

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЛЮДСЬКОГО ФРАКТАЛКІНУ/СХЗСЛ1

## **MBS355250, Human Fractalkine/CX3CL1**

Кат. № : **MBS355250**  
Виробник : **MyBioSource (США)**

Методика від



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

**Каталог №:** MBS355250

**Розмір:** 96 тестів

**Діапазон:** 156 пг/мл - 10000 пг/мл

**Чутливість** < 50 пг/мл

**Зберігання та термін придатності:** зберігати при 2-8 °C 6 місяців, або при -20 °C протягом 12 місяців.

**Застосування:** Для кількісного виявлення Фракталкіну у сироватці, плазмі, рідинах організму, лізатах тканин або супернатантах клітинної культури людини.

### Вступ

Хемокін (мотив С-Х3-С) ліганду 1 (CX3CL1), також відомий як фракталкін (у людини) та нейротактин (у мишей), є великим білком цитокіну з 373 амінокислотами, він містить безліч доменів і є єдиним відомим членом сімейства хемокінів CX3C. Його ген розташований на 16-й хромосомі людини разом з деякими хемокінами CC, відомими як CCL17 і CCL22. CX3CL1 виробляється у вигляді довгого білка (з 373 амінокислотами у людини) з розширеним муциноподібним стеблом і доменом хемокіну вгорі. Муциноподібне стебло дозволяє йому зв'язуватися з поверхнею певних клітин. Однак також спостерігали розчинну версію цього хемокіну (90 кД). CX3CL1 виконує свою адгезивну та міграційну функції, взаємодіючи з рецептором хемокіну CX3CR1.

### Принцип аналізу

Цей набір базується на технології імуносорбентного ферментно-зв'язаного аналізу типу сендвіч. Поліклональне антитіло анти-фракталкіну попередньо нанесене в 96-лункові планшети. А в якості антитіл виявлення використовувались кон'юговані з біотином поліклональні антитіла анти-фракталкіну. Стандарти, досліджувані зразки та кон'юговані з біотином антитіла виявлення згодом додавали до лунок та промивали промивним буфером. Додавали комплекс Авідин-Біотин-Пероксидаза і незв'язані кон'югати вимивались буфером для промивання. Субстрати ТМВ використовувались для візуалізації ферментативної реакції HRP. ТМВ каталізувались HRP для отримання продукту синього кольору, який змінився на жовтий після додавання кислого стоп-розчину. Щільність жовтого кольору пропорційна кількості фракталкіну зразка, затриманого на планшеті. Зчитати ОЩ поглинання при 450 нм на мікропланшетному зчитувачі, і тоді можна розрахувати концентрацію фракталкіну.

### Компоненти набору

1. Один 96-лунковий планшет, попередньо покритий антитілом до фракталкіну людини
2. Ліофілізовані стандарти фракталкіну людини: 2 пробірки (10 нг/пробірку)
3. Буфер для розведення зразків/стандарту: 30 мл
4. Біотин-кон'юговані антитіла до фракталкіну людини (Концентровані): 130 мкл. Розведення: 1:100
5. Буфер для розведення антитіл: 12 мл
6. Комплекс Авідин-Біотин-Пероксидаза (АВС) (концентрований): 130 мкл. Розведення: 1:100
7. Буфер для розведення АВС: 12 мл
8. ТМБ субстрат: 10 мл
9. Стоп-розчин: 10 мл
10. Буфер для промивання (25X): 30 мл

**Примітка: Відновіть стандарти та тестові зразки за допомогою Компонента 3.**

### Необхідний матеріал, що не надається з набором

1. Інкубатор на 37 °C
2. Зчитувач мікропланшетів (довжина хвилі: 450 нм)
3. Точна піпетка та одноразові наконечники піпетки
4. Автоматизований вошер для пластин
5. Шейкер ІФА
6. 1,5 мл пробірки Еппендорфа
7. Кришка пластини
8. Поглинаючі фільтрувальні папери
9. Пластикова або скляна ємність об'ємом понад 1 л

### Протокол

#### • Підготовка зразка та реагентів

#### 1. Зразок

Виділіть тестові зразки швидко після збору, а потім проаналізуйте негайно (протягом 2 годин). Або аліквотуйте і зберігайте при -20 °C протягом тривалого терміну. Уникайте декількох циклів заморожування-відтавання.

- ❖ **Тканинний лізат, рідини організму та супернатанти клітинної культури:** Центрифугуйте для видалення осаду, негайно проаналізуйте або аліквотуйте та зберігайте при температурі -20 °C.
- ❖ **Сироватка:** Коагулюйте сироватку при кімнатній температурі (близько 4 годин). Центрифугуйте при приблизно 1000xg протягом 15 хв. Негайно проаналізуйте сироватку або аліквотуйте і зберігайте при температурі -20 °C.
- ❖ **Плазма:** Зберіть плазму з гепарином в якості антикоагулянта. Центрифугуйте протягом 15 хвилин при 1000xg протягом 30 хвилин після збору. Проаналізуйте негайно або аліквотуйте і зберігайте заморожену при -20 °C. Цитрат та ЕДТА тут не можна використовувати як антикоагулянт.

### Примітка:

1. Коагулюйте разки крові повністю, потім центрифугуйте, щоб уникнути гемолізу та утворення частинок.
2. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> не можна використовувати в якості консерванту досліджуваного зразка, оскільки він є інгібітором для HRP.

### >> Настанова щодо розведення зразків

Кінцевий споживач повинен спочатку оцінити концентрацію цільового білка в досліджуваному зразку та вибрати належний коефіцієнт розведення, щоб розведена цільова концентрація білка була в межах оптимального діапазону виявлення набору. Зразок розбавляють наданим буфером для розведення, і на практиці може знадобитися кілька випробувань. Зразок для випробування повинен бути добре змішаний з буфером для розведення.

- ❖ **Висока цільова концентрація білка (100-1000 нг/мл):** Розведення: 1:100, тобто додайте 1 мкл зразка в 99 мкл буфера для розведення Зразка/Стандарту (компонент 3 набору).
- ❖ **Середня цільова концентрація білка (10-100 нг/мл):** Розведення: 1:10, тобто додайте 10 мкл зразка в 90 мкл буфера для розведення Зразка/Стандарту (компонент 3 набору).
- ❖ **Низька цільова концентрація білка (156-10 000 пг/мл):** Розведення: 1:2, тобто додайте 50 мкл зразка в 50 мкл буфера для розведення Зразка/Стандарту (компонент 3 набору).
- ❖ **Дуже низька цільова концентрація білка (≤156 пг/мл):** Не потрібно розбавляти або розбавляти 1:2.

### 2. Промивний буфер

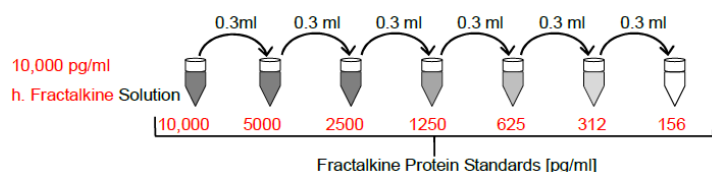
Розбавте концентрований промивний буфер у 25 разів (1:25) дистильованою водою (тобто додайте 30 мл концентрованого промивного буфера в 720 мл дистильованої води).

### 3. Стандарт

Відновлення ліофілізованого Стандарту Фракталкіну Людини (компонент 2 набору): стандартний розчин слід готувати не більше ніж за 2 години до аналізу. Дві пробірки стандарту входять до кожного набору. Використовуйте одну пробірку для кожного експерименту. **(Примітка: Не розбавляйте стандарт безпосередньо на планшеті).**

- a. 10000 пг/мл стандартного розчину: Додайте **1 мл** буфера для розведення Зразка/Стандарту (компонент 3 набору) в одну стандартну (компонент 2 набору) пробірку, тримайте пробірку при кімнатній температурі протягом 10 хв і ретельно перемішуйте.

- b. 5000 пг/мл → 156 пг/мл стандартних розчинів: Позначте 6 пробірок Еппендорфа з 5000 пг/мл, 2500 пг/мл, 1250 пг/мл, 625 пг/мл, 312 пг/мл, 156 пг/мл відповідно. Аліквотуйте **0,3 мл** буфера для розведення Зразка/Стандарту (компонент 3 набору) у кожну пробірку. Додайте **0,3 мл** вищезазначеного стандартного розчину 10 000 пг/мл в 1-у пробірку і ретельно перемішайте. Перенесіть **0,3 мл** з 1-ої пробірки у другу пробірку і ретельно перемішайте. Перенесіть **0,3 мл** з 2-ої пробірки в 3-ю пробірку і ретельно перемішайте, і так далі.



**Примітка:** Стандартні розчини найкраще використовувати протягом 2 годин. Стандартний розчин 10 000 пг/мл слід використовувати протягом 12 годин. Або зберігати при температурі -20 °C до 48 годин. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.

**4. Приготування робочого розчину антитіла анти-людського Фракталкіну, кон'югованого з Біотином (компонент 4 набору):** готуйте не більше ніж за 2 години до експерименту.

- Обчисліть загальний об'єм робочого розчину: 0,1 мл/лунку × кількість лунок. (Дозвольте на 0,1-0,2 мл більше загального об'єму).
- Розбавте антитіла анти-людського Фракталкіну, кон'югованого з Біотином (компонент 4 набору) буфером для розведення антитіл (компонент 5 набору) при 1:100 і ретельно перемішайте, тобто додайте 1 мкл антитіла анти-людського Фракталкіну, кон'югованого з Біотином, до 99 мкл буфера для розведення антитіл.

**5. Приготування робочого розчину комплексу Авідин-Біотин-Пероксидаза (АВС) (компонент 6 набору):** готуйте не більше ніж за 1 годину до експерименту.

- Обчисліть загальний об'єм робочого розчину: 0,1 мл/лунку × кількість лунок. (Дозвольте на 0,1-0,2 мл більше загального об'єму).
- Розведіть комплекс Авідин-Біотин-Пероксидаза (АВС) (компонент 6 набору) буфером для розведення АВС (компонент 7 набору) 1:100 і ретельно перемішайте, тобто додайте 1 мкл комплексу Авідин-Біотин-Пероксидаза (АВС) до 99 мкл буфера для розведення АВС.

**Процедура аналізу**

Перш ніж додати в лунки, врівноважте робочий розчин АВС і субстрат ТМВ (компонент 8 набору) протягом принаймні 30 хвилин при кімнатній температурі (37 °C). Рекомендуються побудувати стандартну криву для кожного тесту.

- Встановіть лунки для стандарту, зразка та контролю (нульова) на планшеті з попереднім нанесенням відповідно, а потім запишіть їх положення. Рекомендуються вимірювати кожен стандарт і зразок у двох примірниках.
- Аліквотуйте 0,1 мл стандартних розчинів 10 000 пг/мл, 5000 пг/мл, 2500 пг/мл, 1250 пг/мл, 625 пг/мл, 312 пг/мл, 156 пг/мл у лунки для стандартів.
- Додайте в контрольну (нульову) лунку 0,1 мл буфера для розведення Зразків/Стандартів (компонент 3 набору).
- Додайте 0,1 мл належним чином розведеного зразка (людська сироватка, плазма, рідини організму, лізати тканин або супернатанти клітинної культури) у лунки для тестових зразків.
- Запечатуйте пластину кришкою та інкубуйте при 37 °C протягом 90 хвилин.
- Зніміть кришку і видаліть вміст пластини, витрясіть пластину на всмоктувальний фільтрувальний папір або інший вбираючий матеріал. **НЕ дозволяйте лункам повністю висохнути в будь-який час. Не мийте пластину!**
- Додайте 0,1 мл робочого розчину антитіл анти-людського Фракталкіну, кон'югованого з Біотином, у вищезгадані лунки (стандарту, досліджуваного зразка та нульову лунку). Додавайте розчин на дно кожної лунки, не торкаючись бічної стінки.
- Запечатуйте пластину кришкою та інкубуйте при 37 °C протягом 60 хвилин.
- Зніміть кришку та промийте пластину 3 рази за допомогою буфера для промивання (компонент 10 набору) одним із наступних способів:

**Ручне промивання:** Видаліть розчин з пластини, не торкаючись бічних стінок. Витрясіть пластину на всмоктувальний фільтрувальний папір або інший вбираючий матеріал. Кожну лунку повністю заповніть буфером для промивання (Компонент 10 набору) і легенько перемішайте на шейкері протягом 2 хвилин, потім аспіруйте вміст з пластини та витрясіть пластину на всмоктувальний фільтрувальний папір або інший вбираючий матеріал. Повторіть цю процедуру ще два рази **в загальній кількості ТРЬОХ промивань**.

**Автоматизоване промивання:** Аспіруйте вміст всіх лунок, потім промийте пластину **ТРИ рази** буфером для промивання (компонент 10 набору) (переповнення лунок буфером). Після остаточного промивання переверніть пластину та витрясіть пластину на всмоктувальний фільтрувальний папір або інший вбираючий матеріал. Рекомендуються встановити шейкер на замочування протягом 1 хвилини або струшування.

- Додайте 0,1 мл робочого розчину АВС у кожну лунку, накрийте пластину та інкубуйте при 37 °C протягом 30 хвилин.
- Зніміть кришку та промийте пластину 5 разів за допомогою промивного буфера (компонент 10 набору), і кожен раз залишайте промивний буфер в лунках протягом 1-2 хвилин (Дивіться крок 9 щодо способу миття пластин).
- Додайте 0,1 мл субстрату ТМВ (компонент 8 набору) у кожну лунку, накрийте пластину та інкубуйте при 37 °C у темряві протягом 30 хвилин. **(Примітка:** Цей час інкубації призначений лише для довідкового використання. Оптиміальний час повинен визначитися кінцевим споживачем.) Відтінки синього можна побачити в перших 3-4 лунках (з найбільш концентрованими стандартними розчинами Фракталкіну людини), інші лунки не демонструють очевидного забарвлення.
- Додайте 0,1 мл стоп-розчину (компонент 9 набору) в кожну лунку і ретельно перемішайте. Колір одразу змінюється на жовтий.
- Прочитайте ОЩ поглинання при 450 нм у зчитувачі мікропланшетів протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

Для розрахунку (відповідна  $ОЩ_{450}$ ) = ( $ОЩ_{450}$  кожної лунки) - ( $ОЩ_{450}$  нульової лунки). Стандартна крива може бути побудована як відповідна  $ОЩ_{450}$  кожного стандартного розчину (Y) проти відповідної концентрації стандартного розчину (X). Концентрацію фракталкіну людини у зразках можна інтерполювати зі стандартної кривої.

**Примітка:** Якщо вимірювані зразки були розведені, помножте коефіцієнт розведення на концентрації від інтерполяції, щоб отримати концентрацію перед розведенням.

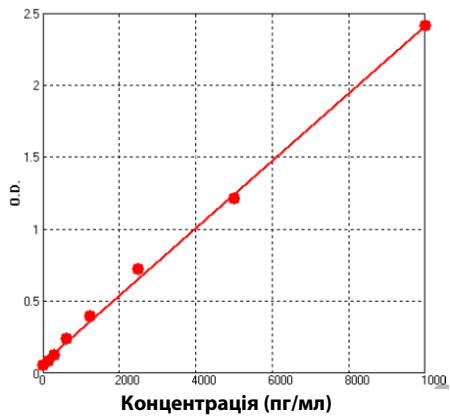
**Заходи безпеки**

- Перед експериментом центрифугуйте кожен компонент набору протягом декількох хвилин, щоб опустити всі реагенти на дно пробірки.
- Рекомендується вимірювати кожен стандарт і зразок у двох примірниках.
- НЕ дозволяйте пластині повністю висохнути в будь-який час! Оскільки сухий стан може інактивувати біологічний матеріал на пластині.
- Не використовуйте повторно наконечники піпеток та пробірки, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Не використовуйте компоненти з простроченим терміном дії та компоненти з різних партій.
- Щоб уникнути граничного ефекту інкубації пластини щодо перепадів температур (крайні лунки завжди отримують більш сильну реакцію), рекомендується врівноважити робочий розчин АВС і субстрат ТМВ протягом принаймні 30 хвилин при кімнатній температурі (37 °C) перед додаванням до лунок.
- Субстрат ТМВ (компонент 8 набору) є безбарвним і прозорим перед використанням, якщо ні, зв'яжіться з нами для заміни.

**Типові дані та стандартна крива**

Результати типового стандартного пробігу ІФА набору для визначення фракталкіну людини представлені нижче. Ця стандартна крива була сформована в нашій лабораторії лише для демонстраційних цілей. Кожен користувач повинен отримати власну стандартну криву відповідно до експерименту. (N/A = не застосовується)

X	пг/мл	0	156	312	625	1250	2500	5000	10,000
Y	ОЩ 450	0.056	0.083	0.122	0.235	0.396	0.720	1.213	2.411



#### Посилання

1. Pan, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M et al. (1997). "Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation". Nature 387 (6633): 611–617.
2. Bazan, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A et al. (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif". Nature 385 (6617): 640–644.
3. Nomiya, Imai T, Kusuda J, Miura R, Callen DF, Yoshie O (1998). "Human chemokines fractalkine (SCYD1), MDC (SCYA22) and TARC (SCYA17) are clustered on chromosome 16q13". Cytogenet. Cell Genet 81 (1): 10–11.
4. Imai, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S et al. (1997).
5. "Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion". Cell 91 (4): 521–530.



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)