НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЛЮДСЬКОГО β-АМІЛОЇДНОГО БІЛКА (Aβ40)

KHB3481, KHB3482, Human Aß40

Каталог. № : ***KHB3481, KHB3482*** *Методика від* ***20-01-2010***
Кількість : ***96, 192***
Виробник : ***Invitrogen, (США)***

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

ЗБЕРІГАННЯ
Зберігати при температурі 2 - 8 °C.

РЕАГЕНТИ, ЩО ВХОДЯТЬ ДО СКЛАДУ НАБОРУ

Реагент	Набір 96 тестів	Набір 192 тести
Стандарт людського Aβ40. Ліофілізований синтетичний пептид. На етикетці флакона вказано кількість і об'єм розчину для розведення.	1 флакон	1 флакон
Буфер для розведення стандарту. Містить 0,1% азид натрію; червоний барвник*; 60 мл у флаконі.	1 флакон	2 флакона
Мікропланшет, покритий антитілами до NH_2-кінцевих ділянок Aβ, 96 лунок в одному планшеті	1 планшет	2 планшета
Детектуючі антитіла до Aβ40. Містить 0,1% азид натрію; блакитний барвник*; 6 мл у флаконі	1 флакон	2 флакона
Кон'югат антитіл до кролячих IgG з пероксидазою (анти-IgG-HRP), концентрат(100х). Містить 3,3 мМ тимолу; 0,125 мл у флаконі.	1 флакон	2 флакона
Буфер для розведення HRP. Містить 3,3 мМ тимолу; жовтий барвник *; 25 мл у флаконі.	1 флакон	1 флакон
Буфер для промивок, концентрат (25х). 100 мл у флаконі.	1 флакон	1 флакон
Хромоген, стабілізований розчин (ТМБ, тетраметилбензидин). 25 мл у флаконі	1 флакон	1 флакон
Стоп-розчин. 25 мл у флаконі	1 флакон	1 флакон
Плівки для заклеювання стрипів	2	4
** Розчини буфера для розведення стандарту, детектуючих антитіл, буфера для розведення кон'югату HRP поставляються забарвленими, з метою спрощення контролю процесу піпетування, і зниження можливих помилок при внесенні реагентів в лунки. Це ніяким чином не впливає на результати.*		

ЗАУВАЖЕННЯ ПО УТИЛІЗАЦІЇ
Цей набір містить матеріали, що містять невеликі кількості азиду натрію. Азид натрію може реагувати зі свинцем, міддю або латунню з утворенням вибухонебезпечних азидів металів. Залишки реагентів слід змивати великою кількістю води для запобігання утворення азидів. Уникайте контакту з очима, шкірою та слизовими оболонками. У разі контакту, рясно промийте уражене місце водою. Дотримуйтесь інструкцій, що регулюють діяльність лабораторій.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ
Всі компоненти крові та біологічні матеріали можуть бути потенційно небезпечні. Так як не існує методу, що дає повну гарантію відсутності будь-яких інфекційних агентів, то з даними реагентами треба поводитись як з потенційно інфекційно небезпечним матеріалом.

ПРИЗНАЧЕННЯ
Даний набір Human Aβ40 ELISA призначений для кількісного in vitro визначення людського Aβ40 методом ІФА (ELISA) в різних зразках (культуральному середовищі, гомогенатах тканин, спинномозковій рідині (CMP), і т.д.). Даним методом визначаються як природна, так і синтетична форма людського Aβ40. Антитіла до людського Aβ40, використані в даному методі, можуть специфічно розпізнавати Aβ40, а не Aβ42/Aβ43.
Даний набір був розроблений тільки для дослідницьких цілей і не може бути використаний для діагностики у людей або тварин.

ПРИНЦИП МЕТОДУ
Даний тест заснований на «сендвіч» методі твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). Специфічні моноклональні антитіла до NH_2-кінцевих ділянок Hu Aβ сорбованих в лунках мікропланшетів.
На першому етапі стандарти з відомою концентрацією Hu Aβ40, контролі і зразки вносять в лунки мікропланшетів і інкубують зі специфічними кролячими антитілами до COOH-кінцевого терміналу послідовності 1-40 Aβ. Ця COOH-кінцева послідовність утворюється в результаті розщеплення попередника.
Зв'язані кролячі антитіла виявляють за допомогою кон'югату антитіл до IgG кролика з пероксидазою (анти-IgG-HRP). Після промивання вносять анти-IgG-HRP (фермент). Після другої інкубації і промивання для видалення не пов'язаного ферменту, в лунки вносять розчин субстрату, що взаємодіє з пов'язаними субстратом з утворенням кольорового фарбування. Інтенсивність забарвлення розчину прямо пропорційна концентрації Hu Aβ40, присутнього у зразку.

ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ
Пептид бета амілоїд (Aβ) складається з 40-43 амінокислот, що відділяються від амілоїдного попередника ферментом β-секретази (наприклад, BACE) і, ймовірно, γ (гамма) секретази (3). Підвищене вивільнення «подовжених форм» пептиду Aβ, Aβ42 або Aβ43, більш схильних до агрегації, ніж Aβ40, відбувається у людей за певних мутацій, з виділенням певних алелей білка ApoE, або за участю інших, поки невідомих факторів. Багато дослідників обговорюють теорію, що таке підвищене вивільнення Aβ42/Aβ43 призводить до патологічного депонуванню Aβ (4).

НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ НАДАНІ МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ
- Дистильована або деіонізована вода.
- Буфер для розчинення стандарту [55 мМ натрій-бікарбонатний буфер (NaHCO, ультрачистий), pH 9.0].
- 4-(2-аміноетил)-бензолсульфоніл флуорід (AEBSF), або коктейль інгібіторів протеаз з AEBSF.
- Мікропланшетний рідер з можливістю вимірювань при довжині хвилі 450 нм і необхідним програмним забезпеченням.
- Ручний або автоматичний промиваючий пристрій
- Мікропланшетний шейкер (з можливістю струшування при низькій і середній швидкості).
- Калібровані піпетки змінного об'єму з одноразовими наконечниками.
- Скляні або поліпропіленові пробірки для розведення реагентів
- Фільтрувальний папір
- Калібровані склянки і градуйовані циліндри різних розмірів.

ЗАУВАЖЕННЯ ПО ПРОЦЕДУРІ
1. Коли ви не працюєте з набором, компоненти набору слід зберігати в холодильнику. Всі реагенти повинні бути нагріті до кімнатної температури перед використанням.
2. Мікротитрувальні планшети привести до кімнатної температури перед відкриттям пакету з фольги. Після того, як необхідна кількість смужок було визначено, негайно герметизувати сумку і зберігати при 2-8 °C, щоб зберегти цілісність пластини.
3. Зразки повинні бути зібрані у вільні від апірогенів/ендотоксинів пробірки.
4. Додайте в зразки коктейль інгібіторів з AEBSF (інгібітор серинових протеаз), розведення стандарту виконуйте в тому ж буфері, який використаний для підготовки зразків. Серинові протеази можуть швидко руйнувати пептид Ap, отже використання AEBSF (водорозчинний інгібітор, менш токсичний ніж PMSF) з кінцевою концентрацією 1 мМ дуже важливо. Зберігайте зразки на льоду до моменту внесення в лунки мікропланшетів.
5. Якщо зразки не аналізуються відразу, їх необхідно заморозити. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання зразків. Перед аналізом повністю розморозити і ретельно перемішати зразки.
6. Матриця зразка робить дуже сильний вплив на відновлення Aβ. Для гарантії точності вимірювання стандарт для побудови калібрувальної кривої необхідно розводити в тому ж буфері, який був використаний для приготування зразків.
7. Не використовуйте тимол або тимерозал в якості консервантів для зразків. Ці агенти інгібують вимір пептиду Aβ.
8. Уникайте використання зразків з сильним гемолізом або ліпемією. Якщо зразки містять велику кількість частинок, центрифугувати їх або відфільтруйте до аналізу.
9. Рекомендується всі стандарти, контролі і зразки аналізувати в дублікатах.
10. Для відтворюваних результатів дуже важливо, щоб час реакції у всіх лунках було однаковим. Отже, внесення реагентів повинне проводитися в однаковій послідовності і з однаковою швидкістю від лунки до лунки.
11. **Не змішуйте різні лоти і не замінюйте реагенти реагентами з різних лотів.**
12. Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном зберігання.

13. Абсорбція в лунках повинна бути зчитана негайно, або не пізніше 2-х годин після завершення аналізу. При цьому мікропланшет повинен бути закритий і зберігатися в темряві.
14. Внутрішній контроль необхідно ставити в кожній серії аналізів. Якщо контроль опинився за межами допустимого діапазону значень, правильність аналізу сумнівна.
15. Повністю видаляйте промивний буфер з лунок аспірацією або витрушуванням планшета на фільтрувальний папір. ***Ніколи*** не допускайте попадання фільтрувального паперу в лунки.
16. Уникайте контакту розчину хромогену з прямим сонячним світлом, тому що він чутливий до світла, і не допускайте його контакту з металами, інакше розчин хромогену може змінити колір і стати непридатним для аналізу.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ПРОМИВКИ

- **Неповна промивка негативно впливає на точність результатів.** Всі операції промивки повинні виконуватися буфером для промивок, що поставляється в наборі.
- Рекомендований метод для ручної промивки:
  Повністю видаліть рідину з лунок аспірацією, акуратно занурюючи наконечник піпетки на дно кожної лунки. Не подряпайте внутрішню поверхню лунок! Поле аспірації внесіть не менше 0.4 мл готового (розведеного) *Буфера для Промивок*. Залиште на 15-30 секунд (замочування), потім аспіруйте рідину з лунок. Повторіть стільки разів, скільки вказано в розділі «Процедура методу». Після закінчення промивання переверніть мікропланшет і підсушіть його на чистому фільтрувальному папері.
- Альтернативно, готовий *Буфер для Промивок* може бути налитий в пляшку з пульверизатором. При використанні пляшки з пульверизатором повністю заповнюйте лунки мікропланшетів готовим буфером для промивок. Після закінчення промивання переверніть мікропланшет і підсушіть його на чистій фільтрувальної папері.
- При використанні автоматичного вошера дотримуйтесь інструкції виробника приладу.

ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ ТА ЗРАЗКІВ

Підготовка Буфера для відновлення

Розчиніть 2.31 грама бікарбонату натрію в 500 мл деіонізованої води. Доведіть pH до 9.0 за допомогою 2N гідроксиду натрію. Профільтруйте розчин через фільтр 0.2 мкм.

Зауваження: Цей буфер використовується для розчинення ліофілізованого стандарту. Не використовуйте цей буфер для розведення стандарту або зразків.

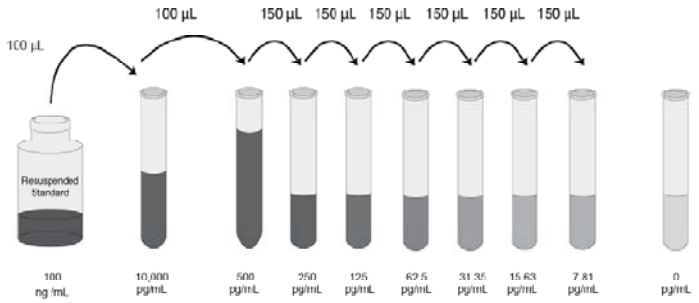
Розведення стандарту

Зауваження: Для розведення стандарту можуть бути використані поліпропіленові пробірки.

Стандарт Hu Aβ40 прокалібрований по очищеному препарату Hu Aβ40, і маса була скоригована відповідно до амінокислотної послідовності.

1. Дістаньте флакон зі Стандартом Hu Aβ40 і дайте йому нагрітися до кімнатної температури (КТ).
2. Розчиніть стандарт в буфері для розведення стандарту до кінцевої концентрації 100 нг/мл (55 мМ бікарбонат натрію, pH 9.0). Інструкції з розведення дані на етикетці флакона. Ретельно акуратно перемішайте і залиште на 10 хвилин для повного розчинення. Коротко перемішайте на вортексі перед приготуванням розведень.
3. Приготування розведень стандарту пептиду Aβ повинно бути виконано за допомогою тих же буферів, які були використані для приготування зразків. Наприклад, якщо екстракт мозку був розчинений в 10 разів буфером для розведення стандарту, то буфер, який використовується для розведення стандарту, повинен складатися з 90% буфера для розведення стандарту і 10% буфера, використаного для екстракції (включаючи AEBSF з кінцевою концентрацією 1 мМ).
4. Внесіть 0.1 мл розчиненого стандарту в пробірку, що містить 0.9 мл буфера для розведення стандарту. Надпишіть цю пробірку «10,000 пг/мл Hu Aβ40». Перемішайте.
5. Внесіть 0.1 мл стандарту 10,000 пг/мл у флакон, що містить 1.9 мл буфера для розведення стандарту. Надпишіть цю пробірку «500 пг/мл Hu Aβ40». Перемішайте.
6. Внесіть по 0.15 мл Буфера для Розведення Стандарту в кожну з 6 пробірок, позначених як 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 і 0 пг/мл Hu Aβ40.
7. Виконайте серійні розведення стандарту, як зазначено у схемі нижче. Ретельно перемішуйте між переносами з однієї пробірки в іншу.

Зауваження: Розчинений нерозведений стандарт Hu Aβ40, який залишився, може зберігатися замороженим при -80 °C до 4-х місяців, в аліквотах. Без втрат імунореактивності стандарт може бути заморожений і розморожений лише один раз.



Приготування других антитіл

Зауваження: Приготуйте не раніше, ніж за 15 хвилин до використання. Кон'югат *анти-кролячі IgG-HRP (100X)* поставляється в 50% гліцерину, це в'язка рідина. Для виконання правильного розведення анти-IgG-HRP (100X) повинен досягти кімнатної температури. Акуратно перемішайте. Піпетуйте анти-IgG-HRP (100X) повільно. Видаліть надлишок концентрату з наконечника за допомогою чистого фільтрувального паперу.

1. Розведіть 10 мкл концентрату 100X в 1 мл буфера для розведення кон'югату HRP для кожного 8-ми лункового стрипа, використовуваного в поточній постановці. Надпишіть отриманий розчин як «Робочий Розчин анти-IgG-HRP».
2. Поверніть невикористаний *кон'югат анти-IgG-HRP (100X)* в холодильник.

# of 8-Well Strips	Volume of Anti-Rabbit IgG HRP (100X)	Volume of Diluent
2	20 µL solution	2 mL
4	40 µL solution	4 mL
6	60 µL solution	6 mL
8	80 µL solution	8 mL
10	100 µL solution	10 mL
12	120 µL solution	12 mL

Розведення Буфера для промивок

1. Перед використанням *Концентрат Буфера для Промивок (25X)* повинен досягти кімнатної температури. Перемішайте концентрат перед розведенням, переконайтеся, що кристали солі, які випали в осад, повністю розчинилися. Розведіть 1 частину *25X Концентрату Буферу для Промивок* в 24 частинах дистильованої води (наприклад, 50 мл концентрату можна розвести до 1.25 л дистильованою водою, 100 мл концентрату можна розвести до 2.5 л дистильованою водою). Надпишіть флакон з приготованим розчином як «Готовий Буфер для Промивок».
2. Зберігайте і концентрат буфера для промивок і готовий буфер для промивок в холодильнику. Готовий буфер для промивок повинен бути використаний протягом 14 днів.

Підготовка зразків

Приготуйте одне або декілька розведень кожного зразка. Ці розведення повинні бути виконані буфером для розведення стандарту, а коефіцієнт розведення підібраний емпірично (наприклад, розведення в 2 і 10 разів дають розумний діапазон). Розведення необхідно виконувати, оскільки певні компоненти, присутні в зразку, можуть впливати на визначення пептидів Aβ, або для приведення концентрацій Aβ у зразку в діапазон вимірюваних значень методу. AEBSF повинен бути доданий в розведені зразки і стандарти до кінцевої концентрації 1 мМ з метою запобігання протеолітичного розщеплення пептидів Aβ.

Процедура гомогенізації тканини мозку людини або миші описана в розділі «Використання β-амілоїду».

Зауваження: при аналізі зразків плазми може знадобитися попередня підготовка зразків для руйнування взаємодії Aβ і білків, що його маскують.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Перед виконанням аналізу уважно ознайомтеся з розділом «ЗАУВАЖЕННЯ ПО ПРОЦЕДУРІ».

Всі реагенти та зразки повинні досягти кімнатної температури (18-25 °C) перед використанням. Всі реагенти необхідно ретельно і обережно перемішувати, не допускаючи утворення піни.

Зауваження: Калібрувальна крива повинна будуватися при кожній постановці аналізу.

1. Дістаньте необхідну для проведення аналізу кількість стрипів. Невикористані стрипи зберігайте в пакеті з осушувачем при 2-8

°C. Помістіть необхідну кількість стрипів в тримач. Поверніть стрипи, що залишилися, в пакет і пакет помістіть в холодильник.
2. Внесіть по 50 мкл *Буфера для Розведення Стандарту* в лунки «Стандарт 0». Лунка для хромогенного Бланка повинна залишатися порожньою.
3. Приготуйте розведення зразків і стандартів у відповідному буфері. Внесіть по 50 мкл кожного стандарту Aβ, контролю і зразків у відповідні лунки, крім лунки бланка.
4. Внесіть по 50 мкл *Антитіл Виявлення Hu Aβ42* у всі лунки, крім лунки бланка.
5. Закрийте планшет плівкою та інкубуйте **3 години при кімнатній температурі на шейкері.**
6. Повністю видаліть вміст лунок аспірацією або декантуванням. Промийте лунки 4 рази, як це зазначено в розділі **«Рекомендації щодо промивки».**
7. Внесіть по 100 мкл Робочого Розчину анти-IgG-HRP в усі лунки, за винятком бланка.
8. Закрийте планшет плівкою та інкубуйте **30 хвилин при кімнатній температурі.**
9. Повністю видаліть вміст лунок аспірацією або декантуванням. Промийте лунки 4 рази, як це зазначено в розділі **«Рекомендації щодо промивки».**
10. Внесіть по 100 мкл *Стабілізуючого Хромогену* в усі лунки. Колір розчину має змінитися на блакитний.
11. Інкубуйте **30 хвилин при кімнатній температурі в темряві. Зауваження: Не закривайте мікропланшет алюмінієвою фольгою або металізованою магнітною плівкою.** Час інкубації з хромогенним субстратом визначається типом використовуваного мікропланшетного рідера. Багато рідерів здатні зчитувати оптичну щільність тільки до 2.0 Од оптичної щільності. Для подібних фотометрів реакція повинна бути зупинена до досягнення яскравого забарвлення лунками в межах вимірювання інструменту. Визначайте оптичну густину в лунках при 450 нм тільки після внесення стоп-розчину. Якщо у рідера верхня межа зчитування 2.0 Од оптичної щільності, зупиніть реакцію через 15-20 хвилин інкубації з субстратним розчином.
12. Додайте по 100 мкл *Стоп Розчину* в усі лунки. Постукайте обережно по тримачу стрипів для перемішування реагентів. Колір розчину в лунках повинен змінитися з блакитного на жовтий.
13. Визначте оптичну густину в лунках при 450 нм проти «хромогенного бланка», що представляє собою суміш 100 мкл хромогенного розчину ТМБ і 100 мкл стоп-розчину. Визначте оптичну щільність не пізніше ніж через 30 хвилин після внесення стоп-розчину.
14. Використовуйте спеціальне програмне забезпечення для побудови калібрувальної кривої. Оптимальні результати виходять при використанні 4-параметричної апроксимації.
15. Визначте концентрації в контролях і зразках зі стандартної кривої. Для коригування розведення, зробленого в процесі аналізу, необхідно **помножити значення, отримані для зразків, на відповідний коефіцієнт розведення.** Всі зразки зі значеннями, більшими, ніж у самого високого стандарту повинні бути розведені буфером для розведення стандарту і проаналізовані ще раз. При цьому множте значення знайденої концентрації на коефіцієнт розведення.

Приклад результатів вимірювання стандартів Hu Aβ40 в діапазоні 0-500 пг/мл

Standard Hu Aβ40 pg/mL	Optical Density (450 nm)
500	3.887
250	2.434
125	0.946
62.5	0.386
31.25	0.194
15.63	0.128
7.81	0.101
0	0.075

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

Чутливість аналізу

Мінімально обумовлена концентрація Hu Aβ40 склала < 6 пг/мл і була розрахована по калібрувальній кривій, як рівень, відповідний сумі 2-х стандартних відхилень і середнього значення ОП, отриманого для стандарту 0 пг/мл в результаті 64 визначень.

ВІДТВОРЮВАНІСТЬ

1. Відтворюваність всередині однієї серії

Відтворюваність всередині однієї серії визначалася шляхом 14 визначень кожного зразка.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Середнє значення, (пг/мл)	49.5	129.7	305.7
Стандартне відхилення, (пг/мл)	1.4	3.3	7.1
Коефіцієнт варіації, (%)	2.8	2.5	2.3

2. Відтворюваність між серіями

Відтворюваність між серіями досліджень визначалася аналізом зразків сироватки 48 разів в незалежних аналізах.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Середнє значення, (пг/мл)	50.8	130.0	298.2
Стандартне відхилення, (пг/мл)	2.0	4.5	12.1
Коефіцієнт варіації, (%)	3.9	3.5	4.1

Лінійність розведення

Зразок людської CMP, що містить 195 пг/мл виміряного Hu Aβ40, був серійно розведений буфером для розведення стандарту в межах діапазону вимірювання методу. Середа RPMI, що містить 10% телячої сироватки, була збагачена нативним Hu Aβ40 з CSF до рівня 212 пг/мл, і серійно розведена буфером для розведення стандарту в межах діапазону вимірювання методу. Лінійний регресійний аналіз виміряних значень в зразках проти очікуваних концентрацій дав коефіцієнт кореляції 0.99.

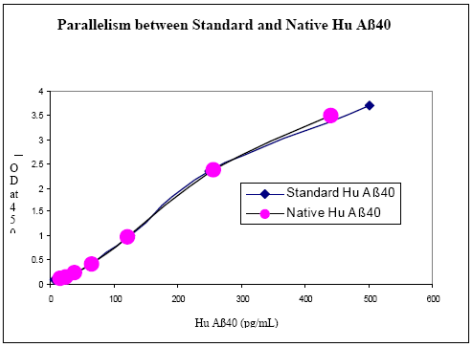
	Цереброспінальна рідина			Супернатант культури клітин		
Розведення	**Отримане пг/мл**	**Очікуване пг/мл**	**% Очікуваного**	**Отримане пг/мл**	**Очікуване пг/мл**	**% Очікуваного**
Немає	195	195	-	212	212	-
1/2	81	98	82.7	100	106	94.3
1/4	43	49	87.7	49	53	92.5
1/8	24	24	100	28	27	104

Відновлення

Відновлення нативного Hu Aβ40, доданого в CMP, складає в середньому 80%. Відновлення нативного Hu Aβ40, доданого в культуральну середу, що містить 10% телячої сироватки, склало в середньому 86%.

Паралелізм

Нативний Hu Aβ40 був доданий в буфер для розведення стандарту і виміряний по відношенню до стандарту, використаному в даному методі. Паралельність значень, отриманих для нативного і рекомбінантного білків, показана на малюнку, наведеному нижче.



Специфічність

Буферні розчини панелі речовин 50 нг/мл були проаналізовані в аналізі Hu Aβ40. Наступні речовини були проаналізовані, і для вищевказаної концентрації у них не була виявлена перехресна активність:
Aβ [1-12], Aβ [1-20], Aβ [12-28], Aβ [22-35], Aβ [1-42], Aβ [1-43], Aβ [42-1], α-Synuclein (90 нг/мл) , APP (250 нг/мл), і Tau (40 нг/мл). β амілоїд гризунів (1-40) показав приблизно 0.5% перехресної реакції при 50 нг/мл.

Хук-Ефект

Зразки, збагачені пептидом Hu Aβ40 до рівня 1 мкг/мл, давали відповідь вище найвищого стандарту.

Обмеження методу

Не екстраполюйте результати вище значення максимального стандарту; залежність концентрація/оптична щільність нелінійна в цьому діапазоні, і точності вимірювання важко досягти. У цьому випадку всі зразки мають бути розведені буфером для розведення стандарту і проаналізовані ще раз, а результат необхідно помножити на відповідний коефіцієнт розведення.
Вплив різних ліків, аберантних (відхиляються від норми) сироваток (гемоліз, гіперліпідемія, жовтяниця і т.д.) і використання інших

біологічних зразків не до кінця досліджено. Ступінь деградації нативного Hu Aβ40 в різних матриксу не досліджена. У літературі, присвяченій імуноаналізу, часто містяться посилання на перешкоди сигналу в деяких сироватках, приписувані впливу гетерофільних антитіл. Хоча нами і не були помічені такі зразки, не можна виключати можливість подібного впливу.

Застосування β-амілоїду: Процедура для гомогенізації мозку людини або трансгенного мозку мишей

Підготувати розчини

A. 5 М гуанидин HCl
   50 мМ трис-HCl, pH 8.0
B. Реакційний буфер BSAT-DPBS (фосфатний буферний сольовий розчин Дульбекко з 5% BSA і 0.03% твін-20, див. визначення нижче) з додаванням 1X коктейлю Інгібітора протеази (наприклад, Calbiochem каталоговий номер 539131; містить AEBSF, апротинін, E64, ЕДТА і лейпептин).

   Визначення BSAT-DPBS
   0.2 г/л KCl
   0.2 г/л KH_2PO_4
   8.0 г/л NaCl
   1.150 г/л Na_2HPO_4
   5% БСА
   0.03% Твін-20
   довести до 1 л з ультрачистою водою і приведенням pH до 7.4.

Протокол

1. Визначити вологу масу зразка мозку миші (100 мг) або зразка людського мозку в пробірці Еппендорфа (Fisher K749520-0000).
2. Додати 8X масу холодного 5М гуанидину HCl/50 мМ Tpic HCl (розчин "A", вище) в пробірку аліквотами по 50-100 мкл і ретельно розтерти ручним двигуном (Fisher K749540-0000) після кожного додавання. (Додатково: перемістити вищезазначений гомогенат в 1 мл гомогенізатора Dounce і ретельно гомогенізувати).
3. Змішайте гомогенат при кімнатній температурі протягом 3-4 годин. Зразок є стабільним і може бути замороженим/розмороженим кілька разів на цій стадії.
4. Розведіть зразок холодним Реакційним Буфером (розчин "B", вище). Центрифугуйте (мікроцентрифуга або Sorvall) при 16,000 x г протягом 20 хвилин при 4 °C. Цей коефіцієнт розбавлення вимагає регулювання в залежності від кількості присутнього Aβ та розвитку інгібування стандартної кривої через присутність гуанидину. Початкові експерименти визначають фактор розведення 1:200 для людського мозку і 1:20 до 1:50 для трансгенного мозку мишей. Оптимальний коефіцієнт розведення повинен визначатися для кожного конкретного експериментального визначення. (Примітка: ми визначили, що стандартна крива може витримати присутність 0.1М або менше розчину гуанидину. Включення гуанидину в концентрації вище 0.1М призведе до значного зниження стандартної кривої).
5. Обережно декантуйте супернатант і зберігайте його на льоду до використання з набором β-амілоїду ELISA від Invitrogen.

Альтернативна процедура

Гомогенізація може бути виконана з 4X об'ємом холодного PBS з додаванням суміші 1X інгібітора протеази, з подальшим додаванням розчину 8.2 М гуанидину/82 мМ трис-HCl (pH 8.0) з отриманням остаточного розчину з концентрацією 5 М гуанидину.

ДОДАТОК

Пошук і усунення несправностей

Підвищений фон	*Причина*: Недостатня промивка та/або злив з лунок після промивки. Розчин, що містить анти-кролячі IgG HRP, може підвищити фон, якщо в лунках залишається рідина. *Рішення:* Промийте відповідно до протоколу. Перевірте функцію автоматичного промивного пристрою. В кінці кожного етапу промивання інвертувати планшет на всмоктуючу тканину на стільниці, і залишити для повного зливання, постукуючи, якщо необхідно, щоб видалити залишки рідини. *Причина:* Забруднення розчину субстрату з іонами металів або окислюючими реагентами. *Рішення:* Використовуйте тільки дистильовану/деіонізовану воду для приготування миючого буфера і використовуйте пластикове обладнання. НЕ НАКРИВАЙТЕ планшет фольгою. *Причина:* Забруднення піпетки, розподіляючого резервуара або розчину субстрату з Anti-Rabbit IgG HRP. *Рішення:* Не використовуйте хромоген, який виглядає синім до розподілу на планшет. Візьміть новий флакон хромогену.
Підвищені ОЩ зразка/ стандарту	*Причина:* Неправильне розбавлення основного розчину стандарту; проміжні розведення не виконуються правильно. *Рішення:* Дотримуйтесь інструкцій протоколу про розведення стандарту. *Причина:* Неправильне розбавлення робочого розчину антикролячих IgG HRP. *Рішення:* Довести розчин антикролячих IgG HRP (100X) до кімнатної температури, набирати повільно і протерти наконечник лабораторною серветкою, щоб видалити надлишок. Розвести ТІЛЬКИ в HRP розчиннику, який постачається. *Причина:* часу інкубації подовжений. *Рішення:* Дотримуйтесь часу інкубації зазначеного в протоколі. *Причина:* Інкубацію проводили при 37 °C за умови, що необхідна КТ. *Рішення:* Виконайте інкубації при кімнатній температурі (= 25 ± 2 °C), коли вказано в протоколі.
Погана стандартна крива	*Причина:* Неправильне приготування стандартного розчину. *Рішення:* Розвести ліофілізований стандарт як вказано на етикетці тільки стандартним буфером для розведення або в розчиннику, який найбільше підходить матриці вашого зразка. *Причина:* Реагенти (ліофілізований стандарт, стандарт буфера для розведення, і т.д.) з різних комплектів, або інший аналіт або інший номер партії, були замінені. *Рішення:* НІКОЛИ не замінюйте будь-якими компонентами з іншого набору. *Причина:* Помилки в піпетуванні стандарту або послідовності кроків. *Рішення:* Завжди розливайте в лунки швидко і в тому ж порядку. Не торкайтеся кінчиком піпетки окремих лунок при внесенні реагенту. Використовуйте калібровані піпетки та відповідні наконечники для цього пристрою.
Слабкий/ відсутній розвиток кольору	*Причина:* Реагенти не кімнатної температури (25 ± 2 °C) на початку тесту. *Рішення:* Дайте всім реагентам прогрітися до кімнатної температури перед початком аналізу. *Причина:* Неправильне зберігання компонентів, наприклад, не зберігалися при температурі 2-8 °C. *Рішення:* Зберігайте всі компоненти як зазначено в протоколі і на етикетках. *Причина:* Робочий розчин Anti-Rabbit IgG HRP приготовлений раніше, ніж за 15 хвилин до використання в аналізі. *Рішення:* Використовуйте розбавлений Anti-Rabbit IgG HRP протягом 15 хвилин після розведення. *Причина:* Розчин ТМБ втратив активність. *Рішення 1:* Розчин ТМБ має бути прозорим перед внесенням в лунки мікротитраційного планшета. Інтенсивний аква-синій колір означає, що продукт забруднений. Будь ласка, зв'яжіться зі службою технічної підтримки, якщо виникла така проблема. Щоб уникнути забруднення ми рекомендуємо необхідну для аналізу кількість помістити в одноразовий жолоб для піпетування. Будь-яка кількість ТМВ, яка залишилася, повинна бути знищена. *Рішення 2:* Уникайте контакту розчину ТМБ з предметами, що містять іони металів. *Причина:* Спроба виміряти аналіт в матриці, для якої аналіз ELISA не оптимізований. *Рішення:* Будь ласка, зв'яжіться зі службою технічної підтримки щодо використання альтернативних типів зразків. *Причина:* Лунки були подряпані наконечником піпетки або промивними наконечниками. *Рішення:* Проводити дозування і аспірацію в і з лунок з обережністю.
Погана точність	*Причина:* Помилки в піпетуванні стандартів, зразків або послідовності кроків. *Рішення:* Завжди вносити в лунки швидко і в тому ж порядку. Не торкайтеся кінчиком піпетки окремих лунок при внесенні. Використовуйте калібровані піпетки та відповідні наконечники для цього пристрою. Перевірте, чи не протікають піпетки. *Причина:* Повторні використання наконечників для декількох зразків або різних реагентів. *Рішення:* Використовуйте нові наконечники для кожного зразка або

переносу реагенту.

Причина: Лунки були пошкрябані з наконечником піпетки або промивними наконечниками.
Рішення: Будьте обережні при дозуванні і аспірації в і з лунок.

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

© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»