

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ТКАНЕЙ МОЗГА

CYT306, Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

Каталог. № : **CYT306**
Количество : **2 x 96**
Производитель: **Millipore (США)**

Методика от **04-2015**
Версия i: **40891**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Введение

Набор **ChemiKine™** Нейротрофического фактора тканей мозга (BDNF) представляет собой иммуоферментный анализ типа "сэндвич" (ИФА), который измеряет BDNF. С помощью данного анализа можно измерить BDNF в образцах человека и крысы. BDNF действует на определенные нейроны центральной нервной системы и периферической нервной системы, помогая поддерживать выживание нейронов существующих и стимулировать рост и дифференцировку новых нейронов и синапсов. В мозге он активен в гиппокампе, коре и базальных отделах переднего мозга - областях, жизненно важных для обучения, памяти и мышления. Сам BDNF имеет важное значение для долговременной памяти. BDNF является вторым нейротрофическим фактором после фактора роста нервов (NGF).

Хотя подавляющее большинство нейронов в головном мозге млекопитающих образуются внутриутробно, части мозга взрослого человека сохраняют способность к росту новых нейронов от нервных стволовых клеток в процессе, известном как нейрогенезис. Нейтрофины представляют собой химические вещества, которые помогают стимулировать и контролировать нейрогенезис, BDNF является одним из самых активных. Мыши, рожденные без способности производить BDNF, страдают дефектами развития мозга и сенсорной нервной системы, и обычно умирают вскоре после рождения, что свидетельствует о том, что BDNF играет важную роль в нормальном развитии нервной системы.

Принцип теста

С помощью системы анализа **ChemiKine** BDNF мышиные моноклональные антитела к человеческому BDNF наносят на микропланшет и используют для захвата BDNF из образца. BDNF-специфические, Биотин-конъюгированные, мышиные моноклональные антитела обнаруживают захваченные BDNF. После добавления стрептавидин-фермента, субстрата и стоп-раствора определяется количество BDNF. Стандартная кривая демонстрирует прямую зависимость между оптической плотностью (OD) и концентрацией BDNF: например, чем выше OD, тем выше концентрация BDNF в образце.

Применение

Набор **ChemiKine** BDNF предназначен для измерения количества BDNF в супернатантах клеточных культур, гомогенатах тканей и биологической жидкости (сыворотка, плазма и образцы без сыворотки) образцов человека и крысы. В данном наборе достаточно реагентов для двух иммуоанализов с использованием 96-луночного планшета. Рекомендуется анализ образцов и стандартов в дублях.

Только для исследовательских целей. Не для использования в диагностических процедурах.

Аналитическая Чувствительность и Предел обнаружения

Чувствительность:	15 пг/мл
Диапазон обнаружения:	15 пг/мл до 1000 пг/мл
Перекрестная Реактивность:	Никакой существенной перекрестной реактивности с NGF, NT4/5 или NT3
Внутрисерийная Вариативность:	+ 3.7% (1250 пг/мл)
Межсерийная Вариативность:	+ 8.5% (250 пг/мл)

Состав набора

1. ChemiKine BDNF ИФА планшет: (№ 60238) Два 96-луночных иммуопланшета, предварительно покрытых мышиным

моноклональным антителом к человеческому BDNF, запечатаны в пакеты из фольги.

2. Концентрат Промывочного Буфера: (№ 60245) Один 100 мл (10X) флакон концентрата.
3. Разбавитель Стандарта/Образца: (№ 60240) Один 60 мл флакон (Готов к применению).
4. Стандарт BDNF (Рекомбинантный человеческий): (№ 60237) Два флакона (Лиофилизированные).
5. Биотинилированные мышиные моноклональные антитела к человеческому BDNF: (№ 60583) Один 25 мкл флакон.
6. Стрептавидин-Ферментный конъюгат: (№ 60582) Один 50 мкл флакон HRP, конъюгированного со стрептавидином.
7. Раствор ТМВ/Е: (№ 60096) Два по 10 мл флакона, готовый к использованию раствор 3,3', 5,5'-Тетраметилбензидина в соответствующем буфере с усилителем.
8. Стоп раствор (№ 60260): Один 22 мл флакон раствора HCl.

Материалы, которые не поставляются

1. Многоканальные или повторяющиеся пипетки
2. Шейкер (опционально)
3. Пипетки и наконечники, с точностью измерения 10-1000 мкл
4. Градуированные серологические пипетки
5. 96-луночный микропланшетный считыватель с 450 нм фильтром
6. Графическая бумага для ручного построения данных анализа
7. Калибровочные тестовые пробирки для разбавления стандартов и образцов
8. Механический вортекс
9. Контейнер на 1 или 2 литра

Меры предосторожности

- Промывочный Буфер и Буфер для Образцов содержат тимеросал. Тимеросал высоко токсичен при вдыхании, контакте с кожей или при проглатывании. Тимеросал является возможным мутагеном и должен обрабатываться соответствующим образом.
- Данные инструкции были разработаны, чтобы оптимизировать производительность работы набора. Отклонение от инструкций может привести к снижению производительности набора и неспособности производить точные данные.

Технические советы

- Ручная промывка планшета: Тщательное промывание и полное удаление всей жидкости аспирацией в конце каждого этапа промывки очень важны для получения низких фоновых значений.
- **Рекомендуемый метод для Промывания Планшета:**
 1. Удалить жидкость из каждой лунки, постукивая пластиной об раковину. Промокнуть планшет чистыми бумажными полотенцами.
 2. Пипетировать 250 мкл разведенного Промывочного Буфера в каждую лунку с использованием многоканальной пипетки.
 3. Удалить жидкость из каждой лунки, постукивая пластиной об раковину. Промокнуть планшет чистыми бумажными полотенцами.
 4. Повторить промывку и стряхивание 4 раза.

Подготовка реагентов

1. **Биотинилированные моноклональные мышиные анти-человеческие BDNF антитела**
Непосредственно перед использованием разбавить биотинилированные антитела 1:1,000 с Разбавителем для образцов. Не хранить разбавленные растворы.
2. **Стрептавидин - Ферментный конъюгат**
Непосредственно перед использованием разбавить HRP конъюгат 1:1,000 с Разбавителем для образцов. Не хранить разбавленные растворы.
3. **Стандарт BDNF**

Примечание: При открытии лиофилизированного Стандарта, удалить резиновую пробку мягко, так как лиофилизат, возможно, мог сместиться во время транспортировки.

Восстановить флакон со стандартом с объемом Разбавителя для образцов, указанного на этикетке, чтобы получить относительную концентрацию BDNF 20,000 пг/мл. Этот исходный материал затем используется для получения стандартной кривой. Используйте Раствор для разведения образцов, чтобы сделать разведения. Предложенная схема разбавления выглядит следующим образом:

- a) Пометить 7 тестовых пробирок № 1-7 и "0 доза". Добавить 950 мкл Разбавителя для образцов в пробирку со

Стандартом № 1. Добавить 500 мкл Разбавителя для образцов в пробирки со Стандартами № 2-7 и "0 доза".

- b) Добавить 50 мкл основного Стандартного раствора в пробирку № 1 и перемешать на вортексе. Это и есть пробирка со Стандартом № 1 с концентрацией 1000 пг/мл.
- c) Стандарты № 2-7 затем получают путем выполнения разбавления предыдущего Стандарта 1:2. См. рис.1. Например, чтобы приготовить Стандарт № 2, взять 500 мкл Стандарта № 1 и добавить его в пробирку № 2 и перемешать, и так далее. Не добавлять Стандарт BDNF в пробирку со Стандартом "0 Доза".

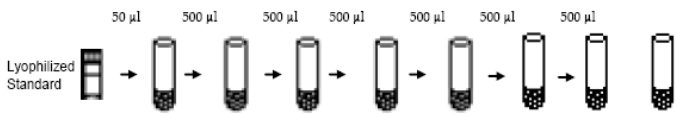


Рисунок 1: Серийное Разведение Стандарта BDNF

Таблицу см. в оригинале инструкции.

Примечание: Кривая Стандарта BDNF может быть построена с использованием различных схем последовательного разбавления путем внесения соответствующих корректив в шаблон разбавления.

4. Промывочный Буфер

Добавить все содержимое 10X Концентраата Промывочного буфера в соответствующий контейнер, QS до 1 л деионизированной водой. Перемешать до однородности.

Подготовка образцов

Рекомендуется тестирование каждого образца в двух экземплярах. Образцы следует разбавить Растворителем для Образцов/Стандартов 1:2 и далее разбавить двукратными серийными разведения и провести анализы пластины. Альтернативно, можно анализировать образцы в единичной концентрации (в трех экземплярах) и анализировать повторно все положительные образцы для определения точной концентрации BDNF.

Образцы ткани должны быть быстро иссечены, взвешены и быстро заморожены в жидком азоте перед хранением при -70°C . В течение двух недель замораживания, образцы тканей должны быть гомогенизированы в охлажденном льдом буфере для гомогенизации, состоящем из 100 мМ Трис/HCl, pH 7 с 2 % бычьего сывороточного альбумина (BSA), 1 М NaCl, 4 мМ EDTA.Na², 2% Triton X-100, 0,1% азид натрия и ингибиторы протеазы (Sigma) 5 мкг/мл Апротинаина, 0,5 мкг/мл Антипаина, 157 мкг/мл Бензамидина, 0,1 мкг/мл Пенстатина А и 17 мкг/мл фенилметил-сульфонил фторида. Гомогенаты должны быть подготовлены примерно в соотношении от 20 до 100 объемов буфера для гомогенизации к весу сырой ткани, но наиболее подходящий коэффициент должен определяться пользователем для каждой ткани. Гомогенаты центрифугировать при 14,000xg в течение 30 минут. Полученные супернатанты следует использовать для анализа BDNF.

Хранение Компонентов набора

Хранить невскрытый набор на $2-8^{\circ}\text{C}$ до истечения срока годности, указанного на этикетке. После открытия хранить компоненты набора, а именно, Планшет, покрытый мышинными моноклональными антителами анти-BDNF, Мышиное моноклональное антитело анти-BDNF, конъюгированное Биотином, Промывочный Буфер, Разбавитель для образцов, Стрептавидин-Ферментный конъюгат, ТМВ раствор и Стоп Раствор, при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ до истечения срока годности, указанного на этикетке. Хранить Стандарт BDNF при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ до 30 дней после восстановления.

Инструкции по проведению анализа

1. Поместить необходимое количество тестовых полосок в держатель пластины.
2. Добавить 100 мкл Стандартов 0-7 или образцов в лунки. Рекомендуется анализ Стандартов и образцов в двух экземплярах.

Примечание: Стандартная кривая должна быть построена при каждой постановке.

3. Накрывать планшет пленкой. Инкубировать при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ в течение ночи (на шейкере, если возможно).

4. ВАЖНЫЙ ШАГ ПРОМЫВКИ:

Аккуратно снять пленку и промыть пластину не менее 4 раз. Тщательное мытье пластины является чрезвычайно важным для уменьшения фона. Мы рекомендуем использовать многоканальную пипетку, чтобы заполнить каждую лунку 250 мкл разбавленного Промывочного

Буфера. Удаление жидкости из скважин лучше всего достигается опрокидыванием планшета и стряхиванием жидкости из лунок над раковиной и промоканием пластины чистыми бумажными полотенцами. Используя многоканальную пипетку добавить 250 мкл Промывочного Буфера в каждую лунку; слегка ударить планшетом и промокнуть его. Повторить эту процедуру в общей сложности 4 раза.

Для пользователей автоматических вошеров: Важно обеспечить, чтобы промывочный аппарат содержался надлежащим образом и нормально работал. Трубы и наконечники могут легко засориться, что приводит к неполной промывке и неадекватной аспирации лунок. Это может привести к низким результатам точности и непригодной стандартной кривой. Для достижения наилучших результатов мы рекомендуем проведение, по крайней мере, 4 циклов промывки.

5. Добавить 100 мкл разбавленного стрептавидин-HRP конъюгата (См. раздел о подготовке реагентов) в каждую лунку. Закрывать планшет и инкубировать при комнатной температуре в течение 2-3 часов (на шейкере, если это возможно). Промыть, как описано в пункте 4.
6. Добавить 100 мкл разбавленного стрептавидин-HRP конъюгата (см. раздел о подготовке реагентов) в каждую лунку. Закрывать планшет и инкубировать при комнатной температуре в течение 1 часа (на шейкере, если возможно). Промыть, как описано в пункте 4.
7. Привести ТМВ к комнатной температуре. Добавить 100 мкл Субстрата ТМВ/Е в каждую лунку. Инкубировать при комнатной температуре в течение 15 минут. (Стандарт 1000 пг/мл должен достичь глубокого синего окраса). Остановить реакцию добавлением 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку. Синий цвет изменится на желтый. Сразу считать пластину при 450 нм (цвет будет исчезать с течением времени).

ВНИМАНИЕ: Воздушные пузыри в скважинах приведут к ошибочным измерениям. Убедитесь, что все пузырьки удалены до считывания результатов абсорбции.

Подсчет результатов

Ручное Построение: Строить стандартную кривую на логарифмической бумаге. Известные концентрации BDNF отложить на оси X и соответствующие OD на оси ординат. Стандартная кривая должна дать результат, который показывает прямую связь между концентрациями BDNF и соответствующими OD (оптические плотности). Другими словами, чем выше концентрация BDNF в образце, тем выше OD. Концентрация BDNF в неизвестных образцах может быть определена путем откладывания OD образца на Y-оси, затем провести горизонтальную линию до пересечения с калибровочной кривой. Вертикальная линия, опущенная из этой точки, пересекает ось X в концентрации BDNF в неизвестном образце.

Считывающее устройство/PC интерфейс: Альтернативный метод состоит в том, чтобы ввести данные в компьютерную программу с программным обеспечением подбора кривой. Хорошие результаты могут быть получены с помощью линейного регрессионного анализа. Некоторые точки данных в верхней или нижней части диапазона возможно, должны быть опущены для получения хорошего результата. В настоящее время существующее программное обеспечение может выполнить такое построение.

Образец построения

График см. в оригинале инструкции.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»