

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО VE-КАДГЕРИНА

BMS253/BMS253TEN, Human VE-cadherin

Каталог. №: BMS253/BMS253TEN
Количество: 96, 10x96
Производитель: Bender MedSystems
GmbH, (Австрия)

Методика от 14-08-2012
Версия 23



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 VE-cadherin ELISA предназначен для количественного определения растворимого человеческого кадгерина сосудистого эндотелия (VE-кадгерина) в супернатантах клеточных культур, человеческой сыворотке, плазме, или других биологических жидкостях человека. **Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических или терапевтических процедурах.**

2. ВВЕДЕНИЕ

Показано, что кадгерин-5 функционально и структурно отличается от классических кадгеринов (таких, как E-, N-, P-кадгерины). Из-за своих функциональных особенностей и локализации кадгерин-5 был назван VE-кадгерин. Это белок с молекулярной массой приблизительно 130 кДа.

VE-кадгерин относится к молекулам адгезии, отвечающим за клеточное взаимодействие. Ген кадгерина сосудистого эндотелия (VE-кадгерин) кодирует Ca²⁺-зависимую молекулу адгезии, необходимую в организации межклеточных соединений эндотелиальных клеток. Этот ген экспрессируется конститутивно и только в эндотелиальных клетках. Соответствующий белок, кадгерин, специфический для эндотелия, локализован в местах межклеточных соединений. VE-кадгерин опосредует гомофильную кальций-зависимую агрегацию и слипание клетки с клеткой. Кроме того, он снижает межклеточную проницаемость для молекул с высоким молекулярным весом и степень миграции клеток через поврежденную область. Таким образом, VE-кадгерин может играть важную роль в функционировании эндотелия, контролируя слипание и образование межклеточных соединений.

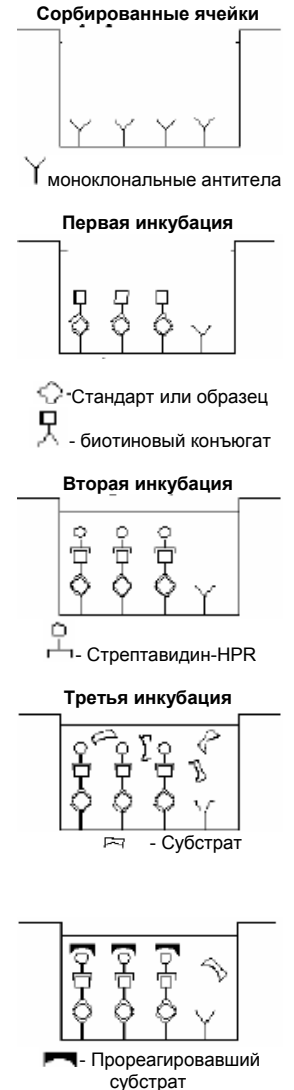
Открытие эндотелиального барьера, поддерживаемого VE-кадгерином, может являться важным этапом в процессе преодоления эндотелиального барьера нейтрофилами. Это означает, что несмотря на то, что по своей структуре VE-кадгерин является "неклассическим" кадгерином, он функционирует как классический кадгерин.

Стимуляция фактором роста сосудистого эндотелия (VEGF) приводит к максимальному фосфорилированию VE-кадгерина. VE-кадгерин - это трансмембранный белок, внутриклеточный домен которого взаимодействует с цитоплазматическими белками, называемыми катенинами, передающими адгезионный сигнал после этой активации. Следовательно, экстрацеллюлярного домена VE-кадгерина достаточно для ранних стадий адгезии клетки и распознавания. Однако, взаимодействие VE-кадгерина с цитоскелетом, через цитоплазматический домен является необходимым для обеспечения силы и сцепления молекул адгезии. Кроме его установленной роли в контроле проницаемости сосудистого эндотелия, эта молекула может обладать подобной же функцией в периневрои, играя важную роль в поддержании гематоэнцефалического барьера. Кроме того, он способен поддерживать капиллярную архитектуру, образованную фибрином или коллагеном. Специфические молекулы клеточной адгезии, такие как VE-кадгерин, участвуют в последовательных событиях дифференцировки эндотелиальных клеток, апоптозе и ангиогенезе. Иммунохимическими методами изменения экспрессии VE-кадгерина были описаны при различных опухолях, таких как гемангиомы, глиобластомы и саркомы Капош. Совсем недавно было показано инициация апоптоза в эндотелиальных клетках коррелирует с расщеплением и разборкой компонентов адгезионных контактов. Внеклеточная часть этих соединений изменяется в процессе

апоптоза, так как количество VE-кадгерина на поверхности клеток значительно снижается. Выявляются внеклеточные фрагменты VE-кадгерина. Такое сбрасывание VE-кадгерина может быть заблокировано ингибитором металлопротеиназ. Все это может быть частью согласованного механизма разрушения структурных и сигнальных свойств адгезионных контактов и может интенсивно прерывать внеклеточные сигналы, необходимые для выживания эндотелиальных клеток.

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Антитела, специфичные к VE-кадгерину, сорбированы в ячейках планшета.



Человеческий VE-кадгерин в образце или стандарте связывается с антителами в ячейках планшета. Добавляемый конъюгат биотин-моноклональные анти-VE-кадгерина антитела связывают VE-кадгерин, захваченный первыми антителами.

После инкубации и промывки из ячеек удаляется не связавшийся биотиновый конъюгат, и в ячейки добавляется конъюгат стрептавидин-пероксидаза, связывающий биотин, конъюгированный с VE-кадгеринном.

После второй инкубации и промывки из ячеек удаляется не связавшийся стрептавидиновый конъюгат, и в ячейки добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора.

Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации VE-кадгерина, присутствующего в образцах. Концентрация VE-кадгерина в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта.

4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты в наборе Человеческий VE-кадгерин ELISA BMS253 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый поликлональными антителами к человеческому VE-кадгерину	1 планшет
Конъюгат поликлональных анти-VE-кадгерин антител и биотина, 10 мкл	1 флакон
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 200 мкл	1 флакон
Стандарт VE-кадгерина, лиофилизированный, 20 нг/мл до разведения	2 флакона
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	1 флакон
Разбавитель образцов, 12 мл	1 флакон
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10% BSA), 5 мл	1 флакон
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	1 флакон
Стоп-раствор (1M фосфорная кислота), 15 мл	1 флакон
Голубой краситель, 0,4 мл	1 флакон
Зелёный краситель, 0,4 мл	1 флакон
Красный краситель, 0,4 мл	1 флакон
Плётки для заклеивания стрипов	4

4.2 Реагенты в наборе Человеческий VE-кадгерин ELISA BMS253 TEN (10 x 96 тестов)

Микропланшет, покрытый поликлональными антителами к человеческому VE-кадгерину	10 планшетов
Конъюгат поликлональных анти-VE-кадгерин антител и биотина, 10 мкл	10 флаконов
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 200 мкл	10 флаконов
Стандарт VE-кадгерина, лиофилизированный, 20 нг/мл до разведения	10 флаконов
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	4 флакона
Разбавитель образцов, 12 мл	10 флаконов
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл	2 флакона
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	10 флаконов
Стоп-раствор (1M фосфорная кислота), 15 мл	10 флаконов
Голубой краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Зелёный краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Красный краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Плётки для заклеивания стрипов	20

5. ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ – НАБОР ИФА

Храните стандарт и биотиновый конъюгат при -20 °С. Храните остальные реагенты набора при 2-8 °С. Сразу после использования оставшиеся реагенты необходимо вернуть в холодильник (2-8 °С). Сроки годности реагентов и набора указаны на этикетках.

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, гепариновая плазма или другие биологические жидкости могут быть использованы для анализа данным методом. Отделите сыворотку от сгустка или плазму от эритроцитов как можно быстрее.

Образцы, содержащие видимый преципитат, необходимо центрифугировать для отделения преципитата до анализа. Не используйте сильно гемолизные или липемичные 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 VE-кадгерина. 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

1. 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.
2. Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.
3. Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.
4. Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
5. Избегайте облучения реагентов сильным источником света во время хранения и инкубации.
6. Не пипетируйте ртом.
7. Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ.
8. Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми.

9. При ручном методе анализа пользуйтесь латексными перчатками для защиты рук.
10. Избегайте контакта субстратного раствора с металлами и окислителями.
11. Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей.
12. Чтобы избежать микробного загрязнения или загрязнения реактивами и получения в результате недостоверных результатов, пользуйтесь одноразовыми наконечниками.
13. Используйте чистую, специально выделенную посуду для конъюгатов и субстратного раствора.
14. Загрязнение кислотой инактивирует конъюгат.
15. Для приготовления реактивов используйте дистиллированную или деионизированную воду.
16. Субстратный раствор должен иметь комнатную температуру перед использованием
17. Обеззараживайте после работы образцы, так как они могут быть инфицированы, предпочтительно автоклавированием не менее 1 часа при 121,5 °С
18. Жидкие отходы, не содержащие кислоты, 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 кислоты, 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 (1 x)

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

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

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

Количество используемых стрипов	Концентрат Промывающего раствора, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

9.2 Рабочий буфер (1 x)

Хорошо перемешайте концентрат Рабочего буфера. Разбавьте 5,0 мл концентрата дистиллированной водой в мерном цилиндре до конечного объема 100,0 мл. Перемешайте, избегая вспенивания.

Храните Разбавитель образцов при 2-8 °С. Разбавитель образцов стабилен 30 дней.

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

Количество используемых стрипов	Концентрат Разбавителя образцов, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

9.3 Конъюгат биотина

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

Внесите 90 мкл рабочего буфера во флакон с концентратом биотинового конъюгата.

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

Кол-во стрипов	Концентрат конъюгата, мл	Рабочий Буфер, мл
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

9.4 Стрептавидин-HPR

Заметьте, что Стрептавидин-HPR должен быть использован в течение 30 минут после разведения.

Разбавьте концентрат Конъюгата Рабочим буфером в соотношении 1:100 в чистой посуде.

Кол-во стрипов	Стрептавидин-HRP (мл)	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0.06	5.94
1-12	0.12	11.88

6 мл Рабочего буфера (1 x)	24 мкл Красного красителя
12 мл Рабочего буфера (1 x)	48 мкл Красного красителя

9.5 Стандарт человеческого VE-кадгерина

Растворите лиофилизированный **Стандарт VE-кадгерина** в дистиллированной воде. Необходимый объем для растворения указан на этикетке флакона, содержащего стандарт. Осторожно перемешивайте до полного растворения. Конечная концентрация полученного раствора составит 20 нг/мл. После использования оставшийся стандарт не может храниться и должен быть выброшен.

Разведения стандарта могут производиться непосредственно на планшете (см. пункт 10с) или альтернативно в пробирках (си. Пункт 9.5.1)

9.5.1 Внешнее разведение Стандарта

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

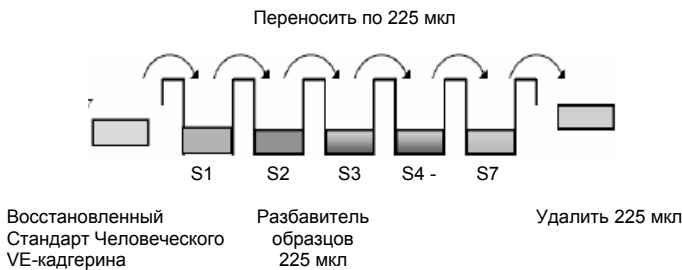
Затем подготовить серийные разведения 1:2 для стандартной кривой как указано ниже:

Пипетировать 225 мкл Разбавителя Образцов в каждую пробирку. Пипетировать 225 мкл восстановленного стандарта (концентрация стандарта = 20 нг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1 = 10 нг/мл).

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

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

Разбавитель образцов служит в качестве бланка.



9.6 Добавление окрашивающих реагентов: голубого, зеленого и красного

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, красный), 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 Голубого красителя
12 мл Разбавителя образцов	48 мкл Голубого красителя
50 мл Разбавителя образцов	200 мкл Голубого красителя

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

3 мл Рабочего буфера (1 x)	30 мкл Зеленого красителя
6 мл Рабочего буфера (1 x)	60 мкл Зеленого красителя

3. Конъюгат стрептавидина: перед разбавлением концентрата конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена добавьте **красный краситель** в соотношении 1:250 (смотри таблицу) к Рабочему буферу, используемому для разбавления конъюгата, окрашенный стрептавидиновый конъюгат используйте согласно инструкции.

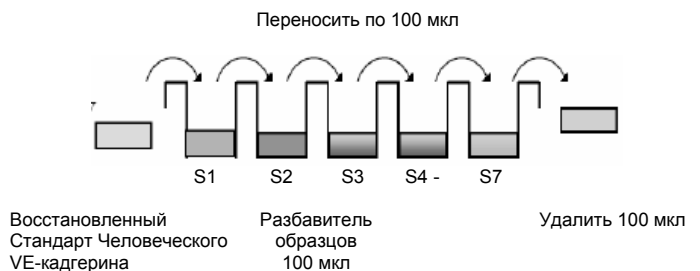
10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

a. Все реагенты и образцы перед началом анализа должны быть выдержаны при комнатной температуре. Жидкие реагенты тщательно перемешайте осторожным переворачиванием перед использованием, избегая образования пены.

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°C.**

b. Промойте ячейки 2 раза 400 мкл **Промывочного Буфера**, полностью удаляя жидкость между промывками. Оставить 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 перевёрнутом виде. **Не позволяйте ячейкам высухать!**

c. **Разведение стандарта на планшете** (альтернативно разбавление 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» 9.5) 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 VE-кадгерина в диапазоне от 10.00 до 0.16 нг/мл. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).



При **внешнем разведении стандарта** пипетировать 100 мкл этих разведений стандартов (S1-S2) в лунки для стандартов согласно таблице 1.

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

	1	2	3	4
A	Ст #1 (10.00 нг/мл)	Ст #1 (10.00 нг/мл)	O 1	O 1
B	Ст #2 (5.00 нг/мл)	Ст #2 (5.00 нг/мл)	O 2	O 2
C	Ст #3 (2.50 нг/мл)	Ст #3 (2.50 нг/мл)	O 3	O 3
D	Ст #4 (1.25 нг/мл)	Ст #4 (1.25 нг/мл)	O 4	O 4
E	Ст #5 (0.63 нг/мл)	Ст #5 (0.63 нг/мл)	O 5	O 5
F	Ст #6 (0.31 нг/мл)	Ст #6 (0.31 нг/мл)	O 6	O 6
G	Ст #7 (0.16 нг/мл)	Ст #7 (0.16 нг/мл)	O 7	O 7
H	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 80 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для образцов.
- f. Внесите по 20 мкл каждого **образца** в дублях в соответствующие ячейки.
- g. Приготовьте **биотиновый конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов»).
- h. Добавьте по 50 мкл **биотинового конъюгата** во все ячейки.

- i. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- j. Приготовьте **стрептавидиновый конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов»).
- k. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 4 раза как указано в шаге «с.» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- l. Внесите по 100 мкл разбавленного стрептавидинового конъюгата во все ячейки, включая бланк.
- m. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- n. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 4 раза как указано в шаге «с.» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- o. Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора** ТМБ во все ячейки.
- p. Инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течение примерно 10 минут. Время инкубации с субстратным раствором определяется типом используемого микропланшетного ридера. Многие ридеры способны считать оптическую плотность только до 2,0 Ед оптической плотности.

Для подобных фотометров реакция должна быть остановлена до достижения наиболее ярко окрашенными ячейками предела измерения инструмента.

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.

- q. 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°C в темноте.
- г. Определите оптическую плотность всех ячеек при 450 нм против «Бланка», желательно 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 VE-кадгерина.

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 VE-кадгерина на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации VE-кадгерина 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 VE-кадгерина в соответствующей пробе.
- **В ходе анализа, согласно данной инструкции, образцы были разведены в 5 раз, следовательно концентрации, полученные из калибровочной кривой, должны быть умножены на коэффициент разведения (x5).**
- **Замечание: расчёт образцов с оптической плотностью выше 2.0 может быть некорректен – результаты будут занижаться. Такие образцы необходимо дополнительно развести буфером для разведения и протестировать еще раз, для получения результата, отражающего точную концентрацию VE-кадгерина.**
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией VE-кадгерина. 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 VE-кадгерина. VE-кадгерин 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.

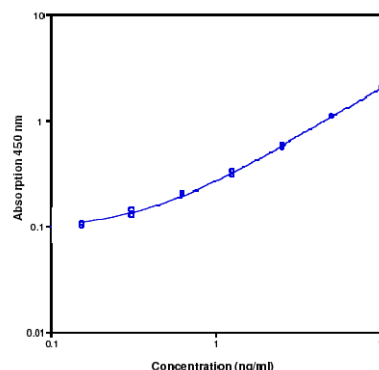


Таблица: Типичные результаты, полученные с использованием данного набора.

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	VE-кадгерин, нг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	10.00	1.954 2.011	1.983	2.0
2	5.00	1.101 1.072	1.083	1.6
3	2.50	0.582 0.552	0.568	3.7
4	1.25	0.329 0.299	0.315	6.8
5	0.63	0.205 0.201	0.204	1.4
6	0.31	0.143 0.125	0.135	9.5
7	0.16	0.106 0.099	0.103	4.8
Бланк	0.00	0.080 0.085	0.083	4.3

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 высыхать между шагами анализа.
- Использование радиоиммунотерапии значительно увеличило число пациентов с человеческими антимышиными IgG (НАМА). НАМА могут интерферировать в анализе, использующем мышинные моноклональные антитела, приводя к ложно положительным и ложно отрицательным результатам. Образцы сыворотки, содержащие антитела к мышинным иммуноглобулинам, могут быть проанализированы в случае, когда мышинные иммуноглобулины (сыворотка, асцитная жидкость или моноклональные антитела другой специфичности) добавляются к Разбавителю образцов.

13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация VE-кадгерина, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных

отклонения), составила 0.10 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 сывороток, содержащих различные концентрации VE-кадгерина. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения VE-кадгерина и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 4.1 %.

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

Образец	Серия анализа	Концентрация VE-кадгерина, (пг/мл)	Коэффициент вариации, CV (%)
1	1	14.7	10.4
	2	14.0	11.1
	3	12.3	6.3
2	1	27.4	2.4
	2	33.0	4.5
	3	33.5	4.8
3	1	49.4	2.6
	2	51.5	0.7
	3	58.8	3.2
4	1	15.3	2.9
	2	16.2	4.1
	3	16.8	2.7
5	1	17.0	2.6
	2	18.1	2.1
	3	18.5	6.8
6	1	15.4	1.9
	2	16.9	2.7
	3	17.1	4.6
7	1	16.3	7.1
	2	16.6	0.9
	3	18.0	2.7
8	1	15.6	5.1
	2	16.4	3.7
	3	18.5	2.9

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 VE-кадгерина. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения VE-кадгерина и коэффициент вариации для каждого образца, рассчитанный из 18 определений каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 7.2 %.

Таблица 3: Среднее значение концентрации и коэффициент вариации каждого образца

Образец	Концентрация VE-кадгерина, нг/мл	Коэффициент вариации (%)
1	13.7	9.2
2	31.3	10.7
3	53.2	9.2
4	16.1	4.8
5	17.9	4.1
6	16.4	5.6
7	17.0	5.4
8	16.8	8.9

13.3 Извлечение

Извлечение оценивали тестируя 4 образца пулированной человеческой сыворотки, обогащенные 4 разными уровнями VE-кадгерина человека. Количество эндогенного VE-кадгерина в не обогащенной сыворотке вычитали из значений, полученных для обогащенного образца. Извлечение составило в среднем 82%, в диапазоне от 61 % до 109%.

13.4. Линейность

4 образца человеческой сыворотки, с различными уровнями VE-кадгерина, были проанализированы в 4 сериях двукратных разведений, по 4 повтора каждого. В таблице приведены значения извлечения (% от ожидаемого значения). Показано, что извлечение в среднем составило 113%, в диапазоне от 100% до 122%.

Таблица 5

образец	разведение	Концентрация VE-кадгерин, пг/мл		
		Ожидаемое	Наблюдаемое	% извлечения
1	1:5	--	19.3	--
	1:10	9.7	11.3	116
	1:20	5.7	6.1	107
	1:40	3.1	3.7	119
2	1:5	--	17.6	--
	1:10	8.8	10.1	115
	1:20	5.01	5.2	103
	1:40	2.6	3.0	115
3	1:5	--	16.3	--
	1:10	8.2	9.9	120
	1:20	5.0	6.1	122
	1:40	3.0	3.5	117
4	1:5	--	25.9	--
	1:10	12.9	13.0	100
	1:20	6.5	6.8	104
	1:40	3.4	3.8	114

13.5 Стабильность образцов

13.5.1 Стабильность при замораживании-размораживании

Аликвоты образцов сыворотки (обогащенные и нет) хранили при температуре -20°C, и оттаивали до 5 раз, после чего определяли уровни VE-кадгерина. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности VE-кадгерина после 5 повторных циклов замораживания/оттаивания.

13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты образцов сыворотки (обогащенные и нет) хранились при температуре -20°C, 2-8°C, комнатной температуре (RT) и при 37°C в течение 24 часов, после чего определялись уровни VE-кадгерина. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности VE-кадгерина при хранении при всех перечисленных условиях.

13.6 Специфичность

Влияние циркулирующих факторов иммунной системы было оценено путем добавления к образцам с известной концентрацией VE-кадгерина физиологически значимых количеств исследуемых факторов. Перекрестная реактивность не была выявлена ни с одним из исследованных факторов.

13.7 Ожидаемые значения

Уровень VE-кадгерина был измерен в 40 образцах сыворотки и плазмы у здоровых доноров.

Таблица 6 (См. оригинал инструкции).

15. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

15.1 Промывочный буфер (1 x)

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 (1 x)

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

15.3 Конъюгат биотиновый (1 x)

Приготовить разведение 1:100 согласно таблице:

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

15.4 Конъюгат стрептавидиновый (1 x)

Количество стрипов	Концентрат стрептавидинового конъюгата, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,06	5,94
1-12	0,12	11,88

15.5 Стандарт

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

16. ПРОТОКОЛ ТЕСТА (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

1. Промыть ячейки планшета дважды **Промывочным буфером**
2. Добавьте по 100 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для Стандартов (в дублях).
3. Приготовьте стандартные разведения на планшете: добавлением 100 мкл разбавленного Стандарта VE-кадгерина в ячейки A1 и A2, создайте разведения стандарта VE-кадгерина переносом по 100 мкл из ячейки в ячейку. Удалите и выбросите 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).
Альтернативное разведение стандарта в пробирках: пипетировать 100 мкл этих разведений стандарта в лунки.
4. Внесите по 100 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки «Бланк».
5. Внесите по 80 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для образцов.
6. Внесите по 20 мкл каждого **образца** в соответствующие ячейки.
7. Приготовьте **биотиновый конъюгат**.
8. Добавьте по 50 мкл разбавленного **биотинового конъюгата**, готового для использования, во все ячейки, включая Бланк.
9. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18 – 25°C).
10. Приготовьте **стрептавидиновый конъюгат**.
11. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 3 раза **Промывочным буфером**.
12. Внесите по 100 мкл **стрептавидинового конъюгата** во все ячейки.
13. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18 – 25°C).
14. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 3 раза **Промывочным буфером**.
15. Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора TMB** во все ячейки, включая Бланк.
16. Инкубируйте при комнатной температуре примерно 10 минут.
17. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки, включая Бланк.
18. Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм против «Бланка», желателно использовать длину волны сравнения 610-650 нм.

Замечание: Для образцов, разбавленных согласно инструкции, умножьте результат, полученный по стандартной кривой на фактор разведения 5.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com