



НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ L-FABP МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Набор для количественного определения жирного кислотно-связывающего белка печени в образцах сыворотки, плазмы, мочи и супернатанта культуры клеток человека

Кат. № : HK404
 Производитель : Hycultbiotech (Нидерланды)

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

Методика от 06-2009

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА Человеческого L-FABP предназначен для использования в in-Vitro диагностике для количественного определения L-FABP в сыворотке, плазме, моче и в клеточной культуре супернатанта человеческих образцов. 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

Жирные кислотно-связывающие белки (FABP) представляют собой класс цитоплазматических белков, которые связываются длинной цепью жирных кислот. FABP представляют собой мелкие внутриклеточные белки (~13-14 кДа) с высокой степенью тканевой специфичности. Они в большом количестве присутствуют в различных типах клеток и играют важную роль во внутриклеточной утилизации жирных кислот, их транспортировке и метаболизме. Существует, по крайней мере, девять различных типов FABP, каждый из которых демонстрирует определенный характер тканевого выражения. Благодаря своим небольшим размерам, FABP быстро удаляются из ишемически поврежденных отмерших клеток, что приводит к росту уровня сыворотки крови. Ишемически поврежденные ткани характеризуются гистологическим отсутствием (или низким присутствием) FABP, облегчая выявление таких областей.

Жирные кислотно-связывающие белки печени (L-FABP, FABP1) преимущественно экспрессируются в печени. Белки L-FABP получают из человеческого гена FABP1. L-FABP является чувствительным маркером поврежденных клеток печени in-Vitro и in-vivo. L-FABP также является маркером для быстрого лизиса печеночных клеток in-Vitro (как, например, в токсикологических анализах) и для обнаружения повреждения печени во время и после трансплантации.

Сыворотка/плазма и моча здоровых людей содержит около 12 нг/мл и 16 нг/мл L-FABP, соответственно.

3. ОСОБЕННОСТИ НАБОРА

- Время работы от 3 1/2 часа.
- Минимальная концентрация, которая может быть измерена, составляет 102 пг/мл.
- Диапазон измеряемых концентраций от 102 до 25000 пг/мл.
- Рабочий объем 100 мкл/лунку.

Перекрестная реактивность

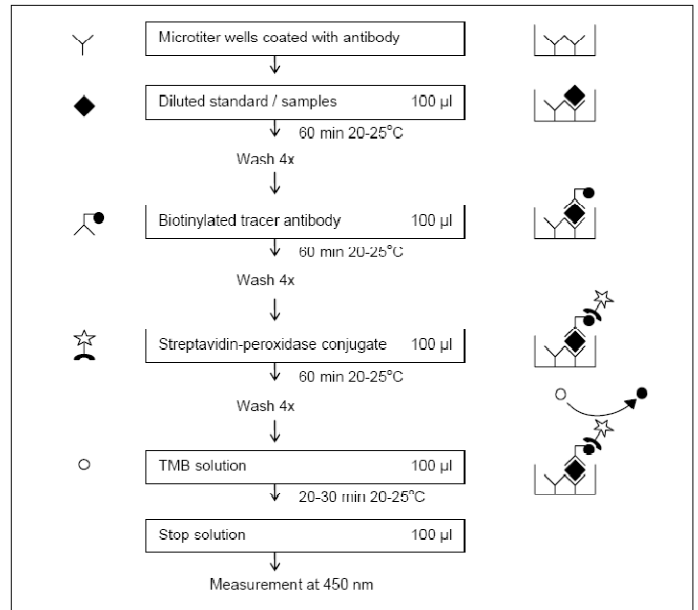
Потенциальные перекрестно реагирующие белки, обнаруженные в человеческом L-FABP методом ИФА:

Таблица 1

Вещество	Реакционная способность
H-FABP человека	Отрицательная
I-FABP человека	Отрицательная
L-FABP мыши/крысы	Отрицательная

Тестирование на перекрестную реактивность для других видов или белков/пептидов не проводилось.

4. ОБЗОР ПРОТОКОЛА



- Человеческий L-FABP ELISA представляет собой готовый к использованию твердофазный иммуноферментный 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 человеческие L-FABP.
- Биотинилированное антитело индикатора будет связываться с захваченным человеческим L-FABP.
- 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 человеческого L-FABP (логарифмически).
- Концентрация образцов человеческого L-FABP, которые тестируются одновременно со стандартами, может быть определена по стандартной кривой.

5. СОСТАВЛЯЮЩИЕ НАБОРА И ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ

Таблица 2

№ позиции	Компонент набора	Количество	Цветовой код
Флакон 1	Промывочный буфер 40x	1 флакон (20 мл)	Серый
Флакон 2	Буфер для разведения 10x	1 флакон (10 мл)	Золотой
Флакон 3	Стандарт	1 флакон, 1 мл лиофилизированный	Желтый
Флакон 4	Индикатор, биотинилированный	2 флакона, 1 мл лиофилизированный	Зеленый
Флакон 5	Стрептавидин-пероксидаза	1 флакон, 1 мл лиофилизированный	Синий
Флакон 6	TMB субстрата	1 флакон (20 мл)	Фиолетовый
Флакон 7	Стоп раствор	1 флакон (20 мл)	Красный
Поз. 8	Предварительно покрытые микротитровальные полоски	2 планшета	
Поз. 9	Рамка	1	
Поз. 10	Адгезивная пленка	4	
Поз. 11	Сертификат контроля качества	1	

Поз. 12	Инструкция	1	
Поз. 13	Листок сбора данных	1	

- 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 промыть большим количеством воды и обратиться 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, обработка и хранение

Сыворотка или плазма

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

Если используется плазма, отделить плазму от крови в течение 20 минут после забора крови центрифугированием (1500xg при 4 °С в течение 15 минут). Поместить плазму 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 человеческий L-FABP. Использовать образцы в течение 24 часов после размораживания. Избегать нескольких циклов замораживания-оттаивания, что может привести к потере активности человеческого L-FABP 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 сыворотки или плазмы крови

Человеческие L-FABP могут быть измерены точно, если образцы сыворотки или плазмы крови разводят, по крайней мере, 20-кратно перед использованием поставляемым буфером для разведения в полипропиленовых пробирках. Обратите внимание, что самые надежные результаты получают с ЭДТА плазмой.

Образцы мочи

Человеческие L-FABP могут быть измерены точно, если образцы мочи разводят, по крайней мере, 20-кратно перед использованием поставляемым буфером для разведения в полипропиленовых пробирках.

Замечание относительно рекомендуемого разведения образца

Рекомендуемое разбавление для образцов следует использовать в качестве ориентира. Восстановление человеческого L-FABP 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 человеческого L-FABP. 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 40x 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 человеческий L-FABP стандарт в полипропиленовых пробирках путем серийного разведения восстановленного стандарта буфером для разведения, как показано в таблице 3.

Таблица 3

Пробирка	Объем буфера для разведения	Объем стандарта	Концентрация (пг/мл)
1	См. сертификат контроля качества	150 мкл флакон 3	25,000
2	225 мкл	150 мкл пробирка 1	10,000
3	225 мкл	150 мкл пробирка 2	4000
4	225 мкл	150 мкл пробирка 3	1600
5	225 мкл	150 мкл пробирка 4	640
6	225 мкл	150 мкл пробирка 5	256
7	225 мкл	150 мкл пробирка 6	102
8	225 мкл	-	0

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, подготовьте необходимый объем индикатора путем разбавления 1 части восстановленного индикатора с 11 частями буфера для разведения.

Раствор стрептавидин-пероксидазы

Стрептавидин-пероксидаза восстанавливается путем инъекции 1 мл дистиллированной или деионизированной воды. Развести 1 мл восстановленной стрептавидин-пероксидазы с 23 мл буфера для разведения, что является достаточным для 2 x 96 тестов. Там, где требуется меньший объем, подготовьте необходимый объем стрептавидин-пероксидазы путем разбавления 1 части восстановленной стрептавидин-пероксидазы с 23 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:
 - а. Осторожно снимите герметик пластины, избегая разбрызгивания.

- б. Освободить пластину путем ее переворачивания и встряхивания содержимого над раковиной, держа переворнутой и высушить сухим толстым слоем ткани.
 - с. Добавить 200 мкл промывочного буфера в каждую лунку, подождать 20 секунд, освободить пластину как описано в пункте 5б.
 - д. Повторите процедуру промывки 5б/5с три раза.
 - е. 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 подвергать 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.

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 4

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 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

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»

Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122

Тел/факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.ua

www.diameb.ua