

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ПЕПТИДУ КОПЕПТИНУ

EIA-COP, EIAM-COP, EIAR-COP, Human/Mouse/Rat Copeptin EIA

Кат. № : **EIA-COP**

Методика від **07-08-2017**

Кількість : **96**

Виробник : **RayBiotech, Inc. (США)**



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

I. ВСТУП

Копептин являє собою 39-амінокислотний пептид, який виробляється головним чином у паравентрикулярних нейронах гіпоталамуса та в суперпараметричному ядрі. Він відокремлений від білка, що складається з вазопресину і нейрофізину II. Копептин може допомогти розгортанню вазопресину під час транспортування. Вазопресин має пряму антидіуретичну дію на нирки, а також викликає вазоконстрикцію периферичних судин.

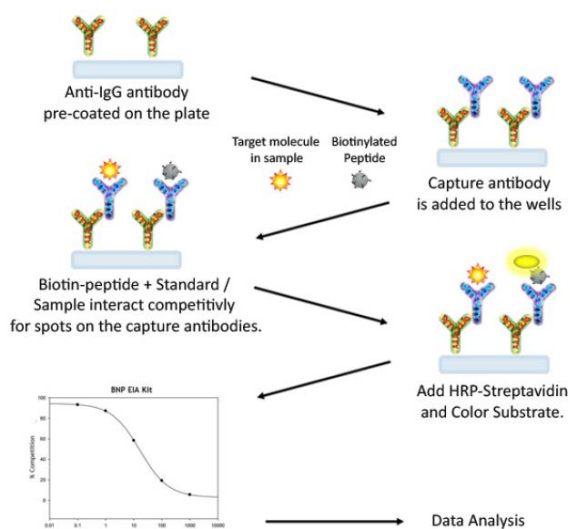
Копептин може використовуватися як сурогат вазопресину в клінічних випробуваннях. Клінічний інтерес до тестування Копептину тісно пов'язаний з патофізіологічними шляхами, де задіяний вазопресин, такими як синдром полідипсії-поліурії, гіпонатріємія, синдром невідповідної антидіуретичної гормональної секреції (SIADH), а також серцева недостатність та гострий коронарний синдром.

II. ЗАГАЛЬНИЙ ОПИС

Набір RayBio® Copeptin EIA є імуоферментним аналізом для кількісного виявлення пептиду Копептину, заснований на принципі конкурентного ферментного імуоаналізу.

У цьому аналізі, біотинильований пептид Копептину вводиться в зразки і стандарти. Зразки та стандарти потім додаються на планшет, де біотинильований пептид Копептину конкурує з ендегенним (неміченим) Копептином за зв'язування з антитілом анти-Копептину. Після стадії промивки, будь-який пов'язаний біотинильований Копептин потім взаємодіє з пероксидазою хрому (HRP)-стрептавідином, який каталізує реакцію розвитку кольору. Інтенсивність колориметричного сигналу прямо пропорційна кількості захопленого біотинильованого пептиду Копептину і обернено пропорційна кількості ендегенного Копептину в стандарті або зразках. Стандартна крива з відомою концентрацією пептиду Копептину може бути побудована і концентрація Копептину пептиду в зразках може бути відповідно розрахована.

III. ЯК ЦЕ ПРАЦЮЄ



IV. ЗБЕРІГАННЯ

Весь набір може зберігатися до 6 місяців при -20 - -80 °C від дати відвантаження. Для тривалого зберігання, рекомендується зберігати при температурі -80 °C. **Уникнути повторних циклів заморожування-**

відтавання. Щодо зберігання приготованих реагентів див. таблицю нижче.

V. РЕАГЕНТ

Компонент	Розмір/Опис	Зберігання/Стабільність після підготовки
Мікропланшет Копептину (Елемент А)	96 лунок (12 смужок x 8 лунок), покриті вторинним антитілом	1 місяць при 4 °C*
Концентрат промивного буфера (20X) (Елемент В)	25 мл 20X концентрованого розчину	1 місяць при 4 °C
Стандарт Пептиду Копептину (Елемент С)	2 флакона Пептиду Копептину. 1 флакона достатньо для запуску кожного стандарту у двох примірниках	Перший стандарт: 2-3 дні при 4 °C Додаткові розведення: не зберігати
Поліклональне антитіло анти-Копептину (Елемент N)	2 флакона анти-Копептину	1 місяць при 4 °C
5X Розчинник для Аналізу В (Елемент Е)	15 мл 5X концентрованого буфера. Розчинник для обох, стандартів і зразків, в тому числі сироватки, плазми, культивованого середовища клітин або інших типів зразків	1 місяць при 4 °C
Біотинильований Пептид Копептину (Елемент F)	2 флакони Біотинильованого Пептиду Копептину, 1 флакона достатньо для аналізу всієї пластини	2-3 дні при 4 °C
Концентрат HRP-стрептавідину (Елемент G)	600 мкл 1000X концентрованого HRP-кон'югованого стрептавідину	Не зберігати та не використовувати повторно
Позитивний Контроль (Елемент М)	1 флакон Позитивного Контролю	2-3 дні при 4 °C
Реагент однокрокового субстрату ТМВ (Елемент Н)	12 мл 3,3',5'-тетраметилбензидину (ТМВ) в буферному розчині	N/A
Стоп-розчин (Елемент І)	8 мл 0.2 М сірчаної кислоти	N/A

*Повернути невикористані лунки в пакет, що містить осушувач, запечатати уздовж всієї кромки.

VI. НЕОБХІДНІ ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ

1. Мікропланшетний рідер, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм.
2. Точні піпетки об'ємом від 2 мкл до 1 мл.
3. Регульовані піпетки об'ємом 1-25 мл для приготування реагентів.
4. 100 мл і 1 л градуйовані циліндри.
5. Фільтрувальний папір.
6. Дистильована або деіонізована вода.
7. Програмне забезпечення SigmaPlot (або інше програмне забезпечення, яке може виконувати 4-параметрові логістичні регресивні моделі).
8. Пробірки для підготовки розведення стандарту або зразка.
9. Орбітальний шейкер.
10. Алюмінієва фольга.
11. Пластикова обгортка.

VII. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Тримайте реагенти на льоду під час кроків підготовки реагентів.

A. Підготовка Планшета і Антитіла Анти-Копептину

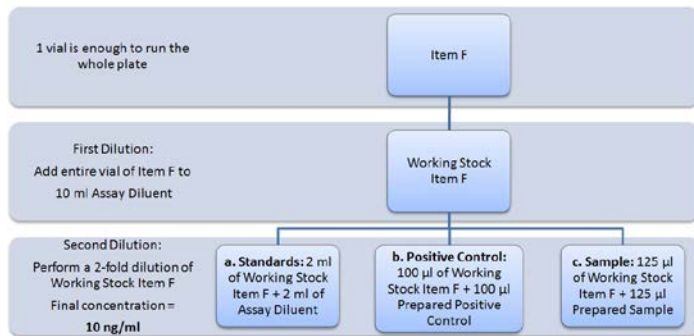
1. Привести планшет до кімнатної температури перед відкриттям запечатаного пакета.
2. Позначити 8-лункові смужки відповідно для проведення аналізу.
3. Розчинник для Зразків В (Елемент Е) слід розбавити в 5 раз деіонізованою або дистильованою водою.
4. Швидко центрифугувати флакон з антитілами анти-Копептину (Елемент N). Додати 50 мкл 1X Розчинника для Зразків В у флакон для приготування концентрату антитіла. Піпетувати вниз/вверх, щоб акуратно перемішати.
5. Концентрат антитіла повинен бути розведений в 100 разів 1X Розчинником для Зразків В. Це і буде робочий розчин антитіла анти-

Копептину, який буде бути використаний на стадії 2 Процедури Аналізу (Розділ VIII).

Примітка: Наступні кроки можуть бути проведені під час процедури інкубації антитіла (крок 2 Процедури Аналізу).

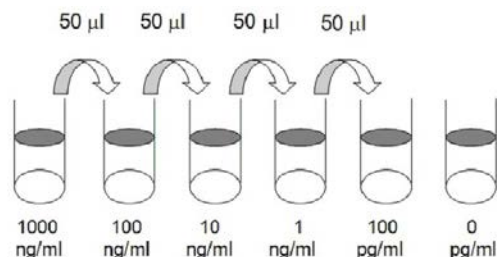
B. Підготовка Біотинильованого Копептину (Елемент F)

- Коротко центрифугувати флакон біотинильованого Копептину (Елемент F) перед використанням.
- Див. зображення нижче для правильного приготування Елемента F. Перемістити весь вміст флакона з Елементом F в пробірку, що містить 10 мл 1X Розчинника для Зразків В. Це Робочий Розчин Елемента F. Піпетувати вгору/вниз, щоб акуратно перемішати.
Кінцева концентрація біотинильованого Копептину буде **20 нг/мл**.
 - Друге Розведення Елемента F для Стандартів: Додати 2 мл Робочого Розчину Елемента F до 2 мл 1X Розчинника для Аналізів В. Кінцева концентрація біотинильованого Копептину буде **10 нг/мл**.
 - Друге Розведення Елемента F для Позитивного Контролю: Додати 100 мкл Робочого Розчину Елемента F до 100 мкл підготовленого Позитивного Контролю (Елемент М). (Див. Розділ D для підготовки Позитивного Контролю). Кінцева концентрація біотинильованого Копептину буде **10 нг/мл**.
 - Друге Розведення Елемента F для зразків: Додати 125 мкл Робочого Розчину Елемента F до 125 мкл підготовленого зразка (див. розділ E для підготовки зразка). Це розведення в 2 рази вашого зразка. Кінцева концентрація біотинильованого Копептину буде **10 нг/мл**.



C. Підготовка стандартів

- Помітити 6 мікропробірок з наступними концентраціями: 1000 нг/мл, 100 нг/мл, 10 нг/мл, 1 нг/мл, 100 пг/мл і 0 пг/мл. Піпетувати 450 мкл робочого розчину біотинильованого Копептину (отриманого на етапі 7а) в пробірку 1000 нг/мл. Ретельно перемішати. Цей розчин служить як перший стандарт (1000 нг/мл стандарту Копептину, 10 нг/мл біотинильованого Копептину).
- Для приготування стандарту 100 нг/мл, піпетувати 50 мкл 1000 нг/мл стандарту Копептину в пробірку 100 нг/мл. Ретельно перемішати.
- Повторити цей крок з кожною наступною концентрацією, з підготовкою серії розведень, як показано на малюнку нижче. Кожен раз використовуйте 450 мкл біотинильованого Копептину і 50 мкл попередньої концентрації аж до отримання 100 пг/мл. Змішайте кожную пробірку ретельно перед наступним внесенням.



D. Підготовка Позитивного контролю

- Коротко центрифугувати флакон Позитивного Контролю (Елемент М).
- Зверніться до кроку 7b. Це розведення в 2 рази Позитивного Контролю. Кінцева концентрація біотинильованого Копептину повинна бути 10 нг/мл.

Позитивний контроль є зразком середовища культури клітин, який служить контролем системи щоб переконатися, що компоненти набору працюють. Отримана ОЩ не використовуватиметься в будь-яких розрахунках; якщо не спостерігаються позитивні результати, будь ласка, зв'яжіться з відділом технічної підтримки RayBiotech. Позитивний контроль може бути розведений ще більше, якщо необхідно, але переконайтеся, що кінцева концентрація біотинильованого Копептину 10 нг/мл.

E. Підготовка зразків

- Якщо Ви хочете провести 2-кратне розбавлення вашого зразка, перейдіть до кроку 7c. Якщо Ви хочете провести вище розбавлення вашого зразка, розбавити зразок з 1X Розчинником для Аналізу В перед виконанням кроку 7c.
ПРИКЛАД (зробити 4-кратне розведення зразка):
 - Розвести зразок в 2 рази (62.5 мкл зразка + 62.5 мкл 1X Розчинника для Зразків В).
 - Виконати крок 7c (125 мкл робочого розчину Елемента F + 125 мкл зразка, отриманого вище).

Загальний обсяг становить 250 мкл, достатньо для лунок в дублях на мікропланшеті.

Дуже важливо переконатися, що кінцева концентрація біотинильованого Копептину **10 нг/мл**.

Примітка: Оптимальні коефіцієнти розведення зразка повинні бути визначені емпірично, але ви можете вказати нижче для рекомендованих факторів розведення для сироватки: Людина = 2x Миша = 8x Rat = 8x.

Однак ви може звернутися до служби технічної підтримки (888-494-8555; techsupport@raybiotech.com) для отримання рекомендованих факторів розведення сироватки.

F. Приготування Промивного Буфера і HRP

- Якщо Елемент В (20X Промивний Концентрат) містить видимі кристали, нагріти до кімнатної температура і акуратно перемішати до повного розчинення.
- Розвести 20 мл Концентрат Промивного Буфера деіонізованою або дистильованою водою, щоб отримати 400 мл 1X Промивного Буфера.
- Коротко центрифугувати HRP-стрептавідин (Елемент G) перед використанням.
- Розвести концентрат HRP-стрептавідину в 1000 разів з 1X Розчинником для Аналізу В.

VIII. ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

- Тримайте реагенти на льоду під час кроків підготовки реагентів. Рекоменується, щоб всі стандарти і зразки були проаналізовані, щонайменше, в дублях.
- Додати 100 мкл Антитіл анти-Копептину (Елемент N) (див. Підготовка реагентів крок 5) в кожную лунку. Інкубувати протягом 1.5 годин при кімнатній температурі при обережному струшуванні (1-2 цикли/секунду). Також можна інкубувати протягом ночі при 4 °C.
- Видалити розчин і промити 4 рази з 1X Буфером Промивного Розчину (200-300 мкл кожен). Промивку проводити з використанням багатоканальної піпетки або автоматизованого промивного пристрою. Повне видалення рідини на кожній стадії є необхідною умовою хорошої роботи. Після останньої промивки видалити залишки Промивного Буфера шляхом аспірації або декантації. Перевернути планшет і промокнути чистими паперовими рушниками.
- Додати 100 мкл кожного стандарту (див. Підготовка реагентів Розділ C), Позитивного Контролю (див. Підготовка реагентів Розділ D) і зразка (див. Підготовка реагентів Розділ E) у відповідні лунки. Включити лунку Бланка (тільки Розчинник для Аналізу). Накрити лунки і інкубувати протягом 2.5 годин при кімнатній температурі з обережним струшуванням (1-2 цикли/секунду). Також можна інкубувати протягом ночі при 4 °C.
- Видалити розчин і промити 4 рази як в Кроці 3.
- Додати 100 мкл приготованого Розчину Стрептавідину (див. Підготовка Реагентів крок 18) у кожную лунку. Інкубувати протягом 45 хвилин при кімнатній температурі з обережним струшуванням. Рекоменується, щоб час інкубації не був коротший або довший ніж 45 хвилин.

7. Видалити розчин і промити 4 рази як в Кроці 3.
8. Додати 100 мкл реагенту однокрокового Субстрату ТМБ (Елемент Н) в кожну лунку. Витримати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі в темряві з легким струшуванням (1-2 цикли/секунду).
9. Додати 50 мкл стоп-розчину (Елемент І) у кожну лунку. Зчитати результат при 450 нм негайно.

ІХ. СУМАРНА ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

1. Підготувати всі реагенти, зразки і стандарти відповідно до інструкцій.
2. Додати 100 мкл анти-Копептину в кожну лунку. Інкубувати 1.5 години при кімнатній температурі або протягом ночі при 4 °С.
3. Додати 100 мкл стандарту або зразка в кожну лунку. Витримати 2.5 години при кімнатній температурі або протягом ночі при 4 °С.
4. Додати 100 мкл приготованого розчину Стрептавідину. Інкубувати 45 хвилин при кімнатній температурі.
5. Додати 100 мкл однокрокового Реагенту субстрату ТМБ в кожну лунку. Інкубувати 30 хвилин при кімнатній температурі.
6. Додати 50 мкл Стоп Розчину в кожну лунку. Зчитати результат при 450 нм негайно.

Х. ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Розрахувати середню абсорбцію для кожного набору дублікатів стандартів, контролів і зразків, і відняти середню оптичну щільність нульового стандарту. Побудувати Стандартну криву використовуючи SigmaPlot (або інше програмне забезпечення, яке може виконувати 4-параметрові логістичні регресивні моделі), зі стандартною концентрацією на осі x і абсорбцією на осі y. Намалювати найбільш підходящу пряму лінію через стандартні точки.

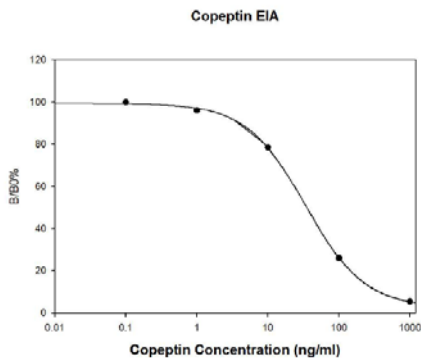
Відсоток поглинання = $(B - \text{ОЩ бланка}) / (B_0 - \text{ОЩ бланка})$, де

B = ОЩ зразка або стандарту і

B₀ = ОЩ нульового стандарту (загальне зв'язування)

А. ТИПОВІ ДАНІ

Ці стандартні криві призначені тільки для демонстрації. Стандартна крива повинна бути побудована для кожного аналізу.



В. ЧУТЛИВІСТЬ

Мінімальні концентрації Копептину, які визначаються, становлять 0.75 нг/мл.

С. Діапазон виявлення

0.1-1,000 нг/мл

Д. Відтворюваність

Intra-аналіз: CV < 10%

Інтер-аналіз: CV < 15%

Е. Схема Аналізу

Рекомендоване розташування на пластині:

Blank	Blank	SA1	SA1	SA9	SA9	SA17	SA17	SA25	SA25	SA33	SA33
Total Binding	Total Binding	SA2	SA2	SA10	SA10	SA18	SA18	SA26	SA26	SA34	SA34
Standard1	Standard1	SA3	SA3	SA11	SA11	SA19	SA19	SA27	SA27	SA35	SA35
Standard2	Standard2	SA4	SA4	SA12	SA12	SA20	SA20	SA28	SA28	SA36	SA36
Standard3	Standard3	SA5	SA5	SA13	SA13	SA21	SA21	SA29	SA29	SA37	SA37
Standard4	Standard4	SA6	SA6	SA14	SA14	SA22	SA22	SA30	SA30	SA38	SA38
Standard5	Standard5	SA7	SA7	SA15	SA15	SA23	SA23	SA31	SA31	SA39	SA39
Pos Control	Pos Control	SA8	SA8	SA16	SA16	SA24	SA24	SA32	SA32	SA40	SA40

Ключ:

Бланк = тільки Буфер

Загальне Зв'язування = Тільки Біотин-Копептин

Стандарт 1 = 1000 нг/мл

Стандарт 2 = 100 нг/мл

Стандарт 3 = 10 нг/мл

Стандарт 4 = 1 нг/мл

Стандарт 5 = 100 пг/мл

Позитивний Контроль = Біотин з Елементом М

ХІ. СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Цей набір призначений для виявлення Копептину людини, мишей і щурів і пропептиду Вазопресин-Нейрофізин 2-Копептин.

ХІІІ. МОЖЛИВІ НЕСПРАВНОСТІ ТА ЇХ УСУНЕННЯ

Проблема	Причина	Усунення
Погана стандартна крива	<ul style="list-style-type: none"> • Неакуратне піпетування • Неадекватне розведення стандарту 	<ul style="list-style-type: none"> • Перевірити піпетки • Переконайтеся, що Ви покрутили пробірку з елементом С і ретельно розчинили порошок обережним перемішуванням
Слабкий сигнал	<ul style="list-style-type: none"> • Занадто короткий час інкубації • Неадекватні обсяги реагентів або неправильне розведення 	<ul style="list-style-type: none"> • Переконайтеся, що Ви покрутили пробірку з елементом С і ретельно розчинили порошок обережним перемішуванням • Переконайтеся в достатньому часі інкубації; крок 2 процедури аналізу поміняти на інкубацію протягом ночі • Перевірте піпетки і переконайтеся в належній підготовці
Високий CV	<ul style="list-style-type: none"> • Неакуратне піпетування 	<ul style="list-style-type: none"> • Перевірте піпетки
Завищений задній фон	<ul style="list-style-type: none"> • Планшет погано промитий • Забруднений промивний буфер 	<ul style="list-style-type: none"> • Перевірити інструкції щодо належного промивання Якщо використовується промивний пристрій, перевірте, чи всі порти доступні • Приготуйте свіжий промивний буфер
Низька чутливість	<ul style="list-style-type: none"> • Неналежне зберігання набору • Стоп розчин 	<ul style="list-style-type: none"> • Зберігати стандарт при < -70 °С після відновлення, решту при 4 °С. Зберігати розчин субстрату захищеним від світла • Стоп розчин повинен бути доданий в кожну лунку перед аналізом



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

