

# НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНГІОТЕНЗИНУ II У ЗРАЗКАХ ПЛАЗМИ, СИРОВАТКИ І СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЛЮДИНИ

## EA3501-1, Human Angiotensin II ELISA

Каталог. № : EA3501-1

Версія 1.9

Кількість : 96

Виробник : AssayPro, (США)



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

### ВСТУП

Ангіотензин II, основний ефektorний пептид в реніна-ангіотензиновій системі, діє як стимулятор росту і ангіогенний фактор через рецептори ангіотензину 1-го типу II (1). Імовірно, Ангіотензин II бере участь у регуляції клітинної проліферації (2), ангіогенезисі (3), запаленні (4) і раку (1).

### ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір AssayMax людського Ангіотензину II ELISA призначений для виявлення Ангіотензину II в плазмі, сироватці і супернатантах клітинних культур людини. Цей аналіз використовує кількісну методику імуоферментного аналізу типу сендвіч, яка вимірює Ангіотензин II менш, ніж за 5 годин. Поліклональні антитіла, специфічні для Ангіотензину II, були попередньо нанесені на мікропланшет. Ангіотензин II в стандартах і зразках затиснутий іmobilізований антитілом і специфічним біотинильованим поліклональним антитілом Ангіотензину II, який розпізнається кон'югатом стрептавідин-пероксидази. Всі незв'язані матеріали потім вимиваються і субстрат ферменту пероксидази додається. Розвиток кольору зупиняється, і інтенсивність кольору вимірюється.

### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Підготувати все реагенти (робочий буфер для розведення, промивний буфер, стандарти, біотинильоване антитіло і SP-кон'югат) відповідно до інструкції, перед запуском тесту.
- Підготуйте всі зразки до проведення аналізу. Коефіцієнт розбавлення для зразків вказаний в цьому Протоколі. Тим не менш, користувач повинен самостійно визначити оптимальний коефіцієнт розведення.
- Осадити частинки у флаконі SP-кон'югату і у флаконі біотинильованих антитіл перед їх відкриттям і використанням.
- Цей набір призначений для використання в дослідницьких цілях.
- Набір не слід використовувати після закінчення терміну придатності.
- Стоп розчин є кислим розчином.

### РЕАГЕНТИ

- **Мікропланшет Людського Ангіотензину II:** 96-лунковий полістироловий мікропланшет (12 стрипів по 8 лунок), покритий поліклональними антитілами до Ангіотензину II.
- **Ущільнювальні стрічки:** Кожен комплект містить 3 нарізані, чутливі до тиску стрічки ущільнювачів, які можуть бути підігнані під формат індивідуального аналізу.
- **Стандарт Людського Ангіотензину II:** Ангіотензин II в буферній білкової основі (8 нг, ліофілізований).
- **Біотинильоване антитіло Людського Ангіотензину II (80x):** 80x біотинильовані поліклональні антитіла до Ангіотензину II (100 мкл).
- **Концентрат розчинника ІФА (10x):** 10x концентрована буферна білкова основа (20 мл).
- **Концентрат промивного буфера (20x):** 20x концентровані буферні поверхнево-активні речовини (30 мл, 2 пляшки).
- **Кон'югат стрептавідин-пероксидази (SP-кон'югат):** 100x концентрат (80 мкл).
- **Субстрат хромогену:** готовий до використання стабілізований пероксидазо хромогенний субстрат тетраметилбензидину (8 мл).
- **Стоп розчин:** 0.5 N соляної кислоти для зупинки реакції хромогенного субстрату (12 мл).

### УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

- Зберігайте компоненти набору при температурі 2-8 °C або -20 °C після прибуття до закінчення терміну придатності.
- Зберігайте SP-кон'югат і біотинильоване антитіло при -20 °C.
- Зберігайте мікропланшет, концентрат розріджувача (10x), миючий буфер, стоп розчин, і субстрат хромогену при температурі 2-8 °C.
- Невикористані лунки мікропланшетів можуть бути повернуті в пакет з фольги з осушувачем і запечатані. Зберігати до 1 місяця у вакуумному ексикаторі.
- Розріджувач (1x) зберігати до 1 місяця при 2-8 °C.
- Зберігати стандарт при 2-8 °C перед відновленням з розріджувачем і при -20 °C після відновлення з розріджувачем.

### ІНШІ НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ

- Мікропланшетний зчитувальний пристрій, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм.
- Піпетки (1-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл і багатоканальна).
- Деіонізована або дистильована вода класу реагенту.

### ЗАБІР, ПІДГОТОВКА ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКА

**Плазма:** Зібрати плазму, використовуючи 1/10 об'єму 0.1 M цитрату натрію в якості антикоагулянту. Центрифугувати зразки при 3000g протягом 10 хвилин. Видалити плазму і проаналізувати. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °C або нижче протягом 3 місяців. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. (Зразки плазми повинні містити о-фенантроліну 0.44 мМ, 25 мМ ЕДТА, 1 мМ р-гідрокси-mercibenzоіс кислоти і пепстатина А 0.12 мМ). Для низького рівня Ангіотензину II скористайтеся протоколом екстракції, зазначеним нижче:

### Протокол екстракції Ангіотензину II

Буфер А: 1% трифтороцтової кислоти (TFA, HPLC) в H<sub>2</sub>O Буфер В: 60% ацетонітрилу (HPLC) в 1% TFA

1. Підкислити зразок з рівною кількістю буфера А (1 мл зразка: 1 мл буфера А). Перемішати і центрифугувати зразки при 6000g протягом 20 хвилин при 4 °C.
  2. Тампонувати екстракційну колонку з використанням 200 мг смоли C18. Попередньо врівноважити колонку з 1 мл буфера В один раз, а потім з 3 мл буфера А три рази.
  3. Завантажити підкислений розчин плазми на попередньо оброблену колонку C18.
  4. Повільно промити колонку 3 мл буфера А двічі.
  5. Елюювати пептид повільно з 3 мл буфера В один раз і зібрати елюент.
  6. Випарувати і висушити елюент в сублімаційній камері або використовувати відповідну заміну.
  7. Зберігати висушений екстракт при -20 °C і виконувати дослідження якомога раніше. Розвести висушений екстракт 200 мкл розчинника ІФА перед аналізом. Перевірте рН проби з рН папером. Якщо рН зразка нижче 6.5, нейтралізувати зразок з 20 мкл 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Якщо значення пептиду перевищує або не потрапляє в діапазон виявлення, розбавте або концентруйте зразок відповідно.
- **Сироватка:** Зразки повинні бути зібрані в сироваткову сепараторну пробірку. Після формування згустку, центрифугувати зразки при 3000g протягом 10 хвилин. Видалити сироватку і провести аналіз. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °C або нижче протягом 3 місяців. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. (Зразки сироватки повинні містити о-фенантроліну 0.44 мМ, 25 мМ ЕДТА, 1 мМ р-гідрокси-mercibenzоіс кислоти і пепстатина А 0.12 мМ). Для низького рівня Ангіотензину II скористайтеся протоколом екстракції, як описано вище.
  - **Супернатанти Культури клітин:** Середа культури клітин повинна містити о-фенантроліну 0.44 мМ, 25 мМ ЕДТА, 1 мМ р-гідрокси-mercibenzоіс кислоти і пепстатина А 0.12 мМ в процесі культивування. Після росту клітин до ідеальної щільності, видалити культуральне середовище і центрифугувати середу культури клітин при 3000 g протягом 10 хв. для видалення залишків. Зібрати супернатанти і додати свіжі о-фенантролін 0.44 мМ, 25 мМ ЕДТА, 1 мМ р-гідрокси-mercibenzоіс кислоту і пепстатин А 0.12 мМ до середовища і проаналізувати. Нерозбавлені зразки можна зберігати при -20 °C або нижче протягом 3 місяців. Уникати повторних циклів заморожування-відтавання.

### ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

- Свіжорозведені реагенти привести до кімнатної температури перед використанням.

- **ІФА концентрат для розведення (10x):** Якщо кристали утворилися в концентраті, акуратно перемішати, поки кристали повністю не розчиняться. Розвести концентрат для розведення ІФА 1:10 очищеною водою. Зберігати до 1 місяця при 2-8 °С.
- **Стандартна крива:** Відновити 8 нг стандарту людського Ангіотензину II з 4 мл розріджувача ІФА для отримання стандартного розчину 2 нг/мл. Дозволити стандарту відстоятися протягом 10 хвилин, злегка помішуючи, перед розведеннями. Розвести стандарт (2 нг/мл) у співвідношенні 1:2 розріджувачем ІФА для отримання розчину 1 нг/мл. Підготувати точки стандарту в двох або трьох повторах послідовним розведенням стандартного розчину (1 нг/мл) 1:2 з рівним об'ємом ІФА розріджувача для отримання розчинів 0.5, 0.25, 0.125 і 0.063 нг/мл. Розріджувач ІФА служить в якості нульового стандарту (0 нг/мл). Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °С і використаний протягом 30 днів.

Standard Point	Dilution	[ANGII] (ng/ml)
P1	Standard (2 ng/ml) + 1 part EIA Diluent	1.000
P2	1 part P1 + 1 part EIA Diluent	0.500
P3	1 part P2 + 1 part EIA Diluent	0.250
P4	1 part P3 + 1 part EIA Diluent	0.125
P5	1 part P4 + 1 part EIA Diluent	0.063
P6	EIA Diluent	0.000

- **Антитіла біотинильованого людського Ангіотензину II (80x):** Коротко центрифугувати кон'югат антитіл так, щоб повністю зібрати реагент на дні пробірки, і розвести необхідну кількість кон'югату в 80 разів EIA буфером для розведення. Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °С.
- **Концентрат буфера для промивок (20x):** Розвести концентрат промивного буфера 1:20 дистильованою або деіонізованою водою.
- **SP кон'югат (100x):** Коротко центрифугувати SP Кон'югат так, щоб повністю зібрати реагент на дні пробірки, і розвести необхідну кількість кон'югату в 100 разів EIA буфером для розведення. Будь-який розчин, що залишився, повинен бути заморожений при температурі -20 °С.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

- Приготуйте все реагенти, робочі розведення стандарту і зразки, як описано в даній інструкції. Перед початком аналізу всі реагенти повинні досягти кімнатної температури. Тестування виконується при кімнатній температурі (20-30 °С).
- Дістаньте зайві стрипи з рамки-утримувача і негайно помістіть їх назад в оригінальний алюмінієвий пакет з осушувачем. Ретельно закрийте пакет для запобігання попадання вологи і зберігайте його у вакуумному ексікаторі.
- Внесіть по 50 мкл стандартів або зразків у відповідні лунки. Закрийте лунки адгезивною плівкою та інкубуйте 2 години. Встановіть таймер після внесення останнього зразка.
- Промийте лунки 5 разів, використовуючи по 200 мкл буфера для промивок на лунку на один цикл промивки. На кожному кроці перевертайте мікропланшет, зливайте рідину з лунок, потім постукайте 4-5 разів по фільтрувальному папері, для повного видалення залишків рідини з лунок.
- Внесіть по 50 мкл біотинильованих антитіл анти-Ангіотензину II в усі лунки і інкубуйте протягом 2 годин.
- Промийте мікропланшет як описано вище.
- Внесіть по 50 мкл кон'югату стрептавідин-пероксидази в усі лунки та інкубуйте 30 хвилин. Увімкніть мікропланшетний рідер і запустіть програму заздалегідь.
- Промийте мікропланшет як описано вище.
- Внесіть по 50 мкл хромогенного субстрату в усі лунки та інкубуйте 20 хвилин або до розвитку оптимального фарбування. Акуратно постукайте по краю мікропланшетів для ретельного перемішування і видаліть бульбашки повітря за допомогою наконечника для піпетки.
- Внесіть по 50 мкл стоп-розчину в усі лунки. Фарбування зміниться з блакитного на жовте.
- Зчитайте абсорбцію (ОП) за допомогою мікропланшетного рідера при довжині хвилі 450 нм негайно.

#### РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

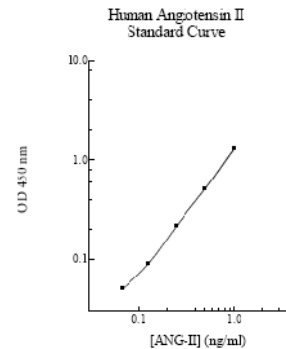
- Розрахуйте середнє значення поглинання (ОЩ) для кожного триплета стандартів і зразків.
- Для побудови калібрувальної кривої використовуйте напівлогарифмічний графічний папір, відкладаючи по осі ординат (Y) середнє значення ОЩ при 450 нм для кожного стандарту, а по осі абсцис (X) відповідні значення концентрації

стандартів. Оптимальна крива може бути отримана регресійним аналізом з використанням log-log або 4-параметричної логістичної апроксимації.

- Визначте концентрації в зразках з калібрувальної кривої і помножьте отримане значення на відповідний коефіцієнт розведення.

#### КАЛІБРУВАЛЬНА КРИВА

- Наведена нижче калібрувальна крива дана тільки в демонстраційних цілях. Калібрувальна крива повинна бути включена в кожен постановку.



#### РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Мінімально обумовлена концентрація Ангіотензину II складає 0.06 нг/мл.
- Коефіцієнт варіації всередині та між серіями складає 4.9% і 7.0%, відповідно.

#### ПЕРЕХРЕСНА РЕАКТИВНІСТЬ

Види	Перехресна реактивність, %
Собаки (гонча)	Немає
Бичачий	Немає
Мавпи	> 50 %
Миші	Немає
Щура	Немає
Свини	> 40 %
Речовина	Перехресна реактивність, %
Ангіотензин I	20%
Ангіотензин III	30%
Ангіотензин II	100%



#### 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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)