

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНГИБИНА В

## A81303, Inhibin B Gen II ELISA

Каталог. № : A81303

Методика от 05-2014

Количество : 96

Производитель: Beckman Coulter,  
Inc., (США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

### НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Inhibin B Enzyme-Linked Immunosorbent (ELISA) содержит материалы для количественного измерения димерного ингибина В в человеческой сыворотке и литий-гепариновой плазме. Только для использования в *in-Vitro* диагностике.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный анализ является ферментативно усиленным трехшаговым анализом типа "сэндвич". В анализе калибраторы, контроли и образцы инкубируют в микротитровальных лунках, которые были покрыты антителом анти-ингибина В. После инкубации и промывки лунки инкубировали с биотинилированным антителом выявления  $\alpha$ -субъединицы анти-ингибина. После второй инкубации и стадии промывки лунки инкубируют со стрептавидином, меченым ферментом пероксидазы хрена (HRP). После третьей инкубации и стадии промывки лунки инкубировали с субстратом тетраметилбензидина (ТМВ). После инкубации добавляют кислый стоп раствор. Степень ферментативного окрашивания субстрата определяется измерением двойной длины волны поглощения при 450 нм в качестве основного фильтра и 630 нм в качестве основного референсного фильтра. Измеренное поглощение прямо пропорционально концентрации ингибина В в образцах. Набор используется для построения калибровочной кривой поглощения в зависимости от концентрации ингибина. Концентрации ингибина В в образцах затем могут быть вычислены из этой калибровочной кривой.

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

#### Микрострипы, покрытые антителами Ингибина В Gen II:

- Один держатель, содержащий 96 полистироловых микротитрационных лунок, покрытых мышинными моноклональными антителами к В-активину, иммобилизованных на внутренней стенке каждой лунки.
- Хранить при 2-8 °С до указанного срока годности в закрывающемся пакете, защищенном от влаги.

#### Концентрат Конъюгата Биотин-антитела Ингибина В Gen II:

- Один флакон 0.4 мл, содержит раствор биотинилированного антитела  $\alpha$ -субъединицы анти-ингибина в буфере с протеином (мышь), < 0.5 % ProClin 300.
- Хранить при 2-8 °С до окончания срока годности.
- Развести за 10-30 минут перед использованием в Разбавителе биотинового Конъюгата Ингибина В Gen II.

#### Стрептавидин-ферментный конъюгат:

- Одна бутылка, 13 мл, содержит конъюгированный HRP в буфере с протеином (рыба) и < 10% метанола.
- Хранить при 2-8 °С до истечения срока годности.
- Поставляются готовые к использованию.

#### Рабочий буфер Ингибина В Gen II:

- Один флакон, 8 мл, содержащий буфер с бычьим сывороточным альбумином (BSA), белок (бычий, мыши, козы), поверхностно-активное вещество и < 0,5% ProClin 300.
- Хранить при 2-8 °С до истечения срока годности.

#### Разбавитель Биотинового конъюгата Ингибина В Gen II:

- Одна бутылка, 13 мл, содержит буфер с BSA, белок (крупного рогатого скота, мыши, козы), поверхностно-активное вещество и < 0.5% ProClin 300.
- Хранить при 2-8 °С до истечения срока годности.

#### ТМБ хромогенный раствор:

- Один флакон, 11 мл, содержит ТМБ в цитратном буфере с перекисью водорода.
- Хранить при 2-8 °С до указанного срока хранения.

#### Концентрат Промывочного Буфера В:

- Один флакон, 60 мл раствора буфера с неионным детергентом.
- Хранить при 2-8 °С или при комнатной температуре (~25 °С) до указанного срока годности.
- Перед использованием разбавлять 10-кратно деионизированной водой.

#### Сток раствор А:

- Один флакон, 11 мл, содержащий 0.2 М серной кислоты.
- Хранить при 2-8 °С до указанного срока хранения.

### НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Ингибин В Gen II Калибраторы и Контроли A81304
2. Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при 450/405 нм с фильтрами сравнения 600-630 нм
3. Деионизированная вода
4. Пипетка, позволяющая пипетировать объемы 10 - 1000 мкл
5. Микропланшетный шейкер с возможностью установить скорость 600-800 об/мин
6. Автоматический микропланшетный вошер
7. Вортекс
8. Фильтровальная бумага для высушивания стрипов
9. Логарифмическая бумага для ручного обсчета данных

### МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

#### Для диагностики *in-vitro*.

- Соблюдайте правила надлежащей лабораторной практики.
- При соблюдении правил описанной процедуры риск работы с образцами и материалами, содержащими компоненты крови, минимален. Однако, со всеми материалами, содержащими компоненты крови, необходимо обращаться, как с потенциально опасными, соблюдая стандартные меры предосторожности и правила надлежащей лабораторной практики, вне зависимости от их происхождения, обработки и предшествующей сертификации (10). Используйте соответствующие дезинфектанты для обеззараживания. Храните и утилизируйте такие материалы и контейнеры для их хранения в соответствии с локальными правилами и рекомендациями.
- Xi: Раздражающее вещество: < 0.5 % ProClin 300.  
R 43: Может вызвать сенсибилизацию при контакте с кожей.  
S 37: Использовать перчатки.  
S 28: После контакта с кожей немедленно вымыть с мылом и большим количеством воды.
- Xn: вредный: < 10 % метанола.  
R 20/21/22: Вреден при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании.  
R 68: Вреден: Возможен риск необратимых эффектов при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании.  
S 36/37: Использовать подходящую защитную одежду и перчатки.  
S 45: В случае инцидента или при плохом самочувствии, обратиться за медицинской помощью.
- Лист данных по безопасности материалов (MSDS) доступен по запросу.

### СБОР ОБРАЗЦОВ И ИХ ПОДГОТОВКА

- Рекомендуется использование сыворотки и литий гепаринизированной плазмы.
- Соблюдайте следующие рекомендации при обращении, тестировании и хранении образцов:
  - a) При заборе крови должны соблюдаться обычные меры предосторожности.
  - b) Позволить образцам сыворотки полностью стечь перед центрифугированием.
  - c) Хранить пробирки всегда закупоренными.
  - d) В течение 2 часов после центрифугирования поместить минимум 500 мкл образца, свободного от клеток, в пробирку для хранения. Немедленно закупорить пробирку.
  - e) Сыворотка и литий гепаринизированная плазма хранятся при 2-8 °С в течение 48 часов.
  - f) Если анализ не будет проведен в течение 48 часов или для транспортировки образцов, образцы должны быть заморожены при -20 °С.
- При подготовке образцов придерживаться следующих правил:
  - a) Убедиться, что остаточный фибрин и клеточный материал удалены перед тестированием.
  - b) Следовать рекомендациям производителя по центрифугированию.

- Каждая лаборатория должна установить соответствие пробирок для забора образцов и продуктов для отделения сыворотки. Вариация этих продуктов может существовать между производителями и от партии к партии.
- Избегайте повторных циклов заморозки и оттаивания образцов.
- Не используйте для анализа сильно гемолизированные или липемичные образцы.

#### ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПОРЯДКУ РАБОТЫ

- Для успешного использования набора Ингибин В Gen II ELISA необходимо полное понимание вложенной инструкции.
- Правильные результаты будут получены только при использовании точной лабораторной техники и аккуратном выполнении инструкции.
- Стандартная кривая должна быть включена в каждое определение.
- Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре (~25°C).
- Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, осторожно переворачивая.
- Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.
- Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
- Неполная промывка негативно влияет на точность результатов.
- Чтобы свести к минимуму возможные вариации из-за разного времени инкубации с субстратом, добавляйте стоп раствор в ячейки в той же последовательности и с такой же скоростью, как и раствор ТМБ.
- Избегайте загрязнения микроорганизмами реагентов, особенно концентрата конъюгата и разбавителя конъюгата.
- Избегайте загрязнения хромогенного раствора ТМБ ферментным конъюгатом.
- Используйте чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, стандарта, контроля и образца.
- Для добавления хромогенного раствора ТМБ и стоп-раствора не используйте пипетки с металлическими частями.
- Контейнеры и наконечники полуавтоматических пипеток, используемые для раствора ферментного конъюгата и хромогенного раствора ТМБ, при повторном использовании следует тщательно промывать дистиллированной водой до и после каждого использования. Фермент, используемый как метка, инертен к кислороду и крайне чувствителен к микробиологическим загрязнениям, хлорноватистой кислоте, азиду натрия и ароматическим хлорогидрокарбонатам, зачастую находящимся в воде.
- Используйте воду высокого качества.
- Избегайте контакта реагентов с источниками тепла и прямым солнечным светом при хранении реагентов и во время инкубации.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

##### Приготовление реагентов:

##### 1. Промывочный буфер

Разбавить 1 часть Промывочного концентрата с 24 частями деионизированной воды. Промывочный буфер стабилен один месяц при хранении при комнатной температуре в плотно закрытом сосуде.

##### 2. Биотиновый конъюгат Антител Ингибина В Gen II

Концентрат должен быть разбавлен в соотношении 1 часть в 50 частях Разбавителя Биотинового Конъюгата Ингибина В Gen II согласно числу используемых лунок. Для всей пластины пипетировать точно 220 мкл концентрата в 11 мл Разбавителя Биотинового Конъюгата Ингибина В Gen II.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Концентрат антитело-биотиновый конъюгат должен быть разбавлен за 10-30 минут перед использованием.

##### 3. Микроячейки

Выберите необходимое для анализа количество привитых ячеек. Верните лишние ячейки в закрывающийся пакет с осушителем. Пакет должен быть защищенным от влаги.

##### Проведение анализа

Все реагенты и образцы перед началом анализа должны быть выдержаны при комнатной температуре (~25° С) и тщательно перемешаны перед использованием осторожным переворачиванием. Стандарты, контроли и образцы пациентов должны анализироваться в дублях.

1. Пометьте стрипы, которые будут использованы.
2. Внесите по 50 мкл стандартов, контролей и образцов в соответствующие лунки планшета.
3. Добавьте по 50 мкл раствора Рабочего буфера Ингибина В в каждую ячейку, используя точную пипетку.
4. Инкубируйте в течение 2 часов при ~25°C на орбитальном шейкере при 600-800 об/мин.

5. В течение последних 10-30 минут инкубации подготовить Раствор Конъюгата биотин-антитело Ингибина В Gen II путем разбавления Концентрата Конъюгата в Разбавителе Конъюгата, как описано в разделе "Подготовка реагентов" этого листка-вкладыша.
6. Аспирировать и промыть каждую лунку пять раз Промывочным Раствором с помощью автоматического вошера для микропланшетов или вручную с помощью прецизионной пипетки. Постучать планшетом по впитывающей бумаге для высушивания.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Настоятельно рекомендуется использование автоматического микропланшетного промывочного устройства – вошера. Неполная промывка негативно влияет на правильность результатов. Если микропланшетный вошер недоступен:

- a) полностью удалите жидкость из каждой ячейки
- b) внесите 350 мкл Промывочного буфера в каждую ячейку, используя точную пипетку
- c) аспирируйте жидкость снова
- d) повторите шаги (b) и (c) четыре раза.

7. Добавьте по 100 мкл раствора Биотинового конъюгата в каждую ячейку, используя точную пипетку.
  8. Инкубируйте ячейки на орбитальном шейкере при 600-800 об/мин в течение 1 часа при ~25°C.
  9. Используя автоматический вошер, промойте 5 раз Промывочным буфером как указано в шаге 5 настоящего протокола. Высушите планшет, перевернув его на фильтровальную бумагу.
  10. Добавьте по 100 мкл раствора стрептавидин-ферментного конъюгата в каждую ячейку, используя точную пипетку.
  11. Инкубируйте ячейки на орбитальном шейкере при 600-800 об/мин в течение 30 минут при ~25 °C.
  12. Используя автоматический вошер, промойте 5 раз Промывочным буфером. Высушите планшет, перевернув его на фильтровальную бумагу.
  13. Добавьте 100 мкл хромогенного раствора ТМБ в каждую лунку, используя точную пипетку.
- Не подвергать прямым солнечным лучам.**
14. Инкубируйте при комнатной температуре ~25 °C в течение 8-12 минут на орбитальном шейкере при 600-800 об/мин.  
*Замечание: вы должны знать, что окраска может развиваться быстрее или медленнее рекомендованного времени инкубации, это зависит от конкретной комнатной температуры. Пожалуйста, контролируйте визуально развитие окраски для оптимизации времени инкубации.*
  15. Добавьте 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку, используя точную пипетку.
  16. Измерьте оптическую плотность ячеек при 450 нм. Измерение оптической плотности микроплшета должно быть выполнено в течение 30 минут после добавления стоп-реагента раствора.

**Замечание:**

- i. Необходимо при считывании абсорбции запрограммировать нулевой стандарт как «Бланк».
- ii. Если возможно измерение на двух длинах волн, используйте длину волны сравнения 600 или 630 нм.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Вычитите среднее поглощение калибратора А (бланк) от среднего поглощения. Используя логарифмическую бумагу, отметьте точки рассчитанных значений среднего поглощения калибраторов В-Г, контролей и образцов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации Ингибина В в пг/мл на горизонтальную ось X, используйте линейную аппроксимацию. Альтернативно, для построения калибровочной кривой можно использовать линейные оси, а для расчета рекомендуется аппроксимация гладкий сплайн. Проведите оптимальную кривую, используя среднее двух измерений.
3. Определите концентрацию Ингибина В в контролях и образцах из стандартной кривой, сравнивая рассчитанные средние значения поглощения с соответствующей концентрацией Ингибина В.
4. Все образцы со значениями, большими, чем у самого высокого стандарта, предварительно развести стандартом А 0 пг/мл и проанализировать повторно.
5. Любые образцы со значениями ниже, чем у самого низкого стандарта, следует считать такими же.
6. Умножить полученное значение на коэффициент разведения, если это необходимо.  
*Примечание: Если полученная оптическая плотность превышает возможности ридера, необходимо второе считывание на 405 нм (фильтры сравнения 600 или 630). В*

этом случае постройте вторую стандартную кривую как описано выше по полученным значениям для всех стандартов при 405 нм. Концентрацию образцов, не вписывающихся в предыдущий масштаб, определите по новой стандартной кривой. Не меняйте значения в пределах возможностей ридера, полученные при 450 нм, значениями, полученными при 405 нм.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ

- Реагенты, применяемые в этом наборе, оптимизированы для измерения уровня Ингибина В в сыворотке и литий гепаринизированной плазме.
- В анализах с использованием антител существует возможность интерференции гетерофильных антител в образце. Образцы от лиц, которые регулярно находились в контакте с животными, или прошли курс иммунотерапии или диагностические процедуры с использованием иммуноглобулинов или фрагментов иммуноглобулина, могут продуцировать антитела, например, НАМА, что интерферирует с иммуноанализом. Кроме того, другие гетерофильные антитела, такие как человеческие антикозильные антитела могут присутствовать в образце
- Если есть признаки микробного загрязнения или чрезмерной мутности реагента, выбросить флакон.
- Результаты данного анализа должны интерпретироваться в совокупности с общей историей болезни пациента, включая: симптомы, клиническую историю, данные дополнительных тестов и другая информация.

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Каждая лаборатория должна установить средние значения и приемлемые диапазоны для обеспечения надлежащего исполнения.
- Контроли Ингибина В Gen II ELISA или другие коммерческие контроли должны укладываться в установленные доверительные интервалы.
- Доверительные интервалы для контролей Ингибина В Gen II ELISA напечатаны на этикетке флакона.
- Полная калибровочная кривая, а также низкий и высокий уровни контролей должны быть включены в каждый анализ.
- Раствор ТМБ должен быть бесцветным или светло-желтым. Развитие голубой окраски может свидетельствовать о загрязненном или нестабильном реагенте.

#### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

1. Каждая лаборатория должна устанавливать свои диапазоны нормальных значений.
2. Образцы сыворотки были как закуплены, так и использовались аликвоты, хранящиеся в морозильных камерах от предыдущих исследований. Эти образцы были проанализированы с помощью набора Ингибин В Gen II. Ожидаемый диапазон для Ингибина В рассчитывался с помощью 85-95% непараметрической оценки с использованием Analyse-it для Microsoft Excel.

Образцы	Возраст (лет)	Концентрация (пг/мл)	2,5 – 97,5 процентиля (пг/мл)
Случайные мужчины (N=235)	35	166	25 - 325
Случайные женщины (N=95)	30	47	ND – 341
Женщины на 3-й день цикла (N=106)	N/A	75	ND – 273
Женщины после менопаузы (N=20)*	74	ND	ND - 4
Мальчики (N=15)**	11	93	4 - 352
Девочки (N=15)	11	18	ND – 83

ND – недетектируемо

#### ПРИМЕР СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

Номер лунки	Содержимое лунки	Среднее, ОП	Конц., пг/мл
	стандарты		
A1, A2	A	бланк	0
B1, B2	B	0.05	10
C1, C2	C	0.014	30
D1, D2	D	0.050	100
E1, E2	E	1.19	250
F1, F2	F	2.08	500
G1, G2	G	3.18	1000

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ:** вышеприведенные данные не должны быть использованы вместо данных, полученных в лаборатории.

#### ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Все представленные характеристики выражены в пг/мл.

#### Сравнение методов

Набор Ингибин В Gen II ELISA сравнивался с другим коммерчески доступным методом (метод X). 60 образцов от мужчин и 60 образцов от женщин в возрасте 20-50 лет были проанализированы и получены следующие результаты:

Регрессия:

Ингибин В Gen II = 1.03 (OBI) – 6.77 пг/мл  
(r = 0.99; P < 0.0001)

Ингибин В Gen II = 1.57 (DSL-10-84100) + 11.29 пг/мл  
(r = 0.97; P < 0.0001)

Рисунки (См. оригинал инструкции).

#### Восстановление разведения (Линейность)

Четыре образца человеческой сыворотки были разбавлены нулевым стандартом ИНГИБИН В и исследованы.

Образец	Разбавление	Ожидаемая конц. (пг/мл)	Наблюдаемая конц. (пг/мл)	% от Восстановления
I	---	999.80	N/A	N/A
	1 : 2	499.90	492.40	98
	1 : 4	249.95	234.33	94
	1 : 8	124.97	117.66	94
	1 : 16	62.49	59.07	95
II	---	659.78	N/A	N/A
	1 : 2	329.89	319.12	97
	1 : 4	164.95	161.10	98
	1 : 8	82.47	86.54	105
	1 : 16	41.24	46.78	113
III	---	580.15	N/A	N/A
	1 : 2	290.07	256.85	89
	1 : 4	145.04	117.80	81
	1 : 8	72.52	66.31	91
	1 : 16	36.26	37.66	104
IV	---	279.35	N/A	N/A
	1 : 2	139.67	135.08	97
	1 : 4	69.84	68.46	98
	1 : 8	34.92	36.08	103
	1 : 16	17.46	19.67	113

#### Восстановление после спайка

Добавление 3 разных уровней Ингибина В Gen II к 4 образцам пациентов с низкой концентрацией Ингибина В Gen II дало следующие результаты:

Образец	Эндогенная конц.	Ожидаемая конц. (пг/мл)	Наблюдаемая конц. (пг/мл)	% восстановления
I	46.44	91.85	89.04	97
		133.13	128.47	96
		170.82	166.51	97
II	57.43	102.32	100.86	99
		143.12	132.37	92
		180.38	157.36	87
III	40.18	85.88	83.52	97
		127.43	124.15	97
		165.37	166.80	101
IV	46.18	91.60	91.70	100
		132.89	158.48	119
		170.59	161.84	95

#### Неточность

Воспроизводимость ИНГИБИН В Gen II ELISA была определена с использованием 3 образцов (Q1, Q2, Q3) и 2 контролей (C1, C2) с 2 партиями реагентов. Анализ состоял из 40 исследований, 3 дублия каждый.

Образец	Средняя конц.	Внутри анализа	Между анализами	Всего
	пг/мл	% CV	% CV	
Q1	19.34	3.82	5.64	6.82
Q2	76.03	2.40	3.68	4.39
Q3	275.30	2.22	3.67	4.29
C1	99.88	2.67	4.70	5.40
C2	363.90	2.46	5.13	5.68

#### Аналитическая специфичность

Следующие потенциальные кросс - реагенты (Ингибин А, Активин А, Активин В, Активин АВ, АМГ, ФСГ, ЛГ и Фоллистатин 315) были

добавлены в концентрациях, дважды превышающих их физиологические значения, в сывороточный матрикс и проанализированы. Все значения концентрации Ингибина В, полученные в присутствии других кросс-реагентов, были недетектируемые.

#### Интерференция

При добавлении потенциальных интерферирующих веществ (гемоглобина, триглицеридов, билирубина и Человеческого сывороточного альбумина) в двойной концентрации, концентрации АМН были в пределах  $\pm 10\%$  контрольных границ, как представлено в таблице:

Интерферирующие вещества	Конц. анализ	Неразбавленный образец (пг/мл)	Разбавленный образец (пг/мл)	% разницы от контрольного
Гемоглобин	2 мг/мл	102.66	93.91	- 8.5
Триглицериды	20 мг/мл	96.81	99.02	2.3
Билирубин	0.6 мг/мл	91.40	97.06	6.2
Человеческий сывороточный альбумин	60 мг/мл	97.63	103.90	6.4

#### Предел обнаружения (LoD)

Наименьшее количество Ингибина В в образце, которое может быть обнаружено с 95% вероятностью, составляет 2.6 пг/мл. Значение определялось на основании обработки семи точек калибровочной кривой, контролей и семи образцов сыворотки человека в диапазоне от нуля до 105 пг/мл. Два анализа в день проводили в течение 10 дней в дублях.

#### Предел количественного определения (LoQ)

Оценочная минимальная доза достигает при 20% общей погрешности 4.8 пг/мл. Значение определялось на основании обработки семи точек калибровочной кривой, контролей и восьми образцов сыворотки человека, по крайней мере, два образца, которые были менее чем медиана нормального и не менее трех образцов, которые были больше, чем средняя норма более 20 постановок и 10 дней в дублях.



#### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 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)