

Розчинний α -Klotho ІФА

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення
людського розчинного α -Klotho в сироватці, плазмі
(ЕДТА, гепарин, цитрат) і сечі



12 x 8

Лише в ілюстративних цілях.

Для виконання аналізу необхідно використовувати інструкцію
з використання, що додається до набору.

Дистриб'ютор:

I B L I N T E R N A T I O N A L G M B H

Flughafenstrasse 52a
D-22335 Hamburg, Germany

Phone: +49 (0)40-53 28 91-0
Fax: +49 (0)40-53 28 91-11

IBL@IBL-International.com
www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка,
буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua, www.ivset.ua

Набір для аналізу розчинних у людини α -Klotho - IBL

ВСТУП

« α -klotho» було ідентифіковано як ген з надзвичайно низькою регуляцією у генетично модифікованої миші, фенотип якої дуже схожий на різні симптоми старіння людини. Потім послідовності генів α -klotho були ідентифіковані у різних видів, включаючи людей, на основі генів миші. Білок α -Klotho є одотрансмембранним білком вагою 130 кДа, його експресія підтверджена в нирках і паразитовидних залозах.

Останніми роками стало зрозуміло, що α -Klotho є важливою молекулою в живому організмі, яка регулює метаболізм мінералів, таких як кальцій і фосфор. Тому вважається, що у α -klotho миші симптоми, схожі на раннє старіння, викликані порушенням мінерального гомеостазу, спричиненим зниженням експресії α -Klotho. Тим часом повідомляється, що довгий N-кінцевий позаклітинний домен, який містить основну частину послідовності білка α -Klotho, вільно виділяється в кров шляхом виділення. Проте є багато незрозумілих моментів щодо функцій та змін концентрації вільного (розчинного) білка α -Klotho, тому було потрібно розробити систему вимірювання α -Klotho.

Цей набір ІФА може виміряти розчинний білок α -Klotho людини в крові людини.

ПРИНЦИП

Цей набір являє собою твердофазний сендвіч ІФА з використанням 2 видів високоспецифічних антитіл. Тетраметилбензидин (ТМВ) використовується як барвник (хромоген). Сила забарвлення пропорційна кількості людського розчинного α -Klotho.

ДІАПАЗОН ВИМІРЮВАННЯ

93,75 – 6000 пг/мл

ПЕРЕДБАЧУВАНЕ ВИКОРИСТАННЯ

Цей набір для аналізу IBL здатний до кількісного визначення людського розчинного α -Klotho в сироватці, плазмі, сечі та супернатанті клітинної культури.

КОМПОНЕНТИ НАБОРУ

Планшет з попереднім покриттям: анти-людський Klotho (67G3) мишачий IgG MoAb афінно очищене	96 x 1
2 Мічені антитіла конц.	
: (30X) HRP кон'югований анти-людський Klotho (91F1) мишачий IgG MoAb Fab' афінно очищене	0,4 мл x 1
3 Стандарт: рекомбінантний людський розчинний α -Klotho	0,5 мл x 2
4 Буфер EIA	30 мл x 1
5 Розчин для мічених антитіл *	12 мл x 1
6 Хромоген: розчин ТМВ	15 мл x 1
7 Стоп розчин *	12 мл x 1
8 Промивний буфер Конц. *	50 мл x 1

ІНСТРУКЦІЯ З ЕКСПЛУАТАЦІЇ

1. Матеріали необхідні, але не надані

- рідер планшетів (450 нм)
- Мікропіпетка і наконечник
- Градуирований циліндр і склянка
- Дейонізована вода
- Паперовий рушник
- Міліметровий папір (log/log)
- Пробірка для розведення стандарту
- В о ш е р для миття планшету з Попереднім покриттям
- Одноразова пробірка для «2, мічені антитіла Conc.» і «6, хромоген»

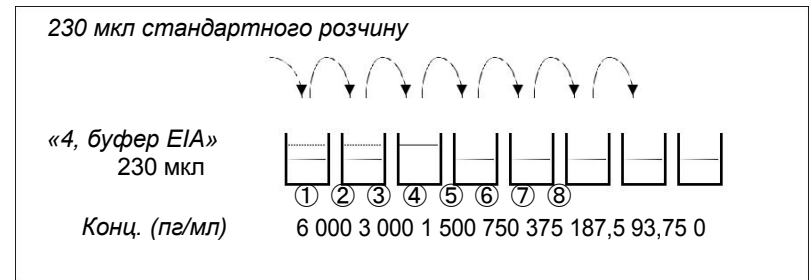
2. Підготовка

- 1) Приготування промивного буфера
«8, Конц буфера промивання». являє собою концентрований (40X) буфер. Відрегулюйте температуру «8, Конц. до кімнатної температури, а потім обережно і повністю перемішайте перед використанням. Розведіть 50 мл «8, промивний буфер конц.» з 1950 мл дейонізованої води та перемішайте. Це промивний буфер для використання. Цей підготовлений промивний буфер слід зберігати в холодильнику і використовувати протягом 2 тижнів після розведення.
- 2) Приготування міченого антитіла
«2, мічені антитіла конц.» є концентрованим (30X). Розведіть «2, мічені антитіла конц.» з «5, розчин для міченого антитіла» 30 разів відповідно до необхідної кількості в одноразову пробірку. Використовуйте отриманий розчин як мічене антитіло.
приклад)
Якщо ви використовуєте один стріп (8 лунок), необхідна кількість міченого антитіла становить 800 мкл. (Розведіть 30 мкл «2, міченого антитіла конц.» 870 мкл «5, розчину для міченого антитіла» і перемішайте. І використовуйте отриманий розчин по 100 мкл у кожній лунці.)
Цю операцію слід робити безпосередньо перед нанесенням міченого антитіла. Решту «2, мічені антитіла конц.» слід зберігати при 4°C в міцно герметичному флаконі.
- 3) Підготовка стандарту
Налийте всього 0,5 мл дейонізованої води у флакон «3, Стандарт» і обережно і повністю перемішайте. Цей розчин являє собою 12 000 пг/мл розчинного для людини α -Klotho стандарту. Стандарти, що додаються до цього набору, можна заморожувати та зберігати після відновлення. Однак цикл заморожування-відтавання не повторювати. *
- 4) Розведення стандарту
Підготуйте 8 пробірок для розведення «3, Стандарт». Помістіть 230 мкл кожного з «4, EIA буфер» у пробірку.
Вкажіть таку концентрацію кожної пробірки».

Пробірка-1	6000 пг/мл
Пробірка-2	3000 пг/мл
Пробірка-3	1500 пг/мл
Пробірка-4	750 пг/мл
Пробірка-5	375 пг/мл
Пробірка -6	187,5 пг/мл
Пробірка-7	93,75 пг/мл
Пробірка-8	0 пг/мл (бланк тестовий зразок)

Помістіть 230 мкл стандартного розчину в пробірку-1 і обережно перемішайте. Потім помістіть 230 мкл суміші пробірки-1 в пробірку-2. Розбавте стандартний розчин у два рази послідовно, щоб отримати 7

точки розведеного стандарту від 6000 пг/мл до 93,75 пг/мл. Пробірка-8 є заготовленою досліджуваного зразка 0 пг/мл. Дивіться наступне зображення.



5) Розведення досліджуваного зразка

Випробувальні зразки необхідно розбавити відповідно до «4, EIA буфер».

Рекомендоване розведення для зразків сироватки, плазми або сечі становить 2-4 рази.

3. Процедура вимірювання

Усі реагенти необхідно довести до кімнатної температури приблизно за 30 хвилин до використання. Потім обережно і повністю перемішайте перед використанням. Переконайтеся, що якість реагентів не зміниться.

Стандартну криву готують одночасно з вимірюванням дослідних зразків.

Реагенти	Тестовий зразок	Стандарт	Тестовий зразок Порожній	Реактив Бланк
	Тестовий зразок 100 мкл	Розведений стандарт (пробірка 1-7) 100 мкл	Буфер EIA (Пробірка-8) 100 мкл	Буфер EIA 100 мкл
Інкубація протягом 60 хвилин при кімнатній температурі з покритим планшетом				
4 рази (промивний буфер більше 350 мкл)				
Мічені Антитіла	100 мкл	100 мкл	100 мкл	-
Інкубація протягом 30 хвилин при кімнатній температурі з покритим планшетом				
5 разів (промивний буфер більше 350 мкл)				
Хромоген	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Інкубація протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (захищена)				
Стоп розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Зчитуйте планшет при 450 нм проти бланк реагент протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.				

- 1) Визначте лунки для реагенту бланк. Помістіть по 100 мкл кожного з «4, EIA буфер» у лунки.
- 2) Визначте лунки для контролю, тестового зразка та розведеного стандарту. Потім у відповідні лунки помістіть по 100 мкл кожного тестового зразка (пробірка-8), досліджуваного зразка та розведень стандарту (пробірка-1-7).
- 3) Інкубуйте планшет з попереднім покриттям протягом 60 хвилин при кімнатній температурі, накривши його.
- 4) Промийте планшет підгот. промивним буфером і видаліть всю рідину.
- 5) Внесіть піпеткою 100 мкл розчину міченого антитіла в лунки досліджуваних зразків, розведеного стандарту та тестового зразку бланк.
- 6) Інкубуйте планшет з попереднім покриттям протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, накривши його.
- 7) Промийте планшет підготовленим промивним буфером і повністю видаліть всю рідину.
- 8) Наберіть необхідну кількість «6, хромогену» в одноразову пробірку. Потім піпеткою внесіть 100 мкл з пробірки в лунки. Будь ласка, не повертайте решту пробірки в пляшку «6, хромоген», щоб уникнути забруднення.
- 9) Інкубуйте планшет з попереднім покриттям протягом 30 хвилин при кімнатній температурі в темряві. Рідина стане синьою від додавання «6, хромоген».
- 10) Внесіть піпеткою 100 мкл розчину «7, стоп-розчин» у лунки. Змішайте рідину, постукаючи по стороні планшету з попереднім покриттям. Рідина стане жовтою від додавання «7, Стоп-розчин».
- 11) Видаліть будь-який бруд або краплю води на дні планшету з попереднім покриттям і переконайтеся, що на поверхні рідини немає бульбашок. Потім запустіть планшетний рідер і проведіть вимірювання при 450 нм проти холостого реагенту.

ОСОБЛИВА УВАГА

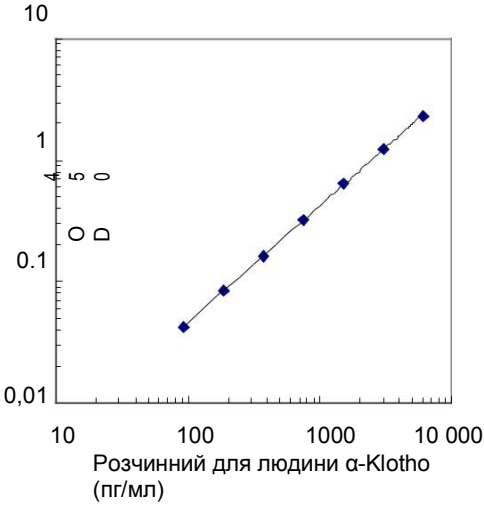
- 1) Випробувальні зразки слід виміряти незабаром після збору. Для зберігання досліджуваних зразків зберігайте їх замороженими та не повторюйте цикли заморожування/розморожування. Розморозьте тестові зразки при низькій температурі та повністю перемішайте їх перед вимірюванням. Зокрема, зразки сечі менш стабільні, ніж зразки сироватки або плазми, до температури та заморожування/відтавання. Тому після збору зразки сечі швидко заморожуйте та уникайте повторного заморожування.
- 2) Випробувальні зразки необхідно розбавити «4, EIA буфер», в міру необхідності.
- 3) Рекомендують повторне вимірювання тестових зразків і стандарту.
- 4) Використовуйте тестові зразки в нейтральному діапазоні pH. Забруднення органічним розчинником може вплинути на вимірювання.
- 5) Використовуйте лише промивний буфер, що міститься в цьому наборі, для промивання пластини з попереднім покриттям. Недостатнє промивання може призвести до помилок у вимірюванні.
- 6) Повністю видаліть промивний буфер, постукаючи попередньо покритою пластиною по паперовому рушнику. Не протирайте лунки паперовим рушником.
- 7) «6, хромоген» слід зберігати в темряві через його чутливість до світла.
- 8) «6, хромоген» слід уникати контакту з металами.
- 8) Вимірювання слід проводити протягом 30 хвилин після додавання «7, стоп-розчин».

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТУ ТЕСТУ

Перед побудовою графіка відніміть поглинання контрольної проби з усіх даних, включаючи стандарти та невідомі зразки. Побудуйте графік віднятої абсорбції стандартів від стандартної концентрації на міліметровому папері. Проведіть через ці точки найкращу плавну криву, щоб побудувати стандартну криву. Прочитайте концентрацію для невідомих зразків зі стандартної кривої.

Приклад стандартної кривої

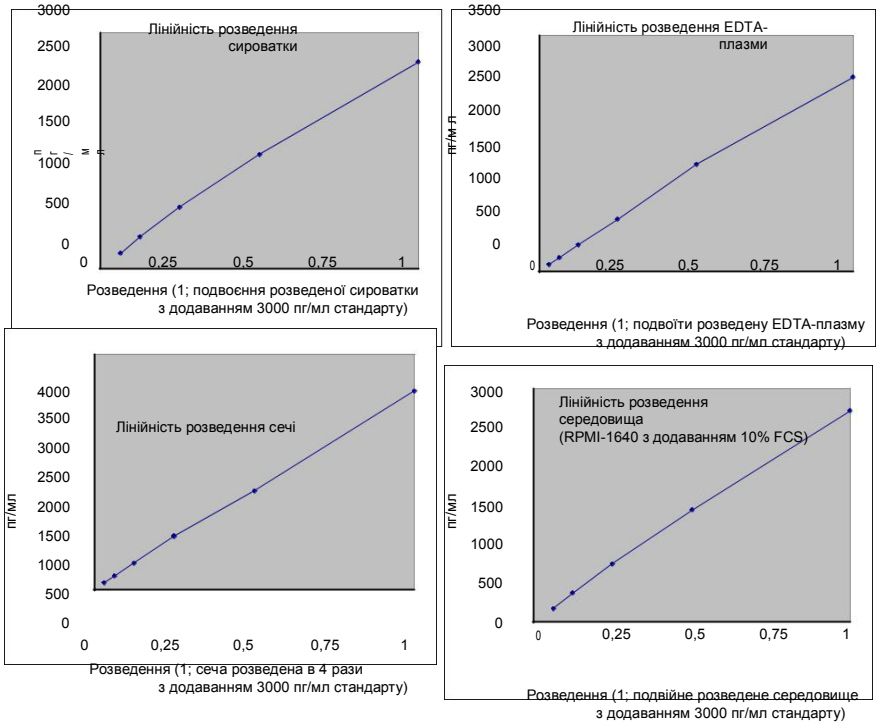
Конц. (пг/мл)	Поглинання (450 нм)
6000	2,307
3000	1,245
1500	0,635
750	0,324
375	0,166
187,5	0,087
93,75	0,046
0 (тестовий зразок бланк)	0,004



* Типова стандартна крива показана вище. Цю криву не можна використовувати для отримання результатів тесту. Будь ласка, запустіть стандартну криву для кожного аналізу.

ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Лінійність розведення



4. між аналізами

Вимірювання Значення (пг/мл)	Значення SD	Значення CV (%)	п
2903,01	85,44	2.9	5
706,32	45,72	6.5	5
165,47	18.82	11.4	5

5. Специфіка

Складний	Перехресна реактивність
α -Klotho людини	100 %
Людський остеопонтин	<0,1 %
VEGF людини (165)	<0,1 %
PDGF людини	<0,1 %

6. Чутливість

6,15 пг/мл

Чутливість для цього набору була визначена з використанням рекомендацій згідно з протоколами оцінки Національного комітету клінічних лабораторних стандартів (NCCLS). (Національний комітет з протоколів оцінки стандартів клінічних лабораторій, SC1, (1989) Villanova, PA: NCCLS.)

ЗАХОДИ ПЕРЕД ВИКОРИСТАННЯМ ТА/АБО ВИКОРИСТАННЯ

Усі реагенти слід зберігати при температурі 2-8°C. Усі реагенти необхідно

- принести в приміщення при температурі приблизно за 30 хвилин до використання.
«3, Стандарт» — це ліофілізовані продукти. Будьте обережні, відкриваючи цей флакон.
- «7, Стоп-розчин» є сильно кислою речовиною. Тому будьте обережні, щоб не мати контакту вашої шкіри та одягу з «7. Стоп розчин» та зверніть увагу на утилізацію «7.Стоп розчину»

- Утилізуйте використані матеріали, промивши їх великою кількістю води.
- У «2, мічених антитілах конц.» може виникнути осад, однак його немає проблема у виконанні.
- Після роботи з реагентами вимийте руки.
- Не змішуйте реагенти з реагентами з іншої партії або набору.
- Не використовуйте прострочені реагенти.
Цей набір призначений лише для дослідницьких цілей. Не використовувати для клінічної діагностики.

ЗБЕРІГАННЯ ТА ТЕРМІН ДІЇ

Умови зберігання : 2 - 8°C

Термін придатності вказаний на зовнішній коробці.

ДОВІДКА

- Ямазакі Ю, Імура А, Уракава І, Сімада Т, Мураками Дж, Аоно Ю, Хасегава Х, Ямашіта Т, Накатані К, Сайто Ю, Окамото Н, Куруматані Н, Намба Н, Kitaoka T, Ozono K, Sakai T, Hataya H, Ichikawa S, Imel EA, Econs MJ, Набесіма Ю. Створення сендвіч-ІФА для розчинного альфа-Клото вимірювання: залежна від віку зміна рівня розчинної альфа-Клото у здорових предметів. Biochem Biophys Res Commun. 2010 30 липня;398(3):513-8.

2. Доданий аналіз відновлення

Зразок	Теоретичне Значення (пг/мл)	Вимірювання Значення (пг/мл)	%
Сироватка людини (x4)	1764,53	1494,92	84.7
	1014,53	924,85	91.2
	639,53	602.29	94.2
	452.03	419.16	92.7
Плазма людини (EDTA) (x4)	1770,47	1677,46	94.7
	1020,47	984,78	96.5
	645,47	629,21	97.5
	457,97	435,74	95.1
Сеча людини (x2)	1500,00	1349,55	90,0
	750,00	713,85	95.2
	375,00	355,67	94.8
	187,50	181,27	96.7
Додано 10% CMP RPMI-1640 (x2)	1500,00	1349,55	90,0
	750,00	713,85	95.2
	375,00	355,67	94.8
	187,50	181,27	96.7

3. В аналізі

Вимірювання Значення (пг/мл)	Значення SD	Значення CV (%)	п
2968,78	92,26	3.1	24
757,34	20.65	2.7	24
186,64	6.62	3.5	24