

ЗАГАЛЬНИЙ ПРОТОКОЛ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ФЕРМЕНТНОГО ІМУНОАНАЛІЗУ (діапазон: 0-100 нг/мл)

ЕК-057-23, General Protocol

Каталог. №: **ЕК-057-23**

Кількість : **96**

Виробник : **Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (США)**



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

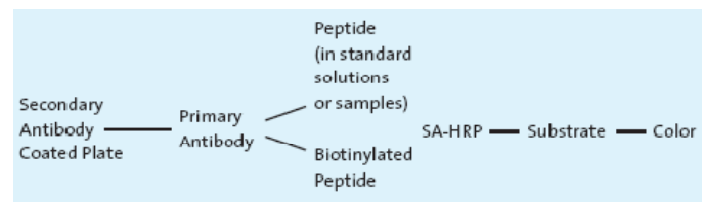
**УВАГА: пристрій для досліджень
Тільки для дослідницького використання
Не для використання в діагностичних процедурах**

ВСТУП

Даний набір призначений для виявлення конкретного пептиду та пептидів, пов'язаних з ним, і заснований на принципі "Конкурентного" імуноферментного аналізу.

ПРИНЦИП ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Імунопланшет в цьому наборі попередньо покритий вторинними антитілами і неспецифічні сайти зв'язування заблоковані. Вторинні антитіла можуть зв'язуватися з Fc-фрагментом первинного антитіла (пептиду), Fab-фрагмент якого буде конкурентно зв'язаний як біотинильованим пептидом, так і стандартом пептиду або цільового пептиду в зразках. Біотинильований пептид взаємодіє зі стрептавідин-пероксидазою хрому (SA-HRP), який каталізує розчин субстрату. Інтенсивність жовтого забарвлення прямо пропорційна кількості комплексу біотинильованого пептиду-SA-HRP, але обернено пропорційна кількості пептиду в розчинах стандарту або зразків. Це пов'язано з конкурентним зв'язуванням біотинильованого пептиду з пептидом стандарту або зразків з пептидом антитіла (первинного антитіла). Стандартна крива з відомою концентрацією може бути побудована відповідним чином. Невідомі концентрації в зразках можуть бути визначені шляхом екстраполяції на цій стандартній кривій.



МАТЕРІАЛИ НАБОРУ

- 20x Концентрат буфера для аналізу (50 мл)
- 96-лунковий Імунопланшет (1)
- Ацетатна плівка для заклеювання планшетів (APS), (3 шт.)
- Первинне антитіло (кролячий анти- пептид IgG) (1 флакон)
- Стандарт пептиду (1 флакон)
- Біотинильований пептид (1 флакон)
- Стрептавідин-пероксидаза хрому (SA-HRP) (30 мкл)
- Позитивний контроль (2 флакона)
- Розчин субстрату (TMB) (12 мл)
- 2 N HCl (15 мл)
- Діаграма аналізу (1 аркуш)
- Загальний протокол (1 брошура)

Примітка: Phoenix Pharmaceuticals, Inc. гарантує, що її продукція відповідає інформації, що міститься в цій публікації. Покупець повинен визначити придатність продукту для своїх конкретних потреб і встановити оптимальну концентрацію зразка.

НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ВХОДЯТЬ ДО НАБОРУ

- Планшетний фотометр, здатний вимірювати оптичну щільність 450 нм
- Орбітальний шейкер зі швидкістю 300-400 об/хв. (рекомендовано)
- Мікропланшетний вошер (рекомендовано)

- Багатоканалні піпетки з дозуванням 50-100 мкл (рекомендовано)
- Резервуар для розчинів (рекомендовано)
- Абсорбуючий матеріал для промокання
- Пробірки для забору крові (EDTA Лаванда) (опційно)
- Апротинін (0.6ТІУ/мл крові) (опційно)
- Буфер А (опційно)
- Буфер В (опційно)
- C18 SEP-КОЛОНКА (опційно)

Примітка: Набір необхідно привести до кімнатної температури (20-23 °C) перед відкриттям будь-яких флаконів і початком аналізу. Настійно рекомендується, щоб розчини були використані як можна швидше після регідратації. Рекомендований протокол забору крові наведено на стор 9. Кожен набір містить достатню кількість реагентів на 96 лунок і придатний для аналізу 40 дублікатів зразків.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

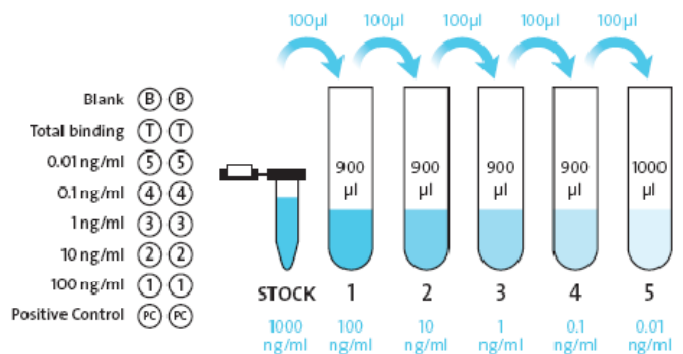
- Уважно прочитати цей протокол перед виконанням аналізу. Будь ласка, дозволяйте всім компонентам набору досягти кімнатної температури перед використанням (25-45 хвилин).
- Розвести Концентрат 20x буфера для аналізу з 950 мл дистильованої води. Це і буде Розчин 1x буфера для аналізу, який використовується для розведення або відновлення всіх інших реагентів в цьому наборі і зразків.

Примітка: Якщо кристали з'являються в 20X Буфері для аналізу, буфер можна помістити на теплу водяну баню на ~30 хвилин або до тих пір, поки кристали більше не є видимими. Ретельно перемішати перед використанням.

- Центрифугувати і розвести стандарт пептиду з 1 мл 1x Буфера для аналізу, перемішати. Концентрація цього розчину становить 1000 нг/мл. Залишити розчин на 10 хвилин при кімнатній температурі (20-23 °C) для повного розчинення. Перемішати і центрифугувати безпосередньо перед використанням.

Приготувати розчини Стандарту пептиду як вказано нижче:

№ Стандарту	Об'єм Стандарту	1X Робочий буфер, мкл	Концентрації, нг/мл
Вихідний	1000 мкл	----	1,000
1	100 мкл від вихідного	900 мкл	100
2	100 мкл від №1	900 мкл	10
3	100 мкл від №2	900 мкл	1
4	100 мкл від №3	900 мкл	0.1
5	100 мкл від №4	900 мкл	0.01



- Відновити первинне антитіло з 5 мл 1x Буфера для аналізу. Залишити мінімум на 5 хвилин до повного розчинення. Ретельно перемішати.
- Відновити біотинильований пептид з 5 мл 1x Буфера для аналізу. Залишити мінімум на 5 хвилин до повного розчинення. Ретельно перемішати.
- Центрифугувати і регідрувати позитивний контроль з 200 мкл 1x Буфера для аналізу. Залишити мінімум на 5 хвилин до повного розчинення. Ретельно перемішати.
- Залишити лунки А-1 і А-2 порожніми в якості **Бланку**.
- Додати 50 мкл 1x Буфера для аналізу в лунки В-1 і В-2 в якості Загального зв'язування.
- Додати 50 мкл підготовлених стандартів пептиду з лунок **№5** до **№1** (у порядку, зворотному до серійних розведень) в лунки від С-1 і С-2 до G-1 і G-2, відповідно.

Примітка: Стандарти пептиду повинні бути проаналізовані в дублікатах.

- Додати 50 мкл регідратованого позитивного контролю в лунки Н-1 і Н-2.

Примітка: Позитивні контролю слід аналізувати у двох примірниках. Додати 50 мкл підготовлених проб у призначені для них лунки у двох примірниках.

12. Додати 25 мкл регідратованих первинних антитіл в кожну лунку **крім Бланка**.
13. Додати 25 мкл регідратованих біотинильованих пептидів в кожну лунку **крім Бланка**.

Примітка: Багатоканальні піпетки HE рекомендуються для завантаження біотинильованого пептиду або первинного антитіла.

14. Заклеїти Імуноплашет з використанням APS. Інкубувати Імуноплашет протягом 2 годин при кімнатній температурі (20-23 °C). Рекомендується струшування на орбітальному шейкері при 300-400 об/хв. протягом усього терміну інкубації.
15. Центрифугувати флакон SA-HRP (3.000-5.000 об/хв., 5 секунд) і піпетувати 12 мкл SA-HRP в 12 мл 1x Буферу для аналізу, щоб приготувати розчин SA-HRP, ретельно перемішати.
16. Зняти APS з планшета. Видалити вміст лунок.
17. Вимити кожну лунку з 350 мкл 1x Буферу для аналізу, видалити цей буфер, перевернути і висушити планшет . Повторити 4 рази.
18. Додати 100 мкл Розчину SA-HRP в кожну лунку.
19. Знову накрити планшет з APS. Інкубувати протягом 1 години при кімнатній температурі (20-23 °C). Рекомендується струшування на орбітальному шейкері при 300-400 об/хв. протягом усього терміну інкубації.
20. Зняти APS з планшета.
21. Вимити і висушити планшет 4 рази з використанням 1x Буфера для аналізу, як описано вище у пункті 17.
22. Додати 100 мкл розчину субстрату ТМБ в кожну лунку. Рекомендується струшування на орбітальному шейкері при 300-400 об/хв. протягом усього терміну інкубації. Після додавання розчину ТМБ рекомендується покрити планшет для захисту від світла.
23. Знову накрити планшет з APS. Інкубувати протягом 1 години при кімнатній температурі (20-23 °C).
24. Зняти APS з планшета. Додати 100 мкл 2N HCl в кожну лунку для зупинки реакції. Колір в лунці повинен змінитися з блакитного на жовтий. Якщо зміна кольору не є однорідною, обережно постукайте по пластині, щоб забезпечити ретельне перемішування. Переходьте до наступного кроку на протязі 20 хвилин.
25. Завантажити планшет на зчитувальний пристрій. Зчитати абсорбцію O.D. при **450 нм**.

ДОДАТКОВІ ЗАУВАЖЕННЯ ПО ПРОЦЕДУРІ:

- Реагенти з різних серій не повинні використовуватись.
- Перевірте етикетки реагентів при завантаженні на планшет, і переконайтесь, що все внесено вірно.
- Невикористані смужки повинні бути поміщені назад в пакет з фольги з осушувачем і зберігатись при температурі 4 °C. Не допускайте попадання вологи в лунки.
- При роботі з пластиною не торкайтесь до її дна.
- Ручне промивання може призвести до високих коефіцієнтів варіації дублікатів. Щоб зменшити цей фактор, рідина з пластини повинна бути вилучена шляхом інвертування і висушування пластини за допомогою абсорбуючого матеріалу.
- Якщо температура в приміщенні не знаходиться в межах запропонованого діапазону (20-23 °C), можуть статися зміни в результатах.
- Той самий резервуар для реагентів можна використовувати повторно, якщо резервуар добре промити дистильованою водою перед кожним використанням.
- Кожна лабораторія повинна визначити відповідні коефіцієнти розбавлення для зразків, які аналізуються, для того, щоб впевнитись, що зразки знаходяться в межах динамічного діапазону стандартної кривої.
- Високі рівні інтерферуючих білків можуть призвести до розбіжностей результатів зразка; тому вкрай важливо вибрати відповідну процедуру підготовки зразків для отримання оптимальних результатів.
- Кожного разу, коли новий наконечник використовується, переконайтесь, що він надійно збережений і без повітряних бульбашок. Для кращих результатів варіації всередині аналізу, аспірувати і повернути реагенту або зразок назад в контейнер кілька разів перед завантаженням.
- Унікати занурення всього наконечника в реагенти, тому що краплі можуть накопичуватися на кінці наконечника, що викликає надлишок реагенту, який завантажується в лунку. Це може призвести до поганих результатів.
- Для отримання оптимальних результатів рекомендується використання орбітального шейкера зі швидкістю 300-400 об/хвилину для всіх інкубацій.
- Зміна існуючого протоколу (тобто розведень стандарту, техніки піпетування, техніки промивки, часу інкубації і температури, умов зберігання і придатності набору) може впливати на чутливість і специфічність тесту.

ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Побудуйте стандартну криву на напівлогарифмічному міліметровому папері. Відкласти відомі концентрації стандарту пептиду на логарифмічній шкалі (вісь x), і відповідні значення OD на лінійній шкалі (Y-вісь). Рекомендується використовувати програмне забезпечення 4-параметричної логістики або log-logit для кількісної оцінки концентрації стандарту пептиду. Стандартна крива показує зворотну залежність між концентраціями пептиду і відповідним поглинанням. При збільшенні концентрації стандарту концентрація жовтого кольору зменшується, і зменшується абсорбція. Концентрація пептиду у зразку визначається шляхом відкладання OD зразка на Y-осі, потім будується горизонтальна лінія до перетину з калібрувальною кривою. Вертикальна лінія, проведена з цієї точки, перетинає вісь X в точці з координатою відповідної концентрації пептиду у зразку. Якщо зразки були розбавлені до аналізу, виміряна концентрація повинна бути помножена на відповідний коефіцієнт розведення.

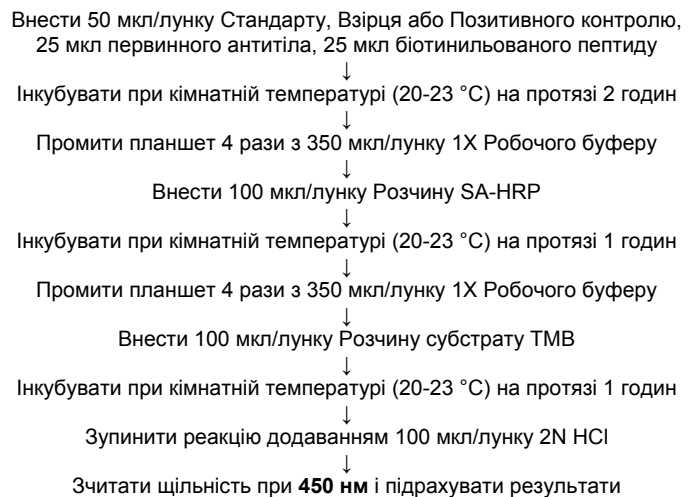
Стандартна крива буде зворотної сигмоїдальної форми.

Дивись лист даних контролю якості, щоб отримати допустимі значення позитивного контролю.

ЗБЕРІГАННЯ

1. Зберігати при температурі 4 °C після отримання.
2. Рекомендується використати розчини як можна швидше після регідратації.
3. Зберігати 1x Буфер для аналізу при 4 °C.
4. Смужки, які не використовуються, зберігати при температурі 4 °C.
5. Зберігати регідратований розчин Стандарту, біотинильований пептид, Антитіло і SA-HRP при 4 °C.

СУМАРНА ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ



РЕКОМЕНДОВАНИЙ МЕТОД ЕКСТРАКЦІЇ ПЕПТИДІВ З ПЛАЗМИ

Забір крові:

Провести забір крові з використанням VT-640, які містять ЕДТК, і можуть вмістити до 7 мл крові. Обережно потрусити пробірки декілька разів одразу після забору крові для анти коагуляції. Перемістити кров з пробірок VT-6450 в пробірки для центрифугування, які містять Апротинін (0.6 ТОд/мл крові), і обережно потрусити декілька разів, щоб загальмувати активність протеїнази. Центрифугувати кров при 1,600хг на протязі 15 хвилин при 4 °C і отримати плазму. Плазма, яка зберігається при -70 °C, залишається стабільною до 1 місяця. Якщо пробірки VT-640 є придатними для центрифугування, Апротинін може бути доданий на стадії забору крові.

Екстракція пептидів з плазми:

1. Підкислити плазму такою ж кількістю Буферу А. наприклад, якщо ви використовуєте 1 мл плазми, то додайте 1 мл Буферу А. Перемішати та центрифугувати при 6,000 – 17,000хг на протязі 20 хвилин при 4 °C.
 2. Врівноважити SEP-COLUMN, який містить 200 мг C18, за допомогою промивання з Буфером В (1 мл, один раз), та Буфером А (3 мл, 3 рази).
- Примітка: кроки 3-5, не застосовувати силу при роботі з колоною.*
3. Завантажити розчин підкисленої плазми на попередньо врівноважену C-18 SEP-колоною.
 4. Повільно промити колоною з використанням Буферу А (3 мл, 2 рази) та видалити промивний розчин.

5. Повільно елювати пептид з буфером В (3 мл, один раз) та зібрати елюент в полістиролову пробірку.
6. Випарувати елюент до сухої речовини в центрифужному концентраторі або іншим підходящим методом.
7. Зберігати сухий екстракт при -20 °С та провести аналіз якомога швидше. Використати 1x Робочий буфер для відтворення сухого екстракту. Якщо значення пептиду знаходиться поза межами діапазону визначення, розбавити або концентрувати збірець відповідно.

Зауваження по процедурі екстракції з плазми:

При використанні C-18 SEP-COLUMN перший раз, скористайтеся нагнітальним балоном (не постачається) для подачі тиску в колону після внесення 1 мл Буферу В для полегшення потоку через колону. В кроках 3-5 не застосовувати тиск. Певніться, що потік є постійним для всіх розчинів під час екстракції. Не допускати утворення повітряних бульбашок в матриці C-18 для оптимальної роботи з збірцем та його відновлення.

Висушування збірця після екстракції:

Комбінація центрифужного концентратора (наприклад, Speedvac) та ліофілізатора призводить до отримання найкращих результатів висушування збірця після екстракції. Спочатку використайте Speedvac для висушування збірця на протязі приблизно 15 хвилин для усування органічного шару. Провести «шокове» заморожування залишку збірця, висушити заморожуванням на протязі доби з використанням ліофілізатора. Двокрокова процедура призводить до отримання більш стійкої пудри, яку легше зволожити, ніж збірець, висушений тільки за допомогою центрифужного концентратора. Тим не менше, якщо центрифужний концентратор не є доступним, заморожування на протязі доби з використанням ліофілізатора є прийнятним.



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