

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АДИПОНЕКТИНА

EA2500-1, Human Adiponectin ELISA

Каталог. № : EA2500-1
Количество : 96
Производитель: AssayPro, (США)

Версия 6.9



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

ВВЕДЕНИЕ

Адипонектин, также известный как Adipocyte Complement-Related Protein of 30 кДа (ACRP30), представляет собой секретируемый белок сыворотки, выраженный исключительно в дифференцированных адипоцитах. Исследования показывают, что сниженные концентрации Адипонектина плазмы связаны с ожирением, резистентностью к инсулину (1), первичной артериальной гипертензией (2), воспалением и атеросклерозом (3), а также острым инфарктом миокарда (4). С другой стороны, повышенный уровень Адипонектина приводит к нефротическому синдрому (5, 6).

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор AssayMax человеческого Адипонектина ELISA предназначен для обнаружения Адипонектина в моче, плазме, сыворотке, молоке, слюне и супернатантах клеточных культур человека. Этот анализ использует количественную методику иммуоферментного анализа типа сэндвич, которая измеряет Адипонектин менее, чем за 3 часа. Поликлональные антитела, специфичные для Адипонектина, были предварительно нанесены на микропланшет. Адипонектин в стандартах и образцах зажат иммобилизованным антителом и специфическим биотинилированным поликлональным антителом Адипонектина, который распознается конъюгатом стрептавидин-пероксидазы. Все несвязанные материалы затем вымываются и субстрат фермента пероксидазы добавляется. Развитие цвета останавливается, и интенсивность цвета измеряется.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- Подготовить все реагенты (рабочий буфер для разведения, промывочный буфер, стандарты, биотинилированное антитело и SP-конъюгат) в соответствии с инструкцией, перед запуском теста.
- Подготовить все образцы до проведения анализа. Фактор разбавления для образцов указан в настоящем Протоколе. Тем не менее, пользователь должен самостоятельно определить оптимальный коэффициент разбавления.
- Осадить частицы во флаконе SP-конъюгата и во флаконе биотинилированного антитела перед их открытием и использованием.
- Этот набор предназначен для использования в исследовательских целях.
- Набор не следует использовать по истечении срока годности.
- Стоп раствор является кислым раствором.

РЕАГЕНТЫ

- **Микропланшет Человеческого Адипонектина:** 96-луночный полистироловый микропланшет (12 стрипов по 8 лунок), покрытый поликлональным антителом к Адипонектину.
- **Уплотнительные ленты:** Каждый комплект содержит 3 нарезанные, чувствительные к давлению уплотнительные ленты, которые могут быть подогнаны под формат индивидуального анализа.
- **Стандарт Человеческого Адипонектина:** Адипонектин в буферной белковой основе (125 нг, лиофилизированный).
- **Биотинилированное антитело Человеческого Адипонектина (100x):** 100x биотинилированное поликлональное антитело к Адипонектину (80 мкл).
- **Концентрат разбавителя MIX (10x):** 10x концентрированная буферная белковая основа (30 мл).
- **Концентрат промывочного буфера (20x):** 20x концентрированные буферные поверхностно-активные вещества (30 мл, 2 бутылки).
- **Конъюгат стрептавидин-пероксидазы (SP-конъюгат):** 100x концентрат (80 мкл).

- **Субстрат хромогена:** готовый к использованию стабилизированный пероксидазой хромогенный субстрат тетраметилбензидина (8 мл).
- **Стоп раствор:** 0,5 N соляной кислоты для остановки реакции хромогенного субстрата (12 мл).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

- Храните компоненты набора при температуре 2-8 °C или -20 °C по прибытии до истечения срока годности.
- Храните SP-конъюгат и биотинилированное антитело при -20 °C.
- Храните микропланшет, концентрат разбавителя (10x), мощный буфер, стоп раствор, и субстрат хромогена при температуре 2-8 °C.
- Неиспользованные лунки микроплшета могут быть возвращены в пакет из фольги с осушителем и запечатаны. Хранить до 1 месяца в вакуумном эксикаторе.
- Разбавитель (1x) хранить до 1 месяца при 2-8 °C.
- Хранить стандарт при 2-8 °C перед восстановлением с разбавителем и при -20 °C, после восстановления с разбавителем.

ДРУГИЕ НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетное считывающее устройство, способное измерять оптическую плотность при 450 нм.
- Пипетки (1-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл и многоканальная).
- Деионизированная или дистиллированная вода класса реагента.

ЗАБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

- **Плазма:** собрать плазму, используя 1/10 объема 0.1 М цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Центрифугировать образцы при 3000g в течение 10 минут. Развести образцы 1:500 в Разбавителе MIX и проанализировать. Неразбавленные образцы можно хранить при -20 °C или ниже в течение 3 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания (ЭДТК или гепариновая плазма также могут быть использованы в качестве антикоагулянтов).
- **Сыворотка:** Образцы должны быть собраны в сывороточную сепараторную пробирку. После формирования сгустка, центрифугировать образцы при 3000g в течение 10 минут. Удалить сыворотку. Развести образцы 1:500 в Разбавителе MIX и проанализировать. Неразбавленные образцы можно хранить при -20 °C или ниже в течение 3 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.
- **Супернатанты Культуры клеток:** Центрифугировать культуральную среду при 3000g в течение 10 минут. Собрать супернатанты и анализировать. Хранить образцы при -20 °C или ниже. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.
- **Моча:** Провести забор мочи с использованием емкости для сбора мочи. Центрифугировать образцы при 800 g в течение 10 минут и анализировать. Хранить образцы при -20 °C или ниже в течение 3 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.
- **Слюна:** Провести забор слюны, используя пробирку. Центрифугировать образцы при 800g в течение 10 минут и анализировать. Хранить образцы при -20 °C или ниже в течение 3 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.
- **Молоко:** Провести забор молока с использованием пробирки. Центрифугировать образцы при 800 g в течение 10 минут. Развести образцы 1:2 в Разбавителе MIX и проанализировать. Неразбавленные пробы можно хранить при -20 °C или ниже в течение 3 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

- Свежеприготовленные реагенты привести к комнатной температуре перед использованием.
- **MIX концентрат разбавителя (10x):** Если кристаллы образовались в концентрате, аккуратно перемешать, пока кристаллы полностью не растворятся. Развести концентрат разбавителя MIX 1:10 очищенной водой. Хранить до 1 месяца при 2-8 °C.
- **Стандарт Человеческого Адипонектина:** Восстановить 125 нг стандарта человеческого Адипонектина с 2.5 мл разбавителя MIX для получения стандартного раствора 50 нг/мл. Позволить стандарту отстояться в течение 10 минут, слегка помешивая, перед разведениями. Подготовить точки стандарта в двух или трех повторах последовательным разбавлением стандартного раствора (50 нг/мл) 1:2 с равным объемом MIX разбавителя для получения растворов 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 и 0.781 нг/мл.

Разбавитель MIX служит в качестве нулевого стандарта (0 нг/мл). Любой оставшийся раствор должен быть заморожен при -20 °С и использован в течение 30 дней.

Standard Point	Dilution	[Acpr30] (ng/ml)
P1	Standard (50 ng/ml)	50.00
P2	1 part P1 + 1 part MIX Diluent	25.00
P3	1 part P2 + 1 part MIX Diluent	12.50
P4	1 part P3 + 1 part MIX Diluent	6.250
P5	1 part P4 + 1 part MIX Diluent	3.125
P6	1 part P5 + 1 part MIX Diluent	1.563
P7	1 part P6 + 1 part MIX Diluent	0.781
P8	MIX Diluent	0.000

- **Антитела биотинилированного человеческого Адипонектина (100x):** Коротко центрифугировать биотинилированные антитела и развести нужное количество антител 1:100 с MIX разбавителем. Любой оставшийся раствор должен быть заморожен при температуре -20 °С.
- **Концентрат буфера для промывок (20x):** Если кристаллы образовались в концентрате, осторожно перемешать до тех пор, пока кристаллы полностью не растворятся. Развести концентрат промывочного буфера 1:20 с химически чистой водой.
- **SP конъюгат (100x):** Коротко центрифугировать SP Конъюгат и развести нужное количество конъюгата 1:100 с MIX разбавителем. Любой оставшийся раствор должен быть заморожен при температуре -20 °С.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Приготовьте все реагенты, рабочие разведения стандарта и образцы, как описано в данной инструкции. Перед началом анализа все реагенты должны достичь комнатной температуры. Тестирование выполняется при комнатной температуре (20-30 °С).
- Достаньте лишние стрипы из рамки-держателя и немедленно поместите их обратно в оригинальный алюминиевый пакет с осушителем. Тщательно закройте пакет для предотвращения попадания влаги и храните его в вакуумном эксикаторе.
- Внесите по 50 мкл стандартов или образцов в соответствующие лунки. Закройте лунки адгезивной пленкой и инкубируйте 1 час. Установите таймер после внесения последнего образца.
- Промойте лунки 5 раз, используя по 200 мкл буфера для промывок на лунку на один цикл промывки. На каждом шаге переворачивайте микропланшет, сливайте жидкость из лунок, затем постучите 4-5 раз по фильтровальной бумаге, для полного удаления остатков жидкости из лунок. При использовании машины, промойте шесть раз 300 мкл промывочного буфера, а затем пластину перевернуть, удалить содержимое; ударить 4-5 раз по абсорбирующему материалу, чтобы полностью удалить жидкость.
- Внесите по 50 мкл биотинилированных антител анти-Адипонектина во все лунки и инкубируйте в течение 1 часа.
- Промойте микропланшет как описано выше.
- Внесите по 50 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидаза во все лунки и инкубируйте 30 минут. Включите микропланшетный ридер и запустите программу заранее.
- Промойте микропланшет как описано выше.
- Внесите по 50 мкл хромогенного субстрата во все лунки и инкубируйте 10 минут или до развития оптимального окрашивания. Аккуратно постучите по краю микроплшета для тщательного перемешивания и удалите пузырьки воздуха с помощью иголки для пипетки.
- Внесите по 50 мкл стоп-раствора во все лунки. Окрашивание изменится с голубого на желтое.
- Считайте абсорбцию (ОП) с помощью микропланшетного ридера при длине волны 450 нм **немедленно**. Если доступна коррекция волны, вычтите показания при 570 нм от тех, которые получены при 450 нм, чтобы исправить оптические несовершенства. В противном случае, считать результаты только при 450 нм. Пожалуйста, обратите внимание, что некоторые нестабильные черные частицы могут сконцентрироваться в высоких точках после остановки реакции в течение приблизительно 10 минут, что снизит показания.

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

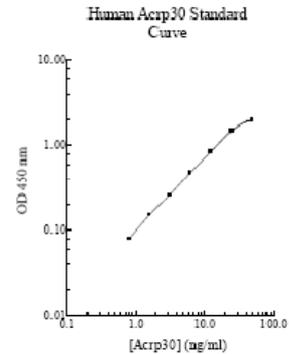
- Рассчитайте среднее значение поглощения (ОП) для каждого триплета стандартов и образцов.
- Для построения калибровочной кривой используйте полулогарифмическую графическую бумагу, откладывая по оси ординат (Y) среднее значение ОП при 450 нм для каждого стандарта, а по оси абсцисс (X) соответствующие значения

концентраций стандартов. Оптимальная кривая может быть получена регрессионным анализом с использованием log-log или 4-параметрической логистической аппроксимации.

- Определите концентрации в образцах по калибровочной кривой и умножьте полученное значение на соответствующий коэффициент разведения.

КАЛИБРОВОЧНАЯ КРИВАЯ

- Приведенная ниже калибровочная кривая дана только в демонстрационных целях. Калибровочная кривая должна быть включена в каждую постановку.



РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Этот анализ распознает как естественный, так и рекомбинантный человеческий Адипонектин. Он может обнаружить и глобулярный домен, и полноформатный Адипонектин.
- Минимально определяемая концентрация Адипонектина составляет ~ 0.7 нг/мл.
- Коэффициент вариации внутри и между сериями составляют 4.3 % и 7.2 %, соответственно.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Разведение Образца	Средний Процент от Ожидаемого значения, %	
	Плазма	Сыворотка
1:250	90	96
1:500	98	98
1:1000	104	105

Разведение Образца	Средний Процент от Ожидаемого значения, %	
	Слюна	Молоко
Без разведения	91	93
1:2	97	98
1:4	104	103

Разведение Образца	Средний Процент от Ожидаемого значения, %	
	Моча	
Без разведения	89	
1:2	98	
1:4	103	

ВОССТАНОВЛЕНИЕ

Значение добавленного Стандарта	2 - 20 нг/мл
Восстановление, %	94 - 114 %
Среднее значение, %	99 %

Референсное Значение

- Нормальный уровень Адипонектина плазмы находится в диапазоне от 3 до 14 мкг/мл.



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