

НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЛЮДСЬКОГО ACE2 В СЕЧІ І НАДОСАДОВІЙ РІДИНІ КЛІТИННОЇ КУЛЬТУРИ

AG-45A-0022EK-KI01, ACE2 (human) ELISA Kit

Каталог. №: **AG-45A-0022EK-KI01**

Методика від **14-03-2011**

Кількість : **96**

Версія **2**

Виробник : **Adipogen, Inc.**

(Швейцарія)



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

1. Призначення

Набір ІФА ACE2 (людським) призначений для in-Vitro використання з кількісним визначенням людського ACE2 в сечі і надосадовій рідині клітинної культури. Цей набір ІФА призначений тільки для дослідницьких цілей.

2. Введення (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

3. Література (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

4. Принцип аналізу

Цей аналіз являє собою ІФА типу «сандвіч» (ELISA) для кількісного визначення людського ACE2 в біологічних рідинах. Поліклональні антитіла, специфічні для ACE2, були попередньо нанесені на поверхні лунок 96-лунокового планшета. Стандарти та зразки пікетуються в лунки для зв'язування з антитілом з покриттям. Після ретельного промивання для видалення незв'язаних сполук, ACE2 визначається додаванням біотинильованого поліклонального антитіла, специфічного для ACE2 (Антитіло виявлення). Після видалення надлишку біотинильованого антитіла додається Стрептавідин, кон'югований з HRP (Детектор). Після остаточної промивки, активність пероксидази визначається кількісно з використанням субстрату 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (TMB). Інтенсивність кольорової реакції вимірюють при 450 нм після підкислення і вона прямо пропорційна концентрації ACE2 в зразках.

5. Обробка та Зберігання

- Реагент повинен зберігатися при температурі 2-8 °С, коли він не використовується.
- Планшет і реагенти повинні бути кімнатної температури перед використанням.
- Не надавайте реагенти впливу температур вище 25 °С.

6. Склад Набору

1 пластина покрита людським антитілом ACE2	(смужки 12 x 8 лунок)
1 пляшка Промивного Буфера 10X	(50 мл)
1 пляшка Розчинника 5X	(50 мл)
1 пляшка Антитіл виявлення	(12 мл)
1 флакон Детектор 100X (Стрептавідин, маркований HRP)	(150 мкл)
1 флакон людського Стандарту ACE2 (ліофілізований)	(50 нг)
1 флакон людського зразка ACE2 QC (ліофілізований)	
1 пляшка Розчине субстрату TMB	(12 мл)
1 пляшка Стоп-розчине	(12 мл)
3 пластини герметики (поліетиленова плівка)	

7. Необхідні матеріали, що не входять в комплект

- Мікропланшетний читач при 450 нм, з довжиною хвилі корекції, встановленій на довжині хвилі 540 нм або 570 нм
- Калібровані точні одно- і багатоканальні піпетки. Одноразові наконечники для піпеток
- Деіонізована вода
- Мікропробірки або еквівалент для приготування розведення
- Одноразові пластикові контейнери для приготування робочих буферів
- Вошер: автоматичний або ручний
- Скляні або пластикові пробірки для розбавлення і аліквотування

стандарту

8. Загальний Протокол ІФА

8.1. Підготовка та Зберігання реагентів

ПРИМІТКА: Підготувати тільки відповідну кількість буферів, необхідних для аналізу.

- **Промивний буфер 10X** повинен бути розбавлений деіонізованою водою 1:10 перед використанням (наприклад, 50 мл Промивного Буфера 10X + 450 мл води), щоб отримати Промивний Буфер 1X.
- **Розріджувач 5X** повинен бути розведений деіонізованою водою 1: 5 перед використанням (наприклад, 50 мл Розріджувача 5X + 200 мл води), щоб отримати Розріджувач 1X.
- **Детектор 100X (Стрептавідин, маркований HRP)** повинен бути розбавлений до робочої концентрації шляхом додавання 120 мкл в 12 мл Розріджувача 1X (1:100).

ПРИМІТКА: Розведений Детектор використовується протягом однієї години після приготування.

- **Стандарт Людського ACE2 (STD)** повинен бути розведений з 1 мл деіонізованої води.
 - Цим розведенням отримується вихідний розчин 50 нг/мл. Перемішайте стандарт для забезпечення повного розчинення і залишіть стандарт як мінімум на 15 хвилин. Добре перемішати перед проведенням розведень.

ПРИМІТКА: Відновлений стандарт аліквотується і зберігається при -20 °С.

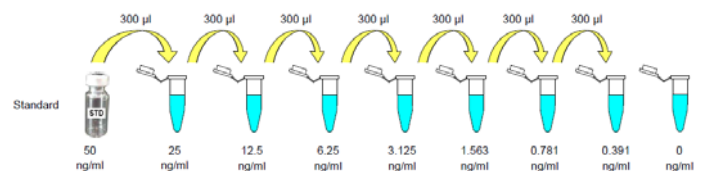
- Розвести концентрат білкового стандарту (STD) (**50 нг/мл**) в Розріджувачі 1X. Рекомендується семи точкова Стандартна крива з використанням 2-кратних серійних розведень в Розріджувачі 1X.
- Пропоновані стандарти:
25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.391 і 0 нг/мл.

- **Зразок QC людського ACE2** повинен бути відновлений з 1 мл деіонізованої води.

- Зверніться до сертифіката аналізу для поточних даних концентрації зразка QC. Перемішайте зразок QC для забезпечення повного розчинення і залишіть зразок QC не менше ніж на 15 хвилин. Відновлений зразок QC готовий до використання, не розбавляйте його.

Розвести більше для стандартної кривої:

To obtain	Add	Into
25 ng/ml	300 µl of ACE2 (50 ng/ml)	300 µl of Diluent 1X
12.5 ng/ml	300 µl of ACE2 (25 ng/ml)	300 µl of Diluent 1X
6.25 ng/ml	300 µl of ACE2 (12.5 ng/ml)	300 µl of Diluent 1X
3.125 ng/ml	300 µl of ACE2 (6.25 ng/ml)	300 µl of Diluent 1X
1.563 ng/ml	300 µl of ACE2 (3.125 ng/ml)	300 µl of Diluent 1X
0.781 ng/ml	300 µl of ACE2 (1.563 ng/ml)	300 µl of Diluent 1X
0.391 ng/ml	300 µl of ACE2 (0.781 ng/ml)	300 µl of Diluent 1X
0 ng/ml	300 µl of Diluent 1X	Empty tube



8.2. Забір проб, Зберігання та Розведення

Сеча: Асептично зібрати сечу дня безпосередньо в стерильний контейнер. Аналізувати негайно або аліквотувати і зберігати при температурі ≤ -20 °С. Уникати повторних циклів заморожування/відтавання.

Сеча або Супернатант культури клітин повинні бути розведені в Розріджувачі 1X. Зразки, що містять видимі осадки, необхідно очистити перед використанням.

ПРИМІТКА: У якості відправної точки рекомендується розбавлення

сечі 1/2! Якщо зразки випадають за зовнішній діапазон аналізу, менше або більше розбавлення може знадобитися!

8.3. Процедура Аналізу (Контрольний список)

1.	Визначити кількість 8-лункових смуг, необхідних для аналізу, і встановити їх в рамку для поточного використання. Додаткові смужки повинні бути запечатані в пакеті з фольги і зберігатись при температурі +4 °C. ПРИМІТКА: Решта 8-лункових смуг, покритих антитілом ACE2, після відкриття можуть зберігатись при температурі +4 °C протягом до 1 місяця.
2.	Додати 100 мкл різних стандартів у відповідні лунки у двох примірниках! Одночасно додати 100 мкл розведених зразків сечі або надосадових клітинних культур у двох примірниках у лунки (див. 8.1. Підготовка та Зберігання Реагентів і 8.2. Підготовка зразків).
3.	Накрити планшет і інкубувати протягом 1 години при 37 °C .
4.	Аспірувати лунки з попереднім нанесенням і додати 300 мкл Промивного Буфера 1X за допомогою багатоканальної піпетки або автоматичного промивного пристрою. Повторити процес в цілому три рази. Після останньої промивки повне видалення рідини має важливе значення для хорошої продуктивності.
5.	Додати 100 мкл Антитіл виявлення в кожну лунку.
6.	Накрити планшет і інкубувати протягом 1 години при 37 °C .
7.	Аспірувати лунки з попереднім нанесенням і додати 300 мкл Промивного Буфера 1X за допомогою багатоканальної піпетки або автоматичного промивного пристрою. Повторити процес в цілому три рази. Після останньої промивки повне видалення рідини має важливе значення для хорошої продуктивності.
8.	Додати 100 мкл в кожну лунку розведеного Детектора (див. 8.1. Підготовка та Зберігання Реагентів).
9.	Накрити планшет і інкубувати протягом 1 години при 37 °C .
10.	Аспірувати лунки з попереднім нанесенням і додати 300 мкл Промивного Буфера 1X за допомогою багатоканальної піпетки або автоматичного промивного пристрою. Повторити процес в цілому три рази. Після останньої промивки повне видалення рідини має важливе значення для хорошої продуктивності.
11.	Додати 100 мкл в кожну лунку Розчину Субстрату ТМБ.
12.	Дозволити розвинути кольорову реакцію при кімнатній температурі (RT °C) в темряві протягом 30 хвилин .
13.	Зупинити реакцію додаванням 100 мкл Стоп-розчину. Постукати по планшету злегка, щоб забезпечити ретельне змішування. Реакція з субстратом дає синій розчин, який перетворюється на жовтий, коли додається Стоп-розчин.
	! УВАГА: КОРОЗИЙНИЙ РОЗЧИН!
14.	Виміряйте оптичну щільність при 450 нм за допомогою зчитувача ELISA протягом 30 хвилин.

9. Підрахунок Результатів

- Вивести середню величину дублюючих значень для кожного стандарту, контролю якості та зразка і відняти середнє значення бланка (отримане з точкою 0 нг/мл).
- Побудувати стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію, отриману для кожної концентрації Стандарту на горизонтальній (X) осі проти відповідної концентрації ACE2 (нг/мл) на вертикальній (Y) осі (див. 10. ТИПОВІ ДАНІ).
- Розрахувати концентрації ACE2 зразків шляхом інтерполяції формули кривої регресії, як показано вище у вигляді квадратного рівняння.
- Якщо зразки були розведені, помножити інтерпольовані значення на коефіцієнт розбавлення, щоб розрахувати концентрацію людського ACE2 в зразках.

10. Типові дані

Наступні дані отримані з використанням різних концентрацій стандарту, як описано в даному протоколі:

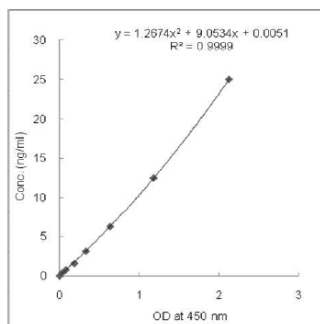


Figure: Standard curve

Standard hACE2 (ng/ml)	Optical Density (mean)
25	2.128
12.5	1.180
6.25	0.635
3.125	0.330
1.563	0.185
0.781	0.080
0.391	0.032
0	0

11. Робочі характеристики

A. Чутливість (Межа виявлення):

Найнижчий рівень ACE2, який може бути виявлений за допомогою цього тесту, складає 293 пг/мл. **ПРИМІТКА:** Межа виявлення вимірювалася шляхом додавання двох стандартних відхилень до середнього значення 50 нульових стандартів.

B. Діапазон аналізу: 0.391 нг/мл - 25 нг/мл

C. Специфічність:

Цей ІФА є специфічним для вимірювання природного і рекомбінантного людського ACE2. Він перехресно не реагує з людським ACE, людським адипонектином, людським лептином, людським резистинном, людським Nampt, людським кластеріном, людським RBP4, людським RELM-β, людським IL-23, людським ANG1, людським ANG2, людським FABP4, людським ANGPTL6, людським PAI-1, людським васпіном, мишачим RELM-α.

D. Точність в аналізі:

Шість зразків відомих концентрацій людського ACE2 аналізували в дублях 11 разів, щоб перевірити точність в межах аналізу.

Взірці	Середнє (нг/мл)	SD	CV (%)	n
1	2.785	0.169	6.079	11
2	4.120	0.254	6.164	11
3	12.680	1.257	9.914	11
4	15.034	0.807	5.365	11
5	24.705	1.319	5.338	11
6	45.697	3.724	8.149	11

E. Точність між аналізами:

Шість зразків відомих концентрацій людського ACE2 аналізували в 11 окремих аналізах, щоб перевірити точність між аналізами.

Взірці	Середнє (нг/мл)	SD	CV (%)	n
1	4.105	0.445	10.829	11
2	8.726	0.617	7.069	11
3	11.280	1.121	9.937	11
4	16.913	1.045	6.179	11
5	22.861	1.236	5.401	11
6	49.219	3.144	6.388	11

F. Відновлення:

Коли зразки (сеча) насичуються відомими концентраціями людського ACE2, середнє значення відновлення складає 95% (діапазон від 81% до 113%).

Взірці	Середнє відновлення (%)	Діапазон (%)
1	90.8	81-97
2	93.4	84-109
3	95.1	84-111
4	95.4	89-105
5	100.7	90-113

G. Лінійність:

Різні зразки людської сечі, що містять ACE2, розводили в кілька разів (від 1 до 1/4) і виміряні відновлення коливалася від 89% до 107%.

Взірці	Розведення	Очікуване (нг/мл)	Отримане (нг/мл)	% від очікуваного
1	1:1	5.928	5.928	100
	1:2	2.964	3.027	102.1
	1:4	1.482	1.403	94.7
2	1:1	8.868	8.868	100
	1:2	4.434	4.724	106.5
	1:4	2.217	2.116	95.4
3	1:1	19.314	19.314	100
	1:2	9.657	10.014	103.7
	1:4	4.829	4.315	89.4

Н. Очікувані значення:

Діапазон рівнів ACE2 в сечі становить 1 - > 10 нг/мл (від здорових донорів).

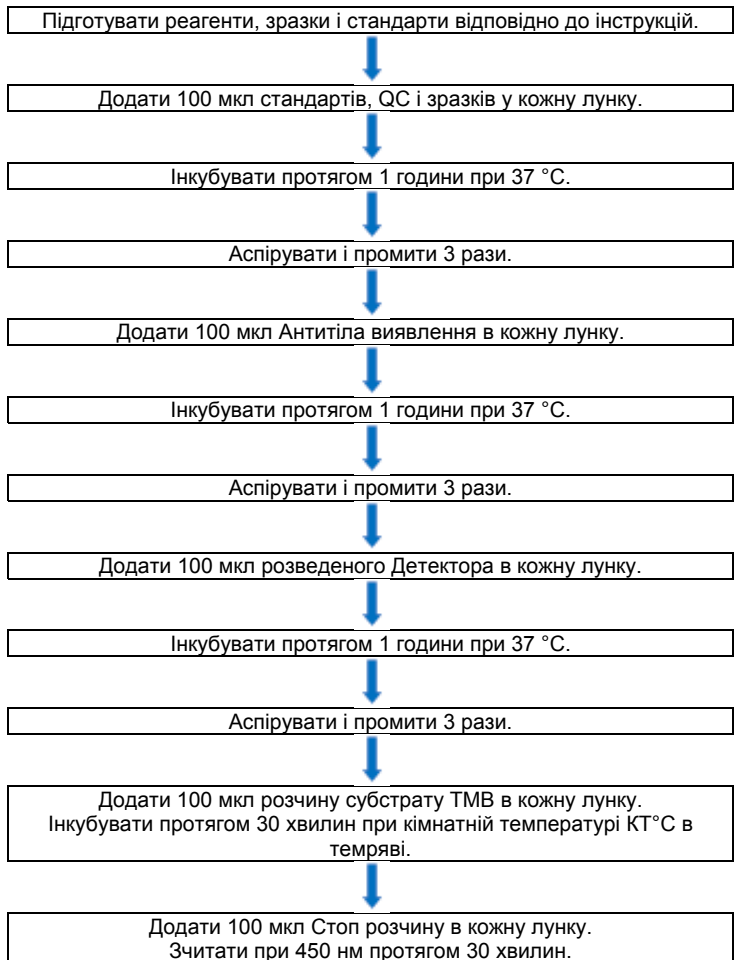
12. Технічні Поради та Обмеження

- Рекомендується, щоб всі стандарти, зразки QC і зразки аналізувались в двох примірниках.
- Не змішуйте залишки реагентів з тими, які зарезервовані для додаткових лунок.
- Реагенти з набору з об'ємом менше 100 мкл слід центрифугувати.
- Залишкову промивну рідину необхідно видалити з лунок після останньої промивки постукавши планшетом по паперовому рушнику.
- Кристали можуть бути в Розчині 10X через високу концентрацію солі у вихідних розчинах. Кристали легко розчиняються при кімнатній температурі або при 37 °C перед розведенням буферних розчинів.
- Після того, як реагенти були додані до 8-лункових смужок, НЕ ДОЗВОЛЯЙТЕ смужкам ВИСИХАТИ в будь-який час проведення тесту.
- Зберігати Розчин ТМБ в захищеному від світла місці.
- Стоп-розчин містить фосфорну кислоту. Навіть з розбавленням, зі Стоп-розчином необхідно працювати в рукавичках, засобах захисту очей і захисному одязі.

13. Пошук несправностей

ПРОБЛЕМА	МОЖЛИВІ ПРИЧИНИ	РІШЕННЯ
Немає сигналу або слабкий сигнал	Пропущений основний реагент	Переконайтесь, що всі реагенти були додані в правильному порядку.
	Промивання занадто жорстке	Використовувати автоматичний вошер, якщо це можливо.
	Час інкубації невідповідний	Часів інкубації слід дотримуватися, як зазначено в інструкції.
	Налаштування рідера не є оптимальними	Перевірити довжини хвилі і установку фільтра в планшет-рідері.
	Некоректна температура аналізу	Використовувати рекомендовані температури інкубації. Привести субстрати до кімнатної температури перед використанням.
Високий фон	Концентрація Детектора зависока	Використовувати рекомендований коефіцієнт розведення.
	Неналежне промивання	Переконайтесь, що всі лунки заповнені промивним буфером і аспіровані повністю.
Погана стандартна крива	Лунки повністю не аспіровані	Повністю аспірувати лунки між кроками.
	Реагенти погано перемішані	Впевнитись, що реагенти ретельно перемішані.
Неочікувані результати	Пропущені реагенти	Впевнитись, що реагенти були підготовлені правильно і додані в правильному порядку.
	Помилка в розведенні	Перевірити техніку піпетування і ще раз перевірити розрахунки.

14. Блок-схема аналізу



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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