 96-лунковий полістироловий мікропланшет (12 стріпів по 8 лунок), покритий поліклональними антитілами до АроЕ.
- Ущільнювальні стрічки:** Кожен комплект містить 3 нарізані, чутливі до тиску стрічки ущільнювачів, які можуть бути підігнані під формат індивідуального аналізу.
- Стандарт Людського АроЕ:** АроЕ в буферній білкової основі (7 мкг, ліофілізований, 2 флакона).
- Біотинильоване антитіло Людського АроЕ (50x):** 50x біотинильовані поліклональні антитіла до АроЕ (120 мкл).
- Концентрат розчинника MIX (10x):** 10x концентрована буферна білкова основа (30 мл).

- Концентрат промивного буфера (20x):** 20x концентровані буферні поверхнево-активні речовини (30 мл, 2 пляшки).
- Кон'югат стрептавідин-пероксидази (SP-кон'югат):** 100x концентрат (80 мкл).
- Субстрат хромогену:** готовий до використання стабілізований пероксидазою хромогенний субстрат тетраметилбензидину (8 мл).
- Стоп розчин:** 0.5 N соляної кислоти для зупинки реакції хромогенного субстрату (12 мл).

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

- Зберігайте компоненти набору при зазначених температурах після прибуття до закінчення терміну придатності.
- Зберігайте стандарт, SP-кон'югат і біотинильоване антитіло при -20 °С.
- Зберігайте мікропланшет, концентрат розріджувача (10x), миючий буфер, стоп розчин, і субстрат хромогену при температурі 2-8 °С.
- Невикористані лунки мікропланшетів можуть бути повернуті в пакет з фольгою з осушувачем і запечатані. Зберігати до 1 місяця у вакуумному ексікаторі.
- Розріджувач (1x) зберігати до 1 місяця при 2-8 °С.

ІНШІ НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ

- Мікропланшетний зчитувальний пристрій, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм.
- Піпетки (1-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл і багатоканальна).
- Деіонізована або дистильована вода класу реагенту.

ЗАБІР, ПІДГОТОВКА ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКА

- Плазма:** Зібрати плазму, використовуючи 1/10 об'єму 0.1 М цитрату натрію в якості антикоагулянту. Центрифугувати зразки при 3000g протягом 10 хвилин. Зразки розбавити 1:400 в Розчиннику MIX та аналізувати. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °С або нижче протягом 3 місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання (ЕДТА або гепарин також можуть бути використані в якості антикоагулянту).
- Сироватка:** Зразки повинні бути зібрані в сепараторну пробірку для сироватки. Після утворення згустку, зразки центрифугувати при 3000g протягом 10 хвилин. Зразки розбавити 1:400 в Розчиннику MIX та аналізувати. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °С або нижче протягом 3 місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.
- Клітинна культура:** Центрифугувати клітинну культуру при 3000g протягом 10 хвилин, щоб видалити сміття. Зібрати супернатант та аналізувати. Зразки зберігати при температурі -20 °С або нижче. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.
- Клітинний лізат:** Промити лунку з холодним PBS, а потім очистити лунку в трубку з 5 мл холодної PBS з 0.5 М ЕДТА. Центрифугувати суспензію при 1500 g протягом 10 хвилин при 4 °С і аспірувати супернатант. Повторно суспендувати осад у крижаному Лізуючому Буфері (10 мМ Тріс, рН 8,0, 130 мМ NaCl, 1% Тритон X-100, коктейль інгібітора протеази). На кожні 1 x 10⁶ клітин додати приблизно 100 мкл крижаного Лізуючого Буфера. Інкубувати на льоду протягом 60 хвилин. Центрифугувати при 13000 x g протягом 30 хвилин при 4 °С і зібрати супернатант для аналізу.
- СМР:** Зібрати спинномозкову рідину, використовуючи ємність для зразка. Центрифугувати зразки при 3000g протягом 10 хвилин. Розбавити зразки 1:20 в Розчиннику MIX та аналізувати. Нерозбавлені зразки можуть зберігатися при температурі -80 °С протягом 3 місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.

Див. Розведення Зразка для отримання подальшої інформації.

Вказівки для розведення 1:100 або більше (Тільки для довідки, будь ласка, дотримуйтесь протоколу конкретного запропонованого розведення)	
1:100	1:10000
A. 4 мкл зразка: 396 мкл буфера (100x) = 100-кратне розведення	A. 4 мкл зразка: 396 мкл буфера (100x) B. 4 мкл A: 396 мкл буфера (100x) = 10000-кратне розведення
Якщо пропустити, що необхідний обсяг менше або дорівнює 400 мкл	
Якщо пропустити, що необхідний обсяг менше або дорівнює 400 мкл	
1:1000	1:100000
A. 4 мкл зразка: 396 мкл буфера (100x) B. 24 мкл A: 216 мкл буфера (10x) =	A. 4 мкл зразка: 396 мкл буфера (100x) B. 4 мкл A: 396 мкл буфера (100x)

1000-кратне розведення	С. 24 мкл В: 216 мкл буфера (10x) = 1000000-кратне розведення
Якщо припустити, що необхідний обсяг менше або дорівнює 240 мкл	Якщо припустити, що необхідний обсяг менше або дорівнює 400 мкл

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

- Свіжорозведені реагенти привести до кімнатної температури перед використанням.
- МІХ концентрат для розведення (10x):** Якщо кристали утворилися в концентраті, акуратно перемішати, поки кристали повністю не розчиняться. Розвести концентрат для розведення МІХ 1:10 очищеною водою. Зберігати до 1 місяця при 2-8 °С.
- Стандартна крива:** Відновити 7 мкг стандарту людського Аполіпопротеїну Е з 3.5 мл розріджувача МІХ для отримання стандартного розчину 2 мкг/мл. **Аліквотувати стандарт, щоб обмежити повторні заморожування-відтавання.** Підготувати подвійні або потрібні значення стандарту серійним розбавленням стандартного розчину (2 мкг/мл) 1:2 з МІХ Розчинником для підготовки розведень 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313 і мкг/мл. МІХ Розчинник служить нульовим стандартом (0 мкг/мл). Будь-який аліквотований розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °С і використаний протягом 2 днів. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.

Стандарт	Розведення	АроЕ, мкг/мл
P1	1 частина Стандарту (2 мкг/мл)	2.0000
P2	1 частина P1 + 1 частина Розчинника МІХ	1.0000
P3	1 частина P2 + 1 частина Розчинника МІХ	0.5000
P4	1 частина P3 + 1 частина Розчинника МІХ	0.2500
P5	1 частина P4 + 1 частина Розчинника МІХ	0.1250
P6	1 частина P5 + 1 частина Розчинника МІХ	0.0625
P7	1 частина P6 + 1 частина Розчинника МІХ	0.0313
P8	Розчинник МІХ	0.0000

- Антитіла біотинильованого людського Аполіпопротеїну Е (50x):** Коротко центрифугувати кон'югат антитіл так, щоб повністю зібрати реагент на дні пробірки, і розвести необхідну кількість кон'югату в 50 разів Розчинником МІХ. Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °С.
- Концентрат буфера для промивок (20x):** Якщо кристали утворилися в концентраті, обережно перемішати до тих пір поки кристали повністю не розчиняться. Розвести концентрат промивного буфера 1:20 водою для аналізу.
- SP кон'югат (100x):** Коротко центрифугувати SP Кон'югат так, щоб повністю зібрати реагент на дні пробірки, і розвести необхідну кількість кон'югату в 100 разів Розчинником МІХ. Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °С.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

- Приготуйте всі реагенти, робочі розведення стандарту і зразки, як описано в даній інструкції. Перед початком аналізу всі реагенти повинні досягти кімнатної температури. Тестування виконується при кімнатній температурі (20-25 °С).
- Дістаньте зайві стрипи з рамки-утримувача і негайно помістіть їх назад в оригінальний алюмінієвий пакет з осушувачем. Ретельно закрийте пакет для запобігання попадання вологи і зберігайте його у вакуумному ексикаторі.
- Внесіть по 50 мкл стандарту АроЕ або зразків у відповідні лунки. Закрийте лунки адгезивною плівкою та інкубуйте 2 години. Встановіть таймер після внесення останнього зразка.
- Промийте лунки 5 разів, використовуючи по 200 мкл буфера для промивок на лунку на один цикл промивки. На кожному кроці перевертайте мікропланшет, зливайте рідину з лунок, потім постукайте 4-5 разів по фільтрувальному папері, для повного видалення залишків рідини з лунок. Якщо використовується машина, промийте 6 разів з 300 мкл Промивного Буфера, переверніть планшет, видаляючи вміст; постукайте 4-5 разів по фільтрувальному папері, для повного видалення залишків рідини з лунок.
- Внесіть по 50 мкл біотинильованих антитіл анти-Аполіпопротеїну Е в усі лунки і інкубуйте протягом 1 години.
- Промийте мікропланшет як описано вище.
- Внесіть по 50 мкл кон'югату стрептавідин-пероксидази в усі лунки та інкубуйте 30 хвилин. Увімкніть мікропланшетний рідер і запустіть програму заздалегідь.
- Промийте мікропланшет як описано вище.
- Внесіть по 50 мкл хромогенного субстрату в усі лунки та інкубуйте 12 хвилин або до розвитку оптимального синього фарбування. Акуратно постукайте по краю мікропланшетів для

ретельного перемішування і видалить бульбашки повітря за допомогою наконечника для піпетки.

- Внесіть по 50 мкл стоп-розчину в усі лунки. Фарбування зміниться з блакитного на жовте.
- Зчитайте абсорбцію (ОП) за допомогою мікропланшетного рідера при довжині хвилі 450 нм **негайно**.

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

- Розрахуйте середнє значення поглинання (ОЦ) для кожного триплета стандартів і зразків.
- Для побудови калібрувальної кривої використовуйте напівлогарифмічний графічний папір, відкладаючи по осі ординат (Y) середнє значення ОЦ при 450 нм для кожного стандарту, а по осі абсцис (X) відповідні значення концентрацій стандартів. Оптимальна крива може бути отримана регресійним аналізом з використанням log-log або 4-параметричної логістичної апроксимації.
- Визначте концентрації в зразках з калібрувальної кривої і помножьте отримане значення на відповідний коефіцієнт розведення.

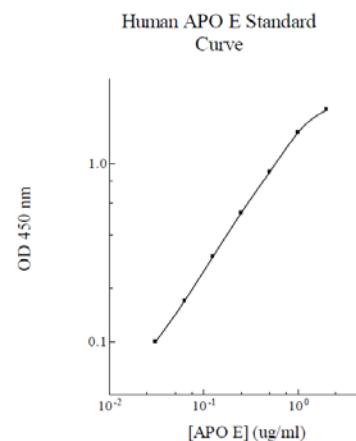
ТИПОВІ ДАНІ

- Типові дані надаються тільки для прикладу. Індивідуальні значення, отримані лабораторією, можуть відрізнятися від значень, вказаних нижче. Варіації можуть бути викликані відмінностями техніки проведення аналізу.

Standard Point	µg/ml	OD	Average OD
P1	2.0000	2.087	2.106
		2.126	
P2	1.0000	1.698	1.733
		1.768	
P3	0.5000	1.352	1.335
		1.319	
P4	0.2500	0.880	0.886
		0.892	
P5	0.1250	0.491	0.488
		0.475	
P6	0.0625	0.268	0.268
		0.268	
P7	0.0313	0.160	0.162
		0.163	
P8	0.0000	0.021	0.020
		0.020	
Sample: Pool Normal,		0.473	0.475
Sodium Citrate Plasma (400x)		0.478	

КАЛІБРУВАЛЬНА КРИВА

- Наведена нижче калібрувальна крива дана тільки в демонстраційних цілях. Калібрувальна крива повинна бути включена в кожну постановку.



РЕФЕРЕНСНЕ ЗНАЧЕННЯ

- Людська сироватка і плазма від здорових донорів були тестовані (n=40). В середньому рівень склав 48 мкг/мл.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- В наборі розрізняються ізоформи АроЕ-2, АроЕ -3, і АроЕ-4.
- Мінімальна обумовлена доза АроЕ за підрахунками 2SD від середнього нульового стандарту становить 0.03 мкг/мл.
- Точність Intra-аналізу була визначена шляхом тестування повторів трьох зразків плазми в одному аналізі.
- Точність між аналізами була визначена шляхом тестування трьох зразків плазми в двадцяти аналізах.

(Таблиці див. в оригіналі інструкції).

ПЕРЕХРЕСНА РЕАКТИВНІСТЬ

Види	Перехресна реактивність, %
Собаки (гонча)	Немає
Бичачий	Немає
Мавпи	< 5 %
Миші	Немає
Щура	Немає
Кролика	Немає
Свині	Немає
Людини	100%

Не спостерігалось істотної перехресної реактивності АроА-I, АроА-II, АроВ, АроС-I, АроС-II та АроС-III.

ПОШУК НЕСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Причини	Можливі дії
Низька точність	Використання прострочених компонентів	<ul style="list-style-type: none"> Перевірити термін придатності перед використанням. Не міняти компоненти з різних лотів.
	Неналажно проведена промивка	<ul style="list-style-type: none"> Переконайтеся, що використовується відповідний промивний буфер. Переконайтеся, що всі лунки сухі після аспірації. Переконайтеся, що мікропланшетний промивач правильно дозує. Якщо промивання проводиться піпеткою, перевірте правильність техніки піпетування.
	Розбрикування реагентів при завантаженні в лунки	<ul style="list-style-type: none"> Піпетувати правильно, контрольовано і ретельно.
	Не постійні обсяги, завантажені в лунки	<ul style="list-style-type: none"> Піпетувати правильно, контрольовано і ретельно. Перевірити калібрування піпетки. Перевірити піпетки щодо їх належного функціонування.
	Погане перемішування реагентів при розведенні	<ul style="list-style-type: none"> Ретельно перемішати ліофілізовані компоненти після відновлення. Ретельно перемішати розведення.
	Неправильно запечатаний мікропланшет	<ul style="list-style-type: none"> Перевірити пакування мікропланшета щодо належної герметизації. Переконайтеся, що мікропланшетна упаковка не має проколів. Переконайтеся, що три осушувачі знаходяться всередині мікропланшета перед упаковкою.
	Мікропланшет залишився без нагляду між кроками	<ul style="list-style-type: none"> Кожен крок процедури повинен бути виконаний без затримок.
Несподівано низька або висока інтенсивність сигналу	Пропущений крок	<ul style="list-style-type: none"> Переглянути процедуру щодо повного списку кроків.
	Кроки, що виконуються в неправильному порядку	<ul style="list-style-type: none"> Переглянути процедуру щодо правильного порядку.
	Недостатню кількість реагентів додано в лунки	<ul style="list-style-type: none"> Перевірте калібрування піпетки. Перевірити піпетки щодо їх належного функціонування.
	Крок промивки був пропущений	<ul style="list-style-type: none"> Переглянути процедуру щодо всіх стадій промивки.
	Неправильний промивний буфер	<ul style="list-style-type: none"> Переконайтеся, що відповідний промивний буфер використовується.
	Неправильна підготовка реагенту	<ul style="list-style-type: none"> Переглянути розділ про підготовку реагентів для правильних розведень всіх реагентів.
	Недостатні або надто довгі періоди інкубації	<ul style="list-style-type: none"> Переглянути процедуру щодо правильних часів інкубації.

Недостатня стандартна крива	Неоптимальне розведення зразка	<ul style="list-style-type: none"> Сендвіч ІФА: Якщо зразки генерують значення ОЩ вищі, ніж точка найвищого стандарту (P1), розвести зразки далі і повторити аналіз. Конкурентний ІФА: Якщо зразки генерують значення ОЩ нижчі, ніж точка найвищого стандарту (P1), розвести зразки далі і повторити аналіз. Користувач повинен визначити оптимальний коефіцієнт розбавлення для зразків.
	Забруднення реагентів	<ul style="list-style-type: none"> Новий наконечник повинен бути використаний для кожного додавання різних зразків або реагентів під час процедури аналізу.
	Вміст лунок випаровується	<ul style="list-style-type: none"> Переконайтеся, що ущільнювальна плівка щільно встала на місце перед постановкою аналізу в інкубаторі або при кімнатній температурі.
	Неправильне піпетування	<ul style="list-style-type: none"> Проводити піпетування коректно. Перевірити калібрування піпетки. Перевірити піпетки щодо їх належного функціонування.
	Погане перемішування розведень реагентів	<ul style="list-style-type: none"> Ретельно перемішувати ліофілізовані компоненти після відновлення. Ретельно перемішайте розведення.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com