

# НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО P-СЕЛЕКТИНА

## BMS219/4 / BMS219/4TEN, Human sP-selectin Platinum ELISA

Каталог. №: **BMS219/4/BMS219/4TEN** Методика от **01-08-2012**  
Количество: **96, 10x96** Версия **23**  
Производитель: **Bender MedSystems**  
**GmbH, (Австрия)**



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

**Только для исследовательских целей  
Не для использования в диагностических или  
терапевтических процедурах**

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данный набор Human sP-Селектин ELISA предназначен для количественного определения человеческого sP-Селектина. **Набор предназначен только для диагностики in vitro и не должен использоваться в терапевтических целях.**

### 2. ВВЕДЕНИЕ (См. оригинал инструкции на англ. языке).

### 3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Антитела, специфичные к sP-Селектину, сорбированы в ячейках планшета.

Человеческий sP-Селектин в образце или стандарте связывается с антителами в ячейках планшета. Добавляется конъюгат антител античеловеческого sP-Селектина и HRP, который связывается с человеческим sP-Селектинном, захваченным первым антителом.

После инкубации и промывки из ячеек удаляется не связавшийся конъюгат антител античеловеческого sP-Селектина и HRP, и в ячейки добавляется раствор субстрата, реактивный с HRP.

Окрашенный продукт образуется в количестве, пропорциональном количеству человеческого sP-селектина, присутствующего в образце или стандарте. Реакцию останавливают добавлением кислоты и измеряют поглощение при 450 нм. Стандартная кривая строится по 7 стандартным разведениям человеческого sP-Селектина и определяется концентрация человеческого sP-Селектина.

### 4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

#### 4.1 Реагенты в наборе Человеческий sP-Селектин ELISA BMS219/4 (96 тестов)

Контроль высокий, лиофилизированный	1 флакон
Контроль низкий, лиофилизированный	1 флакон
Растворитель для образцов, 12 мл	1 флакон
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл	1 флакон
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	1 флакон
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	1 флакон
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл	1 флакон
Голубой краситель, 0,4 мл	1 флакон
Зеленый краситель, 0,4 мл	1 флакон
Плѐнки для заклеивания стрипов	2

#### 4.2 Реагенты в наборе Человеческий sP-Селектин ELISA BMS219/4TEN (10 x 96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому sP-Селектину	10 планшетов
Конъюгат моноклональных анти-sP-Селектин антител и HRP, 60 мкл	10 флаконов
Стандарт, лиофилизированный, 80 нг/мл	10 флаконов
Контроль высокий, лиофилизированный	10 флаконов
Контроль низкий, лиофилизированный	10 флаконов
Растворитель для образцов, 12 мл	10 флаконов
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл	2 флакона
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	3 флакона
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	10 флаконов
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл	10 флаконов
Голубой краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Зеленый краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Плѐнки для заклеивания стрипов	10

### 5. ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ – НАБОР ИФА

Храните компоненты набора при температуре 2-8 °С. Лиофилизированные контроли храните при -20°С. Сразу после использования верните реагенты в холодильник (2-8 °С) или морозилку (-20 °С) соответственно. Храните до даты, указанной на упаковке реагентов.

Только при соответствующем хранении и исключении контаминации во время предыдущего использования набора гарантируется качественная работа реагентов.

### 6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Супернатант культур клеток, человеческая сыворотка, плазма (ЭДТК, цитратная, гепариновая) и амниотическая жидкость могут быть использованы для анализа данным методом. Другие биологические образцы также могут быть использованы. Отделите сыворотку или плазму от сгустка или эритроцитов как можно быстрее.

Образцы, содержащие видимый преципитат, необходимо центрифугировать для отделения преципитата до анализа. Не используйте сильно гемолизированные или липемические образцы. Если образцы не будут протестированы в день сбора, то их необходимо заморозить и хранить при температуре -20 °С или ниже, чтобы предотвратить потерю биоактивности sP-Селектина. Если анализ будет выполнен в ближайшие 24 часа, образцы могут храниться при 2-8 °С.

Избегайте повторных циклов замораживания-размораживания образцов.

### 7. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Калиброванные пипетки на 5 мл и 10 мл
- Калиброванные пипетки одноканальные переменного объема с одноразовыми наконечниками на 5 – 1000 мкл
- Многоканальные пипетки с одноразовыми наконечниками на 50 – 300 мкл
- Ванночка для реагентов для использования с многоканальной пипеткой
- Калиброванные стаканы и цилиндры, необходимые для приготовления реактивов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, по возможности, фильтром сравнения ≥ 620 нм
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов (линейная регрессия)

### 8. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

- Все химикаты считать потенциально опасными. Рекомендуется использование данных реагентов только квалифицированным персоналом в лабораторных условиях. Использовать защитную



одежду, очки и перчатки. Избегать контакта с глазами и кожей. В случае контакта, промыть с большим количеством воды.

- Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.
- Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.
- Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
- Избегайте облучения реагентов сильным источником света во время хранения и инкубации.
- Не пипетируйте ртом.
- Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ.
- Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми.
- При ручном методе анализа пользуйтесь латексными перчатками для защиты рук.
- Избегайте контакта субстратного раствора с металлами и окислителями.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей.
- Чтобы избежать микробного загрязнения или загрязнения реактивами и получения в результате недостоверных результатов, пользуйтесь одноразовыми наконечниками.
- Используйте чистую, специально выделенную посуду для конъюгатов и субстратного раствора.
- Загрязнение кислотой инактивирует конъюгат.
- Для приготовления реактивов используйте дистиллированную или деионизированную воду.
- Субстратный раствор должен иметь комнатную температуру перед использованием
- Обеззараживайте после работы образцы, так как они могут быть инфицированы, предпочтительно автоклавированием не менее 1 часа при 121.5 °C
- Жидкие отходы, не содержащие кислоту, и нейтрализованные необходимо смешать с раствором гипохлорита натрия таким образом, чтобы получился в итоге 1% раствор гипохлорита. Оставьте полученную смесь на 30 минут для эффективного обеззараживания. Жидкие отходы, содержащие кислоту, необходимо нейтрализовать до обеззараживания раствором гипохлорита натрия.

## 9. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

**Буферные концентраты** привести к комнатной температуре и развести перед началом анализа. Если в **Буферных концентратах** образовались кристаллы, аккуратно подогреть их до полного растворения.

### 9.1 Промывающий раствор (1x)

Разбавьте 50 мл **концентрата** дистиллированной или деионизированной водой в мерном цилиндре до конечного объёма 1,0 л. Перемешайте, избегая вспенивания.

Храните Промывающий раствор при 2-25 °C. Промывающий раствор стабилен 30 дней.

Промывающий раствор (1x) также может быть приготовлен согласно следующей таблице:

Кол-во стрипов	Концентрат Промывочного буфера (мл)	Дистиллированная вода (мл)
1-6	25	475
1-12	50	950

### 9.2 Рабочий буфер (1x)

Хорошо перемешайте **концентрат Рабочего буфера**. Разбавьте 5,0 мл концентрата дистиллированной водой в мерном цилиндре до конечного объёма 100,0 мл. Перемешайте, избегая вспенивания. Храните Разбавитель образцов при 2-8 °C. Разбавитель образцов стабилен 30 дней.

Рабочий буфер (1x) также может быть приготовлен согласно следующей таблице:

Кол-во стрипов	Концентрат Рабочего буфера (мл)	Дистиллированная вода (мл)
1-6	2.5	47.5
1-12	5.0	95.0

### 9.3 HRP-Конъюгат

**Заметьте, что Конъюгат должен быть использован в течение 30 минут после разведения.**

Приготовьте необходимое количество HRP-конъюгата, разведя HRP-конъюгат в 100 раз рабочим буфером непосредственно перед использованием в чистой пластиковой посуде, согласно таблице:

Кол-во стрипов	Конъюгат (мл)	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0.03	2.97
1-12	0.06	5.94

### 9.4 Стандарт человеческого sP-Селектина

Растворите **Стандарт sP-Селектина** в дистиллированной воде. Необходимый объем для растворения указан на этикетке флакона, содержащего стандарт. Осторожно перемешивайте до полного растворения. Конечная концентрация полученного раствора составит 80 нг/мл.

Оставить стандарт для восстановления на 10-30 минут. Хорошо перемешать перед проведением разбавлений.

После использования оставшийся стандарт не может храниться и должен быть выброшен.

**Разведение стандарта** могут производиться непосредственно на планшете (см. пункт 10с) или альтернативно в пробирках (см. Пункт 9.4.1)

#### 9.4.1 Внешнее разведение Стандарта

Пометить 7 пробирок, одну для каждой точки стандарта. S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7.

Затем подготовить серийные разведения 1:2 для стандартной кривой как указано ниже:

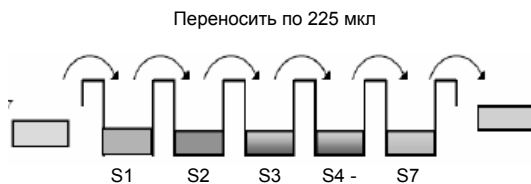
Пипетировать 225 мкл Разбавителя Образцов в каждую пробирку.

Пипетировать 225 мкл восстановленного стандарта (концентрация стандарта = 80 нг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1 = 40 нг/мл).

Пипетировать 225 мкл этого раствора во вторую пробирку, помеченную S2, и тщательно перемешать перед следующим перемещением.

Повторить серийные разведения еще 5 раз, таким образом формируя точки стандартной кривой (См. рисунок ниже).

Разбавитель образцов служит в качестве бланка.



Восстановленный Стандарт Человеческого sP-Селектина      Разбавитель образцов 225 мкл      Удалить 225 мкл

### 9.5 Контроли

Восстановите добавлением 100 мкл дистиллированной воды к лиофилизированному **контролям**. Дайте отстояться 10-30 минут. Дальше используйте контроли в исследовании как образец. Данные по контролю см. на его этикетке или в сертификате анализа. Храните аликвоты восстановленного контроля при -20 °C. Избегайте повторных замораживаний-размораживаний.

### 9.6 Добавление окрашивающих реагентов: голубого, зеленого

Для исключения ошибок в пипетировании при работе с иммуноферментными наборами фирма Bender MedSystems теперь предлагает дополнительное средство для контроля пипетирования даже очень маленьких объемов реагентов – каждый реагент будет отличаться от других цветом.

Эта процедура **необязательна**, она не влияет на результаты анализа и предназначена для облегчения работы лаборанта, поэтому можно этот шаг инструкции пропустить (не выполнять). Альтернативно, можно использовать основные растворы красителей (голубой, зелёный), добавляя их к соответствующему реагенту согласно протоколу (смотри Таблицы ниже).

**1. Разбавитель образцов:** перед разбавлением образцов добавьте **голубой краситель** в соотношении 1:250 (См. Таблицу) в рабочий раствор **Разбавителя образцов** (1x) и выполняйте дальше исследование, следуя инструкции.

5 мл Разбавителя образцов	20 мкл <b>Голубого красителя</b>
12 мл Разбавителя образцов	48 мкл <b>Голубого красителя</b>
50 мл Разбавителя образцов	200 мкл <b>Голубого красителя</b>

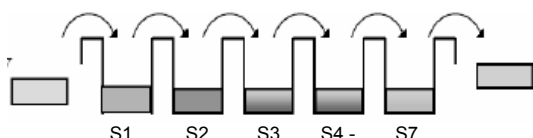
**2. HRP-Конъюгат:** перед разбавлением концентрата HRP-конъюгата добавьте **зелёный краситель** в соотношении 1:100 (смотри таблицу) к Рабочему буферу, используемому для разбавления конъюгата, окрашенный HRP-конъюгат используйте согласно инструкции.

3 мл Рабочего буфера (1 x)	30 мкл <b>Зеленого красителя</b>
6 мл Рабочего буфера (1 x)	60 мкл <b>Зеленого красителя</b>
12 мл Рабочего буфера (1 x)	120 мкл <b>Зеленого красителя</b>

## 10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

- a. Достаньте требуемое для проведения анализа число 8-луночных стрипов. Поместите требуемое количество стрипов в держатель (к необходимому числу ячеек для Образцов добавьте ячейки для Бланка, Стандартов и Контроля). Все Стандарты, Бланк и Образцы необходимо анализировать в дублях. Неиспользованные стрипы сразу уберите в пакет с осушителем и храните плотно закрытым при 2-8 °С.
- b. Промойте ячейки 2 раза 400 мкл **Промывочного Буфера**, полностью удаляя жидкость между промывками. Оставьте на **10-15 секунд**. Избегайте царапин на поверхности ячеек. Стряхните планшет на фильтровальной бумаге после последней промывки. Используйте стрипы немедленно после стряхивания или максимум через 15 минут при условии, что стрипы уложены на влажную фильтровальную бумагу в перевернутом виде. **Не позволяйте ячейкам высыхать!**
- c. **Разведение стандарта на планшете** (альтернативно разведение стандарта может быть приготовлено в пробирках): Добавить 100 мкл Разбавителя для образцов в дублях ко всем **стандартам**. Приготовьте стандартные разведения добавлением по 100 мкл разбавленного **Стандарта** (раздел «Приготовление реагентов» 9.4) в ячейки A1 и A2 в дублях (См. табл. 1). Перемешайте содержимое ячеек A1 и A2 и перенесите по 100 мкл раствора из ячеек A1 и A2 в ячейки B1 и B2 соответственно. Во время этих манипуляций постарайтесь не поцарапать внутреннюю поверхность ячеек. Повторите перенос и разведение стандартов 5 раз, получив в итоге 2 ряда разведений **Стандарта sP-Селектина** в диапазоне от 40.0 до 0.63 нг/мл. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).

Переносить по 100 мкл



Восстановленный Стандарт Человеческого sP-Селектина      Разбавитель образцов 100 мкл      Удалить 100 мкл

При **внешнем разведении стандарта** пипетировать 100 мкл этих разведенных стандартов (S1-S7) в лунки для стандартов согласно таблице 1.

Таблица 1: Схема расположения образцов, бланка и стандартов на планшете.

	1	2	3	4
<b>A</b>	Ст #1 (40.0 нг/мл)	Ст #1 (40.0 нг/мл)	O 1	O 1
<b>B</b>	Ст #2 (20.0 нг/мл)	Ст #2 (20.0 нг/мл)	O 2	O 2
<b>C</b>	Ст #3 (10.0 нг/мл)	Ст #3 (10.0 нг/мл)	O 3	O 3
<b>D</b>	Ст #4 (5.0 нг/мл)	Ст #4 (5.0 нг/мл)	O 4	O 4
<b>E</b>	Ст #5 (2.50 нг/мл)	Ст #5 (2.50 нг/мл)	O 5	O 5
<b>F</b>	Ст #6 (1.25 нг/мл)	Ст #6 (1.25 нг/мл)	O 6	O 6
<b>G</b>	Ст #7 (0.63 нг/мл)	Ст #7 (0.63 нг/мл)	O 7	O 7
<b>H</b>	Бланк	Бланк	O 8	O 8

Ст – Стандарт, O – образец

- d. Внесите по 100 мкл **Разбавителя образцов** в дубликаты в ячейки «Бланк».
- e. Внесите по 90 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для образцов.
- f. Внесите по 10 мкл каждого **образца** в дублях в соответствующие ячейки.
- g. Приготовьте **HRP-конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов»).
- h. Добавьте по 50 мкл **HRP-конъюгата** во все ячейки.
- i. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25 °С), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- j. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек. **Промойте** ячейки 3 раза как указано в шаге «b» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- k. Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора ТМБ** во все ячейки.
- l. Инкубируйте при комнатной температуре в течение примерно 30 минут. Избегайте прямого солнечного света. **За развитием окраски необходимо наблюдать и субстратная реакция должна быть остановлена (см. следующий пункт протокола) до того, как значение**

**оптической плотности в положительных лунках превысят предел определения прибора.**

Рекомендуется добавление стоп раствора, когда наивысший стандарт достиг темно-синего цвета. Реакция должна быть остановлена как только Стандарт 1 достиг значения ОП 0.9 – 0.95.

- m. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в ячейках. Важно вносить стоп-реагент быстро и с той же скоростью, что и субстратный раствор. Оптическую плотность считать немедленно после внесения стоп-реагента или в течение 1 часа при условии, что стрипы находились всё это время при температуре 2-8 °С в темноте.
- n. Определите оптическую плотность всех ячеек при 450 нм против «Бланка», желательнее использовать длину волны сравнения 620 нм (допустима длина волны сравнения в диапазоне 610-650 нм). Бланкируйте микропланшетный ридер согласно руководству производителя, используя ячейки «Бланк». Определите ОП как в ячейках, содержащих образцы, так и в ячейках, содержащих разведения стандарта.

**Замечание: если инкубация проводилась без встряхивания, значения могут быть ниже, чем в примере, приведённом ниже. Тем не менее, эти результаты также считаются достоверными.**

## 11. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитайте результаты. Для этого рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта и образца. Отклонение от среднего не должно быть более 20%.
- Используя графическую бумагу, отметьте точки считанных значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации sP-Селектин на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации sP-Селектин в образцах из стандартной кривой. Для этого найдите значение на оси ординат (Y) соответствующее среднему значению полученной для каждого образца ОП и проведите горизонтальную линию до пересечения со стандартной кривой. Затем из точки пересечения проведите вертикальную линию до пересечения с осью абсцисс (X). Значение на оси X в точке пересечения и будет соответствовать концентрации sP-Селектин в соответствующей пробе.
- В ходе анализа, согласно данной инструкции, образцы были разведены 1:10, следовательно, концентрации, полученные из калибровочной кривой, должны быть умножены на коэффициент разведения (x10).**
- Расчет образцов с концентрацией, превышающей Стандарт 1, может привести к неправильным результатам с низким уровнем человеческого sP-Селектина. Такие образцы требуют дальнейшего внешнего предварительного разведения в соответствии с ожидаемыми значениями sP-Селектина с Растворителем для образцов в целях точного количественного определения уровней фактического человеческого sP-Селектина.**
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией sP-Селектина. Если значения контроля не укладываются в ожидаемый диапазон, результаты анализа могут быть недостоверны.
- Пример стандартной кривой показан на Рисунке ниже. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

**Рисунок.** Пример стандартной кривой для sP-Селектина. sP-Селектин был разбавлен в серии двукратных последовательных шагов титрования Разбавителем образцов. Здесь представлены средние значения из трех параллельных титрований. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

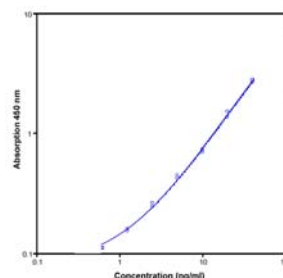


Таблица: Типичные результаты, полученные с использованием данного набора.  
Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	sP-Селектин, нг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	40.0	2.777 2.643	2.710	3.5
2	20.0	1.505 1.357	1.431	7.3
3	10.0	0.729 0.699	0.714	3.0
4	5.0	0.445 0.422	0.433	3.7
5	2.50	0.262 0.244	0.253	4.9
6	1.25	0.159 0.153	0.156	2.8
7	0.63	0.111 0.110	0.111	0.6
Бланк	0.0	0.065 0.067	0.066	2.1

ОП, полученные для стандартов, могут меняться в зависимости от условий выполнения анализа (например, температурный режим). Кроме того, на протяжении срока годности набора энзиматическая активность, и, следовательно, интенсивность окрашивания, могут изменяться. При этом результаты тестирования остаются достоверными.

## 12. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Так как условия могут меняться от анализа к анализу, стандартная кривая должна быть включена в каждую серию анализа.
- Бактериальное или грибковое загрязнение образцов или реактивов может привести к недостоверным результатам.
- Используйте одноразовые наконечники.
- Стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта.
- Неполная промывка негативно влияет на точность результатов. Полностью удаляйте Промывочный буфер из ячеек между циклами промывки. Не позволяйте ячейкам высохнуть между шагами анализа.
- Использование радиоиммунотерапии значительно увеличило число пациентов с человеческими антимышиными IgG (НАМА). НАМА могут интерферировать в анализе, используя мышиные моноклональные антитела, приводя к ложно положительным и ложно отрицательным результатам. Образцы сыворотки, содержащие антитела к мышиным иммуноглобулинам, могут быть проанализированы в случае, когда мышиные иммуноглобулины (сыворотка, асцитная жидкость или моноклональные антитела другой специфичности) добавляются к Разбавителю образцов.

## 13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 13.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация sP-Селектина, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 0.20 нг/мл (среднее 6 независимых определений).

### 13.2 Воспроизводимость

#### 13.2.1 Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась в 3 независимых сериях анализа. В каждый серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации sP-Селектина. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения sP-Селектина и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 7.8 %.

Таблица 3: Среднее значение концентрации и коэффициент вариации для каждого образца

Образцы	Эксперимент	Средняя концентрация, нг/мл	Коефф. вариации (%)
1	1	188.60	6.8
	2	172.56	9.7
	3	177.60	6.7
2	1	182.58	9.4
	2	189.48	9.8
	3	208.08	3.9
3	1	131.37	10.8
	2	141.99	12.7
	3	146.63	4.1

4	1	60.49	10.4
	2	62.25	12.0
	3	61.62	5.8
5	1	68.18	8.8
	2	66.87	7.2
	3	68.72	3.9
6	1	47.95	9.9
	2	51.62	7.0
	3	49.33	3.0
7	1	11.43	5.5
	2	13.40	13.9
	3	13.18	9.5
8	1	8.59	4.7
	2	10.77	8.9
	3	9.72	4.0

### 13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями в одной лаборатории определялась в 3-х независимых сериях анализа тремя разными лаборантами. В каждый серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации sP-Селектина. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения sP-Селектина и коэффициент вариации для каждого образца, рассчитанный из 18 определений каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 5.4 %.

Таблица 4: Среднее значение концентрации и коэффициент вариации каждого образца

Образец	Среднее значение концентрации, нг/мл	Коеэффициент вариации, %
1	179.59	4.6
2	193.38	6.8
3	140.00	5.6
4	61.46	1.5
5	67.92	1.4
6	49.63	3.7
7	12.67	8.5
8	9.69	11.2

### 13.3 Извлечение

Извлечение sP-Селектина определялось добавлением 3-х уровней концентраций sP-Селектина в образцы человеческой сыворотки. Извлечение sP-Селектина в трёх независимых сериях анализа по 6 повторам образца было определено по отношению к ожидаемому значению (рассчитанному из значений концентрации сывороток и количества добавленного sP-Селектин).

Sample matrix	Spike high (%)	Spike medium (%)	Spike low (%)
Serum	69	81	79
Plasma (EDTA)	58	61	70
Plasma (citrate)	85	83	93
Plasma (heparin)	83	68	66

### 13.4. Линейность

4 образца сыворотки с разными уровнями человеческого sP-Селектина были проанализированы в серийных 2х разведениях с 4 повторами каждый.

Восстановление колебалась от 81.3% до 108.9% с общим значением 91.6% (таблица 6).

Таблица 6

Образец	Разведение	Ожидаемое значение нг/мл	Наблюдаемое значение нг/мл	Восстановление от ожидаемой концентрации %
1	1:10	--	126.90	--
	1:20	63.45	56.21	88.6
	1:40	31.73	26.70	84.2
	1:80	15.86	12.90	81.3
2	1:10	--	159.74	--
	1:20	79.87	78.93	98.8
	1:40	39.93	40.06	100.3
	1:80	19.97	21.75	108.9
3	1:10	--	217.00	--
	1:20	108.50	97.05	89.4
	1:40	54.25	45.44	83.8
	1:80	27.12	22.21	81.9
4	1:10	--	102.12	--

1:20	51.06	49.01	96.0
1:40	25.53	24.66	96.6
1:80	12.76	11.41	89.4

### 13.5 Стабильность образцов

#### 13.5.1 Стабильность при замораживании-размораживании

Аликвоты сыворотки (без добавленного sP-Селектина и с добавлением sP-Селектина) хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  и размораживались 5 раз, после чего определялись уровни sP-Селектина. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности sP-Селектина.

#### 13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты сыворотки (без добавленного sP-Селектина и с добавлением sP-Селектина) хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $2-8^{\circ}\text{C}$ , комнатной температуре и при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов, после чего определялись уровни sP-Селектина. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности sP-Селектина.

### 13.6 Сравнение сыворотки и плазмы

От 2 отдельных лиц были получены образцы как сыворотки, так и ЭДТА, цитратной и гепариновой плазмы в одно и тоже время, и проанализированы на наличие человеческого sP-Селектина. Концентрации существенно не отличались и, следовательно, все эти препараты крови являются подходящими для использования в анализе. Но, тем не менее настоятельно рекомендуется обеспечить равномерность препаратов крови.

### 13.7 Специфичность

Этот метод распознаёт обе: естественную и рекомбинантную формы человеческого sP-Селектина. Интерференция циркулирующих факторов иммунной системы была оценена в образцах с добавлением конкретных белков, и для sP-Селектина не была обнаружена перекрёстная активность с этими белками, а также с sE-Селектином и sL-Селектином в этом анализе.

### 13.8 Ожидаемые значения

Панель из 40 сывороток случайно выбранных практически здоровых людей (мужчин и женщин) была протестирована на содержание sP-Селектина.

Измеренные уровни могут изменяться в зависимости от способа отбора образцов, который используется.

Значения обнаруженных уровней человеческого sP-Селектина указаны в табл. 7.

Sample Matrix	Number of Samples Evaluated	Range (ng/ml)	Mean (ng/ml)
Serum	40	67 - 233	126
Plasma (EDTA)	40	50 - 165	106
Plasma (Citrate)	40	92 - 212	135
Plasma (Heparin)	40	60 - 188	129

## 15. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

### 15.1 Промывочный буфер (1x)

Добавить Концентрат Промывочного буфера 20x (50 мл) в 950 мл дистиллированной воды.

Количество стрипов	Концентрат Рабочего буфера, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

### 15.2 Рабочий буфер (1x)

Количество стрипов	Концентрат Рабочего буфера, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

### 15.3 HRP-Конъюгат (1x)

Приготовить разведение 1:100 согласно таблице:

Количество стрипов	Концентрат HRP-конъюгата, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

## 15.4 Стандарт

Растворите лиофилизированный стандарт **дистиллированной водой** (точный объем стандартного раствора, который должен получиться в результате растворения, указан на этикетке флакона).

## 15.5 Контроли

Добавить 100 мкл дистиллированной воды к лиофилизированным контролям.



**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)