



ИФА НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПОПРОТЕИН-АССОЦИИРОВАННОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ А2 ЧЕЛОВЕКА

Кат. № CSB-E08319h

(96 опред.)

- ИФА набор предназначен для количественного определения липопротеин-ассоциированной фосфолипазы А2 человека *in vitro* в образцах плазмы и сыворотки
- Срок годности _____ с даты производства
- ИФА набор предназначен только для научных исследований

105062, Москва, Фурманский переулок, дом 9/12, к. 215
телефон: +7 (495) 788-14-25, факс: +7 (495) 788-14-23,
<http://www.ld.ru> e-mail: info@LD.ru



Принцип метода

В основу теста положен количественный твердофазный иммуноферментный анализа типа «сэндвич». Микропланшет, входящий в составе набора, покрыт специфическими моноклональными антителами к Lp-PLA₂. В ходе реакции в отдельные лунки микропланшета вносят стандарты и образцы. Lp-PLA₂, присутствующая в пробах стандартов и образцов, связывается с иммобилизованными антителами. После промывки несвязавшиеся компоненты удаляются, и в каждую лунку микропланшета вносят конъюгат поликлональных антител к Lp-PLA₂ с биотином, а также комплекс авидин-пероксидаза хрена, который в свою очередь связывается с биотином. После второй промывки и удаления несвязавшихся компонентов, в каждую лунку микропланшета вносят раствор субстрата, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), действуя на который пероксидаза хрена образует цветной комплекс. Таким образом, интенсивность окраски раствора оказывается прямо пропорциональна концентрации Lp-PLA₂, присутствующей в образце. Цветную реакцию останавливают раствором серной кислоты и интенсивность окраски измеряют на планшетном фотометре при 450 нм ± 2 нм. Концентрацию Lp-PLA₂ в образцах рассчитывают исходя из калибровочной кривой, построенной на основе анализа входящих в набор стандартов.

Диапазон обнаружения

3,12 МЕ/мл-200 МЕ/мл.

Концентрации стандартов, которые рекомендуется использовать для построения калибровочной кривой 200 МЕ/мл; 100 МЕ/мл; 50 МЕ/мл; 25 МЕ/мл; 12,5 МЕ/мл; 6,25 МЕ/мл; 3,12 МЕ/мл.

Специфичность

Lp-PLA₂ человека. Никакой существенной перекрестной реактивности и интерференции не обнаружено.



Чувствительность

Минимальное детектируемое количество Lp-PLA2 человека, как правило менее 0,78 МЕ/мл. Чувствительность этого теста, или нижний предел обнаружения был определен как минимальное количество белка, которое дает в тесте отличное от нуля значение оптической плотности.

Материалы

Количество реагентов

Микропланшет	1
Стандарты	2
Буфер для разведения образцов	1 x 20 мл
Буфер для разведения антител	1 x 10 мл
Буфер для разведения конъюгата	1 x 10 мл
Антитела, конъюгированные с биотином	1 x 120 мкл
Конъюгат авидин - пероксидаза хрена	1 x 120 мкл
Буфер для промывки (X25)	1 x 20 мл
Раствор ТМБ	1 x 10 мл
Раствор для остановки реакции	1 x 10 мл

Условия хранения

- Неоткрытый набор следует хранить при температуре 2-8 °С с момента получения, а микропланшет должен быть в запечатанном пакете. Набор может использоваться на протяжении всего срока годности, указанного на этикетке, при условии, не были нарушены указанные выше условия хранения.
- Открытый микропланшет должен храниться при температуре 2-8 °С в пакете из алюминиевой фольги с осушителем, чтобы минимизировать воздействие влажного воздуха. тогда он остается стабильным до истечения срока годности, при условии, не были нарушены указанные выше условия хранения.



Подготовка реагентов

Внимание!!!

Все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры перед использованием.

Буфер для промывки. Если в стоковом растворе (X25) буфера для промывки образовались кристаллы, то его необходимо нагреть до комнатной температуры и аккуратно перемешивать до тех пор? пока кристаллы полностью не растворятся. Чтобы приготовить рабочий раствор буфера для промывки, необходимо 20 мл стокового раствора (X25) развести деионизированной или дистиллированной водой до 500 мл.

Стандарты. Перед использованием флаконы со стандартами следует отцентрифугировать при 6000-10000 об./мин. Для получения раствора стандартов 200 МЕ/мл их необходимо восстановить, для этого прилить 1 мл буфера для разведения образцов в каждый флакон. Оставьте флаконы со стандартами на 15 мин, затем можете приступить к приготовлению серии разведений, где буфер для разведения образцов служит «нулевым» контролем (0 МЕ/мл). Серию разведений можно использовать в течение **4 часов**.

Антитела, конъюгированные с биотином. Перед открытием флакон следует центрифугировать. Разбавить до рабочей концентрации, используя буфер для разведения конъюгата (1:100), соответственно.

Конъюгат авидин - пероксидаза хрена. Перед открытием флакон следует центрифугировать. Разбавить до рабочей концентрации, используя буфер для разведения антител (1:100), соответственно.

Меры предосторожности: Раствор для остановки реакции содержит кислоту, работайте в перчатках, избегайте его попадания в глаза.



Необходимые, но непоставляемые материалы и оборудование

Микропланшетный ридер, способный измерять оптическую плотность при 450 нм, с поправкой на 540 нм или 570 нм.

Пипетки и наконечники.

Деионизированная или дистиллированная вода.

Бутыль-«промывалка», ручное промывочное устройство или автоматическое промывочное устройство.

Инкубатор, который могут обеспечить стабильные условия инкубации до $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Подготовка и хранение образцов

Сыворотка. Чтобы удалить сгусток крови, образующийся в образцах спустя 30 мин, используйте пробирки для отделения сыворотки (центрифугирование при 1000 g, 15 мин). Сразу отделите сыворотку и приступайте к измерениям, либо разделите сыворотку на части и храните полученные аликвоты при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Перед использованием размороженных образцов их необходимо повторно центрифугировать (1000 g, 15 мин). Избегайте повторного замораживания образцов.

Плазма. Для подготовки образцов плазмы может быть использован цитрат, ЭДТА или гепарин в качестве антикоагулянтов. Образцы плазмы перед использованием центрифугируют при 1000 g, 15 мин. Используют либо свежеприготовленные образцы, либо размороженные, хранившиеся при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Перед использованием размороженных образцов их необходимо повторно центрифугировать (1000 g, 15 мин). Избегайте повторного замораживания образцов.

Примечание: сильно гемолизированные образцы не пригодны для использования в данном анализе.



Процедура измерения

Внимание!!!

Все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры перед использованием. Рекомендуется использовать повторные пробы, как для анализируемых образцов, так и для стандартов и контролей. Все реагенты следует вносить непосредственно в лунки микропланшета в жидком виде. Следует избегать контакта наконечника пипетки с внутренней стенкой лунок микропланшета.

1. Приготовьте все реагенты, рабочие разведения стандартов и образцы как это описано выше.
2. Приготовьте требуемое для проведения анализа число «стрипов». Неиспользованные «стрипы» храните в пакете с осушителем при 2-8 °С. Поместите требуемое количество стрипов в держатель. Верните оставшиеся «стрипы» в пакет с осушителем и поместите в холодильник.
3. Добавьте по 100 мкл стандартов, контролей или образцов в соответствующие лунки. Закройте «стрипы» адгезивной плёнкой. Инкубируйте 2 часа при 37°С.
4. Удалите жидкость из лунок микропланшета, не промывайте его.
5. Добавьте по 100 мкл рабочего раствора антител, конъюгированных с биотином в каждую лунку. Инкубируйте 1 час при 37°С. «Стрипы» могут запотеть. При аккуратном перемешивании охладите «стрипы» до комнатной температуры.
6. Аспирируйте лунки «стрипа» и промойте их, повторите промывку как минимум три раза. Промывка: Заполните каждую лунку промывочным буфером (200 мкл) и оставьте на 2 минуты, затем удалите жидкость. Оставшиеся капли жидкости легко удалить воспользовавшись бумажным полотенцем и постучав по нему перевернутым микропланшетом или «стрипами». Полное удаление жидкости на



каждом этапе способствует повышению воспроизводимости результатов теста.

7. Добавьте 100 мкл конъюгата авидин – пероксидаза хрена в каждую лунку, герметично закройте лунки с помощью адгезивной пленки. Инкубируйте 1 час при 37°C.
8. Повторите шаг 6 как минимум 5 раз.
9. Добавьте 90 мкл субстрата – раствора ТМБ в каждую лунку. Инкубируйте 10-20 мин при 37°C. Избегайте колебаний температуры и попадания света в лунки на этой стадии.
10. Добавьте 50 мкл раствора для остановки реакции в каждую лунку. В лунках куда вы помещали самые высокие концентрации стандартов разовьется интенсивное окрашивание, если этого не происходит слегка постучите по планшету для обеспечения лучшего перемешивания.
11. Определите оптическую плотность каждой лунки в течение 30 минут при 450 нм с помощью планшетного фотометра при 450 нм ± 2 нм.

Результаты

Внимание!!!

Для построения калибровочной кривой программой «Curve Expert 1.3» доступной для скачивания на сайте <http://www.cusabio.com>.

Рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта, контроля и образца и вычтите среднее значение оптической плотности нулевого стандарта. Используя графическую бумагу или программу «Curve Expert 1.3», отложите точки рассчитанных значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую (удобными могут оказаться логарифмические координаты, также для построения оптимальной кривой может быть использован регрессионный анализ). Для определения концентрации исследуемого маркера в каждом из образцов сначала найдите соответствующее значение оптической плотности на оси Y



и проведите горизонтальную линию до пересечения с калибровочной кривой. Затем из точки пересечения проведите вертикальную линию до пересечения с осью X. Значение на оси X в точке пересечения будет соответствовать концентрации исследуемого маркера в образце. Так как образцы разводили, то значение найденной концентрации необходимо умножить на соответствующий коэффициент разведения.

Ограничения процедуры

Набор не рекомендуется использовать по истечении срока годности, указанного на этикетке.

Избегайте использования и не смешивайте компоненты данного набора с реагентами, полученными из других источников.

Важно чтобы значения определяемых концентрации исследуемого маркера в образцах укладывались в диапазон значений, использованных для построения калибровочной кривой.

Если концентрация исследуемого маркера в образце оказалась выше самого высокого значения, использованного для построения калибровочной кривой. Образец следует развести и повторить анализ, для получения достоверного результата.

Любые изменения в параметрах объемов добавляемых реагентов, температуры и времени инкубации могут привести к получению неудовлетворительных и недостоверных результатов.

Данный набор разработан таким образом, что помехи от растворимых рецепторов, связывающих белков и других факторов, присутствующих в биологических образцах не должны влиять на результаты анализа. Однако пока все эти факторы не были проверены, их влияние не следует исключать.



Технические советы

- При перемешивании белковых растворов избегайте вспенивания.
- Избегайте взаимной контаминации растворов, заменяйте наконечник на новый каждый раз при внесении стандарта другой концентрации, нового образца и нового реагента. Также для каждого реагента необходимо использовать отдельные резервуары (ванночки).
- Для получения корректных результатов закрывайте планшет адгезивной плёнкой каждый раз на время инкубации.
- При использовании автоматического вошера для промывок, установите после добавления буфера для промывок период замачивания 30 секунд, и/или вращение микропланшета на 180 градусов между шагами промывок может повысить точность результатов.
- Субстратный раствор должен оставаться бесцветным до момента добавления в ячейки. Храните в тёмном месте. Цвет Субстратного раствора во время реакции должен изменяться от бесцветного до голубого различной интенсивности.
- Стоп-реагент необходимо добавлять в ячейки в той же последовательности и с той же скоростью, что и Субстратный раствор. Цвет в ячейках будет меняться с голубого на жёлтый при добавлении стоп-реагента.
- Зеленый цвет в лунках свидетельствует о том, что стоп-раствор не был тщательно перемешан с раствором субстрата.