



## Набор ИФА для определения человеческого АДИПОНЕКТИНА (Acnp30)

Каталог. № : ADIP025  
Количество : 96  
Производитель: Origenium (Финляндия)

Версия 2.10

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

### ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ

#### 1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА адипонектин (ACRP30) компании «Орджениум Лабораториз» является ферментосвязанным иммуносорбентным анализом для количественного определения человеческого адипонектина в супернатантах культуры клеток, плазме или сыворотке человека.

#### 2. ВВЕДЕНИЕ

Настоящий набор является ферментосвязанным иммуносорбентным анализом *in vitro* для количественного определения общего (низко-, средне- и высокомолекулярной массы) человеческого адипонектина в супернатантах культуры клеток, сыворотке и плазме. Этот анализ использует антитело, свойственное для человеческого адипонектина, нанесенное на 96-луночный планшет. Стандарты, образцы и биотинилированный анти-человеческий адипонектин капаются в лунки и адипонектин, присутствующий в образце, захватывается антителом, иммобилизированным на лунках и биотинилированным адипонектином специфическим обнаруживающим антителом. После вымывания несвязанного биотинилированного антитела, капается в лунки стрептавидин, конъюгированный пероксидазой хрена. Лунки промываются снова. После этого второго этапа промывки в лунки добавляется раствор субстрата ТМБ, что ведет к развитию цвета, который пропорционален количеству связанного адипонектина. Стоп-раствор изменяет цвет из синего на желтый, и интенсивность цвета измеряется при 450 нм.

#### 3. СОСТАВ НАБОРА

Компоненты набора	Количество/Объем
<b>96-луночный планшет с 12 стрипами</b> Делимые микротирационные стрипы для анализа, каждый с антителами адипонектина, нанесенными на 8 отдельных лунок. Готов к использованию.	1 рамка
<b>Стандарт адипонектина 30 нг/мл</b> Лиофилизированный и стабилизированный рекомбинант человеческого адипонектина (см. исходную конц. на этикетке). Растворить определенным количеством разбавителя образца, указанного на этикетке.	2 флакона
<b>Раствор биотинилированного адипонектина</b> Готов к использованию.	10 мл
<b>Авидин, конъюгированный пероксидазой хрена</b> Готов к использованию.	12 мл
<b>20x концентрат промывочного раствора</b> (достаточно для 1000 мл) <b>Разбавить 1:20</b>	50 мл
<b>Разбавитель образца</b> Готов к использованию.	2 x 100 мл
<b>Стоп-раствор</b> 0,9N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Готов к использованию.	8 мл
<b>Субстрат ТМБ</b> Готов к использованию.	8 мл

#### 4. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагент	Хранение	Стабильность
<b>96-луночный планшет с 12 стрипами.</b> Делимые микротирационные стрипы для анализа с 8 отдельными лунками, покрытыми антителом	Хранить при 2-8°C в закрытом мешочке из фольги с осушителями. <b>Неиспользуемые стрипы должны храниться в запечатывающемся герметичном и влагозащитном мешочке из фольги!</b>	3 месяца после вскрытия
<b>Стандарт адипонектина.</b> Лиофилизированный.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники!)</i>	До истечения срока годности набора в лиофилизированном виде. По крайней мере 3 недели после растворения разбавителем образца.
<b>Биотинилированные антитела.</b> Готовы к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники!)</i>	3 месяца после вскрытия
<b>Авидин, конъюгированный пероксидазой хрена.</b> Готов к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники!)</i>	3 месяца после вскрытия
<b>Разбавитель образца.</b> Готов к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники или пипетки!)</i>	3 месяца после вскрытия
<b>20x концентрат промывочного буфера.</b> <b>Разбавленный промывочный буфер</b>	Хранить при комнатной температуре. 1x рабочее разбавление. <i>Бутылки, используемые для рабочего разбавления, должны регулярно промываться. Утилизировать мутные растворы</i>	До истечения срока годности при комнатной температуре. 3 рабочих дня при комнатной температуре или 2 недели при +4°C.
<b>Раствор ТМБ-субстрата.</b>	Раствор готов для использования, при 2-8°C, защищая от света.	До истечения срока годности (указана на флаконе).

	Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники или пипетки!)	
Стоп-раствор.	Хранить при 2-8°C. Может храниться также при комнатной температуре.	До истечения срока годности.

### 5. ДОПОЛНИТЕЛЬНО ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер для измерения абсорбции при 450 нм.
- Точные пипетки для внесения объемов от 2 мкл до 1 мл.
- Многоканальная пипетка (от 25 – 350 мкл), 12 и 8-канальная. Рекомендуется для ручных промывок и внесения реагентов.
- Регулируемые пипетки 1-25 мл для подготовки реагентов.
- Градуированные колбы объемом 100 мл и 1 л.
- Промокательная бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Логарифмическая графопостроительная бумага или ПК с ПО для анализа данных ИФА.
- Пробирки для подготовки стандарта или разбавлений образца.
- Таймер

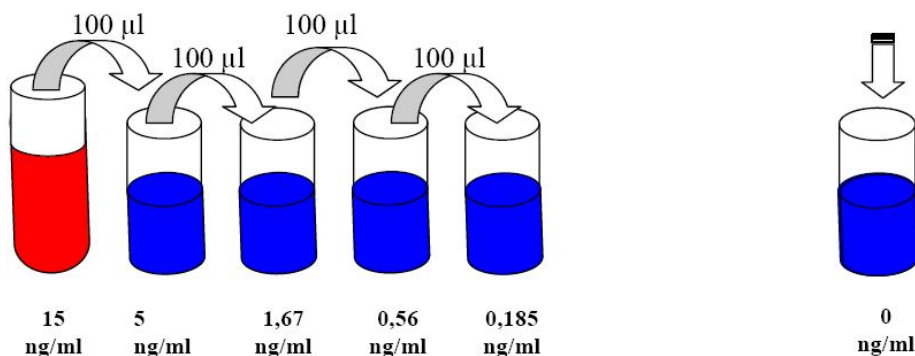
### 6. ОБЪЕМЫ РЕАГЕНТОВ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты					
К-во используемых стрипов (каждый на 8 лунок)	Биотинилированные антитела 50 мкл/лунку	Авидин-пероксидаза хрена 50 мкл/лунку	Субстрат ТМБ 50 мкл/лунку	Стоп-раствор 25 мкл/лунку	Промывочный буфер 300 мкл/лунку
1 (8 лунок)	500 мкл	500 мкл	500 мкл	300 мкл	30 мл
2 (16 лунок)	1 мл	1 мл	1 мл	600 мкл	55 мл
4 (32 лунок)	2 мл	2 мл	2 мл	1,2 мл	110 мл
6 (48 лунок)	3 мл	3 мл	3 мл	1,8 мл	165 мл
8 (64 лунок)	4 мл	4 мл	4 мл	2,4 мл	220 мл
12 (96 лунок)	6 мл	6 мл	6 мл	4 мл	350 мл

### 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ

1. Перед использованием привести все реагенты и образцы к комнатной температуре (18-25°C).
2. **Планшет, покрытый антителами:** До вскрытия мешочка из фольги определить количество стрипов, необходимых для исследования требуемого количества образцов, плюс 16 лунок, необходимых для стандартов и бланков в дубли. Удалить неиспользуемые стрипы из рамки планшета и вернуть их в мешочек, содержащий осушитель, на хранение до 1 месяца при 2-8°C.
3. **Разбавление стандарта для исследования:**  
Растворить лиофилизированный стандарт адипонектина определенным количеством растворителя образца, указанным на этикетке. Стандарт адипонектина стабилен по крайней мере 3 недели после растворения. Чтобы получить калибровочную кривую необходимо разбавить следующим образом:
  - a) Добавить 125 мкл стандарта адипонектина и 125 мкл разбавителя образца в пробирку 1, чтобы получить 15 нг/мл стандарта адипонектина.
  - b) Добавить 200 мкл разбавляющего буфера в другие 4 пробирок и начать 3-кратные последовательные разбавления в пробирках для разбавления как описано на рисунке.
  - c) Используя чистый наконечник, добавить в пробирку 6 долька разбавитель образца. 125 мкл стандарта адипонектина + 125 мкл разбавителя образца.

Только 200 мкл разбавителя образца как контрольной пробы



4. **Подготовка и разбавление образца:** Разбавитель образца используется для разбавления всех образцов (сыворотки/плазмы, культуры супернатантов клеток и мочи), требующих разбавления. *Хранить и разбавлять все образцы в пробирках или планшетах, изготовленных из материала с низкой связывающей поверхностью, типа полипропилена.* Перед исследованием замороженные образцы следует разморозить как можно быстрее под проточной водой (18-25°C). Не использовать для этой цели водяную баню 37°C или 56°C.

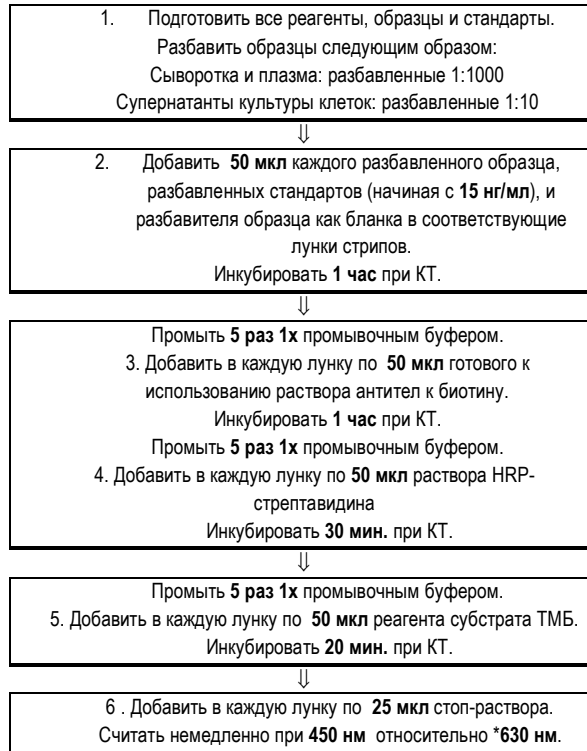
5.
  - **Плазма:** собрать плазму, используя одну десятую объема 0,1 М цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Центрифугировать образцы при 2000 x g в течение 10 минут и провести исследование. Разбавить образцов плазмы 1:1000 раствором для разбавления образцов. Рекомендуется выполнить разбавление в два этапа, например, первое разбавление 1:100 (5 мкл образца+495 мкл разбавителя образцов, а также дальнейшее разбавление 1:10 (100 мкл разбавленного образца+900 мкл раствора для разбавления образцов). Не использовать высоко гемолизированные или липемические образцы. Неразбавленные образцы могут храниться при температуре -20°C или ниже. Избегать повторного замораживания-размораживания
  - **Сыворотка:** Образцы должны быть собраны в пробирку для отделения сыворотки. После свертывания центрифугировать образцы при 2000 x g в течение 10 минут. Удалить сыворотку и провести исследование. Разбавить образцы сыворотки 1:1000 разбавителем образца. Рекомендуется выполнять разбавление в два этапа, например, первое разбавление 1:100 (5 мкл образца+495 мкл раствора для разбавления образцов, а также дальнейшее разбавление 1:10 (100 мкл разбавленного образца+900 мкл разбавителя образца).

Неразбавленные образцы могут храниться при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  или ниже до 3 месяцев. Избегать повторного замораживания-размораживания.

- **Супернатанты культуры клеток:** Центрифугировать среду культуры клеток при 2000 x g в течение 10 минут, чтобы удалить отходы. Собрать и провести исследование супернатантов. Разбавить супернатанты культуры клеток 1:10 разбавителем образца (например, 10 мкл образца + 90 мкл разбавителя). Хранить образцы при  $-20^{\circ}\text{C}$  или ниже. Избегать повторного замораживания-размораживания.
  - **Образцы с высокими значениями абсорбции:** Образцы, которые превышают диапазон измерений, должны быть разбавлены разбавителем образца 1:2 или 1:5 и измерены снова. Образцы со значениями меры поглощения света  $> 1.900$  могут быть последовательно разбавлены 1:100, 1:2000 и 1:4000. При вычислении результатов должен быть принят во внимание коэффициент разбавления.
5. **Промывочный буфер:** Если 20x концентрированный промывочный буфер содержит видимые кристаллы, нагреть его при  $37^{\circ}\text{C}$  и осторожно перемешать до растворения. Разбавить 25 мл концентрата промывочного раствора деионизированной или дистиллированной водой, чтобы получить 500 мл 1x промывочного буфера.
6. Перед использованием осторожно перемешать вортексом раствор **биотинилированных антител**.
7. Перед использованием осторожно перемешать **меченный пероксидазой авидин**.

**Предостережение:** субстрат ТМБ (тетраметилбензидин) и стоп-раствор ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) токсичные или едкие и должны использоваться с осторожностью. Во время применения использовать перчатки.

## 8. СХЕМА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА



\*Рекомендуется проводить корректировку оптических неточностей в микропланшетах, отнимая  $A_{630\text{nm}}$ , но не в качестве обязательной процедуры.

## 9. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ / ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Компоненты набора должны храниться в холодильнике если не используются. Все реагенты должны быть нагреты до комнатной температуры перед использованием.
- Перед вскрытием мешков из фольги микротитрационным планшетам нужно позволить достичь комнатной температуры.
- Как только было извлечено желаемое количество стрипов, немедленно герметично закрыть мешочек и хранить при  $2 - 8^{\circ}\text{C}$ , чтобы сохранить целостность планшета. Защищать от влажности.
- Образцы должны быть собраны в пробирки не содержащие пирогена/эндотоксина.
- Образцы должны быть заморожены если не анализируются вскоре после сбора. Избегать многократных циклов замораживания/замораживания образцов. Полностью разморозить и хорошо перемешать перед анализом.
- Когда возможно избегать использования чрезмерно гемолизированных или липемических сывороток. Если присутствует большое количество макрочастиц, центрифугировать или фильтровать перед анализом.
- Рекомендуется, чтобы все стандарты, контроли и образцы использовались в двойном экземпляре.
- Образцы, которые содержат  $> 15$  нг/мл адипонектина, должны быть разбавлены буфером разбавителя образца.
- При капании реагентов из пипетки сохранять последовательный порядок переноса из лунки в лунку. Это обеспечивает одинаковое время инкубации для всех лунок.
- Накрывать или закрыть все неиспользуемые реагенты.
- Не использовать реагенты по истечении срока годности набора.
- Считать абсорбции в пределах 15 минут после завершения анализа.
- Внутренние контроли должны применяться в каждом анализе. Если значения контролей вне предустановленных диапазонов - точность пробирного анализа под сомнением.
- Все остатки промывочной жидкости должны высушиваться в лунках достаточной аспирацией или декантацией, сопровождаемой постукиванием с усилием планшетом о промокательную бумагу. **Никогда** не вставлять промокательную бумагу непосредственно в лунку.
- Поскольку хромоген ТМБ высокочувствителен, избегать длительного контакта со светом. Также избегать контакта между стабилизированным хромогеном и металлом, иначе может развиться цвет.

## 10. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Перед использованием привести все реагенты и образцы к комнатной температуре ( $18 - 25^{\circ}\text{C}$ ). Рекомендуется, чтобы все стандарты и образцы применялись по крайней мере в двойном экземпляре. Оставить некоторые лунки в качестве реагента бланка (от 2 до 4 лунок).

**ПЕРВЫЙ ШАГ: СТАНДАРТ, ОБРАЗЦЫ И БЛАНК+РАСТВОР БИОТИНИЛИРОВАННЫХ АНТИТЕЛ**

2. Раскапать в соответствующие лунки по 50 мкл образца и 50 мкл каждого разбавленного стандарта, начиная с 15 нг/мл (более детально см. стр. 7). Раскапать по 50 мкл разбавителя образца в лунки, которые будут использоваться в качестве контрольной пробы.

3. Добавить по 50 мкл зеленого раствора биотинилированных обнаруживающих антител во все лунки, содержащие стандарты и образцы. Инкубировать при комнатной температуре 1 час, промыть 5 раз 1х промывочным раствором (по 300 мкл на каждую лунку).

**Для промывки:** Удалить содержимое планшета. Использовать многоканальную пипетку, чтобы заполнить каждую лунку 300 мкл промывочного буфера, затем удалить содержимое планшета. Повторить процедуру еще 4 раза, чтобы в сумме получилось **ПЯТЬ** промывок. Осторожно стукнуть планшетом о бумажные полотенца или другой гигроскопичный материал.

**Внимание:** Для автоматизированной промывки аспирировать все лунки и промыть 5 раз промывочным буфером. Стукнуть планшетом о бумажные полотенца или другой гигроскопичный материал. Никогда не позволять реакционным лункам высыхать. Продолжить следующий этап без задержки или прерывания.

**ВТОРОЙ ШАГ: СТРЕПТАВИДИН-ПЕРОКСИДАЗА ХРЕНА**

4. Добавить в каждую лунку по 50 мкл подготовленного раствора стрептавидин-пероксидазы хрена (готовый к использованию). Инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре.

5. Промыть 5 раз 1х промывочным раствором (по 300 мкл на каждую лунку).

**ТРЕТИЙ ШАГ: СУБСТРАТ ТМБ**

6. Добавить в каждую лунку по 50 мкл готового к использованию реагента субстрата. Инкубировать в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте.

**ЧЕТВЕРТЫЙ ШАГ: ОСТАНОВКА РЕАКЦИИ И СЧИТЫВАНИЕ ПЛАНШЕТА**

7. Добавить в каждую лунку по 25 мкл стоп-раствора. Считать при 450 нм в пределах 15 минут.

*Корректировка оптической интерференции в микропланшете путем вычитания А630 нм рекомендованная, но не обязательная процедура.*

**ПЯТЫЙ ШАГ: СЧИТЫВАНИЕ И ВЫЧИСЛЕНИЕ**

8. Вычислить среднее значение абсорбции реагента бланка и вычитать от всего значений исследуемых лунок (стандарта и образцов).

Среднее значение реагента бланка при 450 нм должно быть меньше 0,200

9. Вычислить результаты относительно стандарта.

**11. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Калибровочная кривая должна быть определена индивидуально для каждого исследования. Исправьте каждое значение меры поглощения света всех стандартов, вычитая ОП значения реагента бланка (Бл = только разбавитель образца). Вычислить из дубликатов среднее значение абсорбции каждого стандарта.

Калибровочная кривая используется, чтобы определить количество адипонектина в неизвестном образце. Калибровочная кривая производится изображением средней ОП (450 нм), полученной для каждой из концентраций стандартов на вертикальной (Y) оси против соответствующей концентрации адипонектина (нг/мл) на горизонтальной (X) оси.

Создать калибровочную кривую, используя миллиметровку или статистическое программное обеспечение.

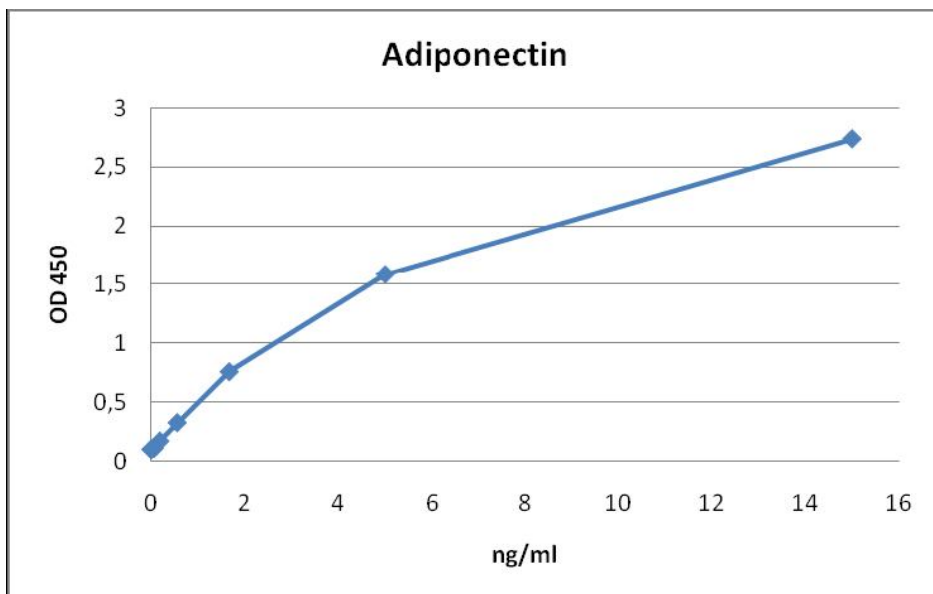
Если образцы производят значения выше чем самый высокий стандарт, разбавить образцы разбавителем образца и повторить анализ. Концентрация, полученная из калибровочной кривой должна быть умножена на коэффициент разбавления.

Умножить значение плазмы или сыворотки на коэффициент разбавления 1000 и значение культуры клеток на коэффициент разбавления 10.

**12. ТИПИЧНЫЕ ДАННЫЕ**

Следующие данные были получены для различных стандартов адипонектина в диапазоне от 0 до 15 нг/мл.

**Внимание:** Этот график предоставлен только в качестве примера. Калибровочная кривая должна строиться каждый раз при проведении исследования. Не использовать эти значения в своих расчетах.



**13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА**

	<b>Адипонектин</b>
<b>Диапазон анализа</b>	0,185-15 нг/мл
<b>Точки калибровочной кривой</b>	15, 5, 1,67, 0,56, 0,185 и 0 нг/мл.
<b>Точность в анализе</b>	≤10%
<b>Точность между анализами</b>	≤12%
<b>Точность между сериями</b>	≤12%
<b>Перекрестная реактивность</b>	Перекрестной реактивности не наблюдалось в следующих рекомбинантах белков человека: IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, TNF α, тимус и регулируемый активацией хемокин (TARC)
<b>Специфичность</b>	Отличает человеческий адипонектин.
<b>Чувствительность</b>	<0,185 нг/мл

**14. ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**15. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ**

Настоящий набор предназначен только для использования в исследовательских целях квалифицированным и компетентным персоналом, выполняющим диагностические или исследовательские процедуры.

Если получатель настоящего набора передает его любым способом третьему лицу, эта инструкция, должна прилагаться, и вышеуказанный получатель должен под собственную ответственность обеспечить в пользу производителя все ограничения ответственности здесь изложенные.

Компания-производитель не несет ответственности за любые повреждения или потери из-за использования набора в любых случаях кроме тех, которые четко указаны в этой инструкции.

Ответственность производителя ни в коем случае не должна превышать коммерческой стоимости набора.

Производитель ни в коем случае не несет ответственности за косвенные, умышленные или наследственные повреждения, включая, но не ограничиваясь потерей прибыли.

**16. ОБНАРУЖЕНИЕ И УСТРАНЕНИЕ ТРУДНОСТЕЙ**

<b>Проблема</b>	<b>Причина</b>	<b>Решение</b>
<b>Некачественная калибровочная кривая</b>	1. Неточное капанье или ошибка капанья. 2. Неправильное разбавление стандарта. 3. Бактериологическое загрязнение реагентов.	Проверить пипетки и регулярно калибровать. Перемешать вортексом состав перед использованием и осторожно разбавить в пробирке Эппендорфа.
<b>Слабый сигнал</b>	1. Инкубация короче рекомендуемой. 2. Несоответствующие объемы реагента, неправильное разбавление или ошибка капанья.	Убедиться в достаточности времени инкубации. Проверить пипетки и убедиться в правильности их работы.
<b>Большой КВ</b>	Неправильное капанье и высушивание лунок в течении процедуры анализа.	Проверить пипетки. Немедленно заполнить лунки промывочным буфером и реагентами.
<b>Высокий фон</b>	1. Недостаточная промывка планшета. 2. Загрязненный промывочный буфер. 3. Объем промывочного буфера меньше рекомендуемого.	Посмотреть руководство по правильности промывки. При использовании планшетного промывателя проверить открытость и чистоту всех проточных путей. Приготовить новый промывочный буфер. Использовать 300 мкл/лунку.
<b>Низкая чувствительность</b>	1. Неправильное хранение набора ИФА. 2. Стоп-раствор. 3. Загрязнение реагентов.	Хранить компоненты набора для исследования следуя рекомендациям настоящего руководства пользователя. Защищать раствор субстрата от света. Стоп-раствор должен добавляться в каждую лунку перед измерением. Использовать чистые стерильные наконечники. Удалить загрязненные реагенты.

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)