

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПЛАЦЕНТАРНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА (PLGF) В СУПЕРНАТАНТЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК, СЫВОРОТКЕ, ПЛАЗМЕ И МОЧЕ

DPG00, Human PLGF Immunoassay

Каталог. № : **DPG00**
Количество : **96**
Производитель: **R&D (Великобритания)**

Методика от **10-11**
Версия **750208.11**



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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

(См. оригинал инструкции на англ. языке).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данная тест-система основана на количественном иммуноферментном анализе сэндвичевого типа. Моноклональные антитела к PLGF нанесены в ячейки микропланшета. Стандарты и образцы вносятся в ячейки и присутствующий в них PLGF связывается с антителами. Вторые антитела к PLGF, меченные ферментом, вносятся в ячейки. Последующая промывка удаляет несвязанный конъюгат антител с ферментом, после чего в ячейки вносится раствор ферментного субстрата, развитие окраски пропорционально количеству PLGF, связавшегося на первом шаге анализа. Цветную реакцию останавливают и считывают оптическую плотность ячеек.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- ИСПОЛЬЗОВАТЬ ТОЛЬКО ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЕЙ. НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР
- Данный Набор должен быть использован до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.
- Не смешивайте и не заменяйте реагенты с реагентами других лотов или других производителей.
- Если значения концентрации образцов выше, чем концентрация самого высокого стандарта, разведите образцы соответствующим буфером для разведения стандарта и повторите анализ.
- Любые изменения в буфере для разведения стандарта, выполнении процедуры, техники пипетирования, промывки, времени инкубации или температуре и сроке годности набора могут быть причиной изменений в связывании.
- Данный метод предполагает исключение влияния растворимых рецепторов, связывающих белков и других факторов, присутствующих в биологических образцах. До проверки всех факторов, однако, возможность влияния не может быть исключена.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- При перемешивании белковых растворов избегайте вспенивания.
- Избегайте взаимной контаминации растворов, заменяйте наконечник на новый каждый раз при внесении стандарта другой концентрации, нового образца и нового реагента. Также для каждого реагента необходимо использовать отдельные резервуары (ванночки).

- Для получения корректных результатов закрывайте планшет адгезивной плёнкой каждый раз на время инкубации.
- При использовании автоматического вошера для промывок, установите после добавления буфера для промывок период замачивания 30 секунд, и/или вращение микропланшета на 180 градусов между шагами промывок может повысить точность результатов.
- Субстратный раствор должен оставаться бесцветным до момента добавления в ячейки. Храните в тёмном месте. Цвет Субстратного раствора во время реакции должен изменяться от бесцветного до голубого различной интенсивности.
- Стоп-раствор необходимо добавлять в ячейки в той же последовательности и с той же скоростью, что и Субстратный раствор. Цвет в ячейках будет меняться с голубого на жёлтый при добавлении стоп-реагента. Зеленый цвет в лунках свидетельствует о том, что стоп-раствор не был тщательно перемешан с раствором субстрата.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Хранить невскрытый набор при 2-8 °С. Не использовать после окончания срока годности.

Реагент	№ реагента	Кат.№ DPG00	Кат.№ SPG00	Описание	Хранение открытых / восстановленных материалов
PLGF Микропланшет	890509	1 планшет	6 планшетов	96-луночный полистироновый микропланшет (12 x 8 лунок), покрытый мышиными моноклональными антителами к PLGF	Верните оставшиеся стрипы в пакет с осушителем, закройте zip-застёжку и поместите в холодильник. Неиспользованные стрипы храните в пакете при 2-8 °С 1 месяц*.
PLGF Стандарт	890511	3 флакона	18 флаконов	1 нг/флакон рекомбинантного человеческого PLGF в белковом буферном растворе с консервантами, лиофилизированный.	Избавиться от основного раствора PLGF после 4 часов. Использовать свежий стандарт для каждого анализа.
PLGF Конъюгат	890510	1 флакон	6 флаконов	21 мл/флакон поликлональных антител к PLGF, конъюгированных с пероксидазой хрена, с консервантами.	Можно хранить 1 месяц при температуре 2-8°С*
Рабочий буфер RD1-22	895490	1 флакон	6 флаконов	11 мл/флакон белкового буферного раствора с консервантами. <i>Может содержать кристаллы. Тщательно перемешать перед использованием до полного растворения.</i>	
Буфер для разведения стандарта RD5K	895119	1 флакон	6 флаконов	21 мл/флакон белкового буферного раствора с консервантами. <i>Для образцов супернатантов клеточных культур.</i>	
Буфер для разведения стандарта RD6-11	895489	1 флакон	6 флаконов	21 мл/флакон белкового буферного раствора с консервантами. <i>Для образцов сывороток/плазмы/мочи.</i>	
Концентрат буфера для промывок	895003	1 флакон	6 флаконов	21 мл/флакон 25x буферного солевого раствора с детергентом и консервантами	
Цветной реагент А	895000	1 флакон	6 флаконов	12 мл/флакон стабилизированного раствора перекиси водорода	

Цветной реагент В	895001	1 флакон	6 флаконов	12 мл/флакон стабилизированного раствора хромогена (тетраметилбензидин)
Стоп-раствор	895032	1 флакон	6 флаконов	6 мл/флакон раствор 2 N серной кислоты
Плётки для заклеивания стрипов	Без номера	4 полоски	24 полоски	Адгезивные плёнки

*Учитывая, что не заканчивается срок годности.

DPG00 содержит достаточное количество материалов для запуска ИФА на одном 96-луночном планшете.

SPG00 (SixPak) содержит достаточно материалов для запуска ИФА на шести 96-луночных планшетах.

Этот набор также доступен в PharmPak (R&D Systems, Каталогный № PDPG00). PharmPaks содержат достаточно материала для работы ИФА на 50 микропланшетах. Содержимое флаконов каждого компонента может изменяться. Пожалуйста, обратитесь к документам, сопровождающим ваш заказ, за данными по конкретному флакону.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Микропланшетный ридер с фильтром 450 нм с фильтром сравнения 540 или 570 нм.
- Пипетки и наконечники к ним.
- Деионизированная или дистиллированная вода.
- Впрыскивающая бутылка, ручное или автоматическое промывающее устройство
- Градуированный цилиндр на 500 мл.
- Тестовые пробирки для разбавления стандартов.
- Контроли PLGF человека (опционально; могут быть заказаны отдельно в R&D Systems).

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Некоторые компоненты данного набора содержат азид натрия, который может реагировать со свинцом и медью водопроводной системы с формированием взрывчатых азидов металлов. Уничтожать с большим количеством воды.

Стоп-раствор содержит раствор кислоты. Защищайте глаза, руки, лицо и надевайте защитную одежду при работе с данным набором.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы супернатантов клеточных культур - Центрифугируйте образцы для удаления частиц и анализируйте немедленно или приготовьте аликвоты и храните при -20 °С. Избегайте повторного замораживания-размораживания.

Образцы сыворотки - Если используете сепарационные пробирки, позвольте крови свернуться в течение 30 минут при комнатной температуре. Центрифугируйте 15 минут при 1000 g. Анализируйте сыворотку сразу или приготовьте аликвоты и храните при -20 °С. Избегайте повторного замораживания-размораживания образцов.

Образцы плазмы - Соберите плазму, используя для сбора образцов в качестве антикоагулянта ЭДТА, гепарин или цитрат. Отделите плазму центрифугированием в течение 15 минут при 1000 g на протяжении 30 минут после забора. Анализируйте плазму сразу или приготовьте аликвоты и храните при -20 °С. Избегайте повторного замораживания-размораживания.

Примечание: Для данного анализа не подходят сильно гемолизированные или липемические образцы.

Моча - Асептически собрать первую мочу дня (среднюю порцию) непосредственно в стерильный контейнер. Центрифугировать для удаления твердых частиц, анализировать немедленно или

аликвотировать и хранить при ≤ -20 °С. Следует избегать повторных циклов замораживания-оттаивания.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты должны достичь комнатной температуры перед использованием.

Буфер для промывок - нагрейте концентрат буфера для промывок до комнатной температуры и перемешайте, убедившись, что кристаллы соли, выпавшие в осадок, полностью растворились. Разведите 20 мл концентрата буфера для промывок дистиллированной или деионизированной водой для приготовления 500 мл готового буфера для промывок.

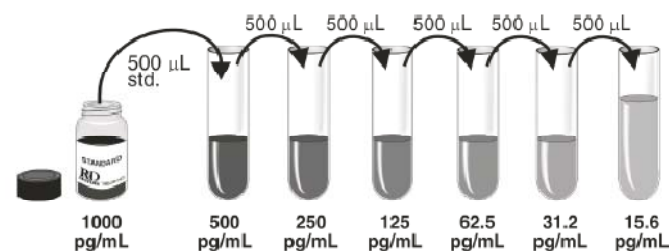
Буфер для разведения Калибратора RD6-11 (1/2X) - Добавить 10 мл Буфера для разведения калибратора RD6-11 к 10 мл деионизированной или дистиллированной воды для приготовления 20 мл Буфера для разведения калибратора RD6-11 (1/2X) (для образцов мочи).

Субстратный раствор - Смешайте равные доли Цветных реагентов А и В в подходящей емкости за 15 минут до использования. Защищайте от света. Для одной лунки необходимо 200 мкл смеси.

PLGF стандарт - Растворите PLGF стандарт с 1.0 мл Растворителя для калибраторов RD5K (для образцов культуры клеток) или Растворителя калибраторов RD6-11 (для образцов сыворотки/плазмы), или Буфера для разведения калибратора RD6-11 (1/2X) (для образцов мочи).

В результате растворения будет получен сток-раствор с концентрацией 1,000 пг/мл. Оставьте на **15 минут** для полного растворения, затем перед дальнейшим разведением перемешайте осторожно, покачиванием.

Добавьте по 500 мкл соответствующего буфера для разведения стандарта в каждую из оставшихся пробирок. Используйте сток-раствор для приготовления серии разведений (см. рисунок), тщательно перемешивая полученные стандарты между шагами разведения. Стандарт 1000 пг/мл используйте в качестве самого высокого стандарта и соответствующий буфер для разведения стандарта в качестве нулевого стандарта (0 пг/мл).



ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Все реагенты и образцы должны достичь комнатной температуры перед использованием. Рекомендуется все стандарты, образцы и контроли анализировать в дуплях.

1. Приготовьте все реагенты, рабочие разведения стандартов и образцы как это описано в предыдущем разделе.
2. Достаньте требуемое для проведения анализа число стрипов. Поместите требуемое количество стрипов в держатель. Верните оставшиеся стрипы в пакет с осушителем.
3. Добавьте по 100 мкл Рабочего буфера RD1-22 во все ячейки. Рабочий разбавитель RD1-22 может содержать кристаллы. Нагреть до комнатной температуры и хорошо перемешать для ресуспендирования перед использованием.
4. Добавьте по 100 мкл каждого стандарта, контроля или образца в соответствующие ячейки. Закройте стрипы адгезивной плёнкой. Инкубируйте 2 часа при комнатной температуре. Компонировка пластины поставляется для записи результатов стандартов и образцов, которые анализируются.

- Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 3 раза. Промывайте, заполняя каждую ячейку 400 мкл буфера для промывок, используя сжимаемую бутылку, многоканальную пипетку ручной диспенсер или устройство для автоматической промывки (вошер). Полное удаление жидкости в каждом цикле промывки принципиально для хорошего качества анализа. После последнего цикла промывки удалите остатки буфера для промывок аспирацией или декантированием. Переверните и подсушите планшет на чистой фильтровальной бумаге.
- Добавьте по 200 мкл PLGF конъюгата в каждую лунку. Закройте стрипы новой адгезивной плёнкой.
Для образцов Супернатанта Культуры Клеток: Инкубируйте 1 час при комнатной температуре.
Для образцов Сыворотки/Плазмы/Мочи: Инкубируйте 2 часа при комнатной температуре.
- Повторите шаг 5 аспирации/промывки.
- Внесите по 200 мкл Субстратного раствора во все ячейки. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре. **Защитайте планшет от воздействия света.**
- Добавьте по 50 мкл стоп-раствора во все ячейки. Если цвет в ячейках зеленый или, если изменение цвета не происходит однородно, постучите осторожно по держателю стрипов для перемешивания реагентов.
- Определите оптическую плотность ячеек в течение 30 минут при 450 нм. Используйте, если это возможно, длину волны сравнения 540 или 570 нм. Это необходимо для устранения оптических дефектов планшета. Если измерения с корректировкой невозможны, вычитите значения, полученные для лунок при длине волны 540 нм или 570 нм из значений, полученных при 450 нм. Считывание только при 450 нм может быть выше и менее точным по сравнению с двухволновым считыванием.

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

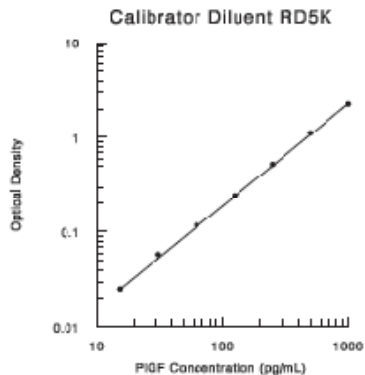
Рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта, контроля и образца и вычитите среднее значение О.П. нулевого стандарта.

Используя графическую бумагу, отметьте точки рассчитанных значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую. Оптимально может использоваться график в координатах log/log, для log трансформации может быть использован регрессионный анализ.

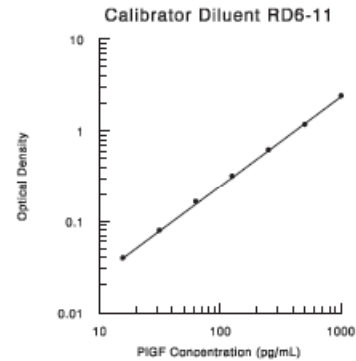
Для определения концентрации PLGF каждого образца сначала найдите соответствующее значение О.П. на оси y и проведите горизонтальную линию до пересечения с калибровочной кривой. Затем из точки пересечения проведите вертикальную линию до пересечения с осью x. Значение на оси X в точке пересечения будет соответствовать концентрации PLGF в образце. Так как образцы разводили, то значение найденной концентрации необходимо умножить на коэффициент разведения.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Пример результатов измерения стандартов PLGF. Эти данные приводятся только в качестве примера. Стандартная кривая должна строиться для каждой серии анализов:



пг/мл	ОП	Среднее ОП	Скорректированное
0	0.051	0.052	----
	0.052		
15.6	0.077	0.077	0.025
	0.077		
31.2	0.111	0.110	0.058
	0.108		
62.5	0.165	0.168	0.116
	0.172		
125	0.285	0.293	0.241
	0.301		
250	0.566	0.575	0.523
	0.584		
500	1.149	1.168	1.116
	1.186		
1000	2.304	2.300	2.248
	2.296		



пг/мл	ОП	Среднее ОП	Скорректированное
0	0.044	0.042	----
	0.040		
15.6	0.086	0.082	0.040
	0.077		
31.2	0.130	0.122	0.080
	0.113		
62.5	0.219	0.208	0.166
	0.196		
125	0.365	0.361	0.319
	0.357		
250	0.669	0.662	0.620
	0.654		
500	1.210	1.216	1.174
	1.222		
1000	2.589	2.456	2.414
	2.323		

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась путем 20 определений каждого из 3 образцов с известной концентрацией на одном планшете.

Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями исследований определялась анализом трех образцов сыворотки с известной концентрацией 40 раз в независимых сериях анализа.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В СУПЕРНАТАНТЕ КЛЕТочНОЙ КУЛЬТУРЫ

Внутри серии:

Образец	Образец 1	Образец 2	Образец 3
n	20	20	20
Среднее значение, (пг/мл)	40.9	138	541
Стандартное отклонение	2.4	7.3	38.2
Коэффициент вариации CV, (%)	5.9	5.3	7.1

Между сериями:

Образец	Образец 1	Образец 2	Образец 3
n	40	40	40
Среднее значение, (пг/мл)	46.9	149	555
Стандартное отклонение	6.4	13.5	32.9
Коэффициент вариации CV, (%)	13.6	9.1	5.9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В СЫВОРОТКЕ/ПЛАЗМЕ/МОЧЕ

Внутри серии:

Образец	Образец 1	Образец 2	Образец 3
n	20	20	20
Среднее значение, (пг/мл)	54.3	175	658
Стандартное отклонение	3.8	6.3	36.9
Коэффициент вариации CV, (%)	7.0	3.6	5.6

Между сериями:

Образец	Образец 1	Образец 2	Образец 3
n	40	40	40
Среднее значение, (пг/мл)	55.0	184	724
Стандартное отклонение	6.5	20.3	78.9
Коэффициент вариации CV, (%)	11.8	11.0	10.9

ИЗВЛЕЧЕНИЕ

Извлечение PLGF, добавленного в образцы с различными концентрациями белка, охватывающими весь измеряемый диапазон, было определено для различных матриц.

Тип образца	Среднее извлечения, %	Диапазон
Культуральная среда (n=5)	97	82-107%
Сыворотка (n=5)	96	88-118%
ЭДТА плазма (n=5)	102	92-117%
Гепариновая плазма (n=5)	94	81-113%
Цитратная плазма (n=5)	99	93-120%
Моча (n=4)	97	85-112%

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Минимально определяемая концентрация (MDD) или чувствительность метода составила менее 7 пг/мл.

Чувствительность была рассчитана добавлением 2 стандартных отклонений к среднему значению оптической плотности 20 измеренных реплик стандарта 0 нг/мл и расчетом соответствующей концентрации.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Образцы с высоким содержанием, или насыщенные до высокой концентрации PLGF были серийно разведены *буфером для разведения стандарта* и проанализированы.

		Культуральная среда (n=5)	Сыворотка (n=5)	ЭДТА плазма без тромбоцитов (n=5)	Гепариновая плазма (n=5)
1:2	Среднее ожидаемое, %	101	100	102	101
	Диапазон, %	97-104	94-106	98-106	97-108
1:4	Среднее ожидаемое, %	103	103	98	101
	Диапазон, %	96-109	96-113	93-100	94-110
1:8	Среднее ожидаемое, %	102	101	98	99
	Диапазон, %	93-107	87-110	88-108	91-112
1:16	Среднее ожидаемое, %	103	95	94	91
	Диапазон, %	93-114	87-110	89-102	86-96

		Цитратная плазма (n=5)	Моча (n=5)
1:2	Среднее ожидаемое, %	101	109
	Диапазон, %	96-104	103-112
1:4	Среднее ожидаемое, %	99	107
	Диапазон, %	81-107	101-112
1:8	Среднее ожидаемое, %	100	106
	Диапазон, %	84-107	94-113
1:16	Среднее ожидаемое, %	103	108
	Диапазон, %	83-118	107-110

КАЛИБРОВКА

Данный иммуноферментный метод был прокалиброван по высокочистому препарату *E.coli* рекомбинантного человеческого PLGF.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Сыворотка/Плазма/Моча - Образцы от здоровых добровольцев оценивали на присутствие PIGF в данном анализе. Истории болезни не были доступны для доноров, используемых в данном исследовании. См. ссылки 41, 42, и 45 для получения информации об уровнях PLGF во время беременности.

Тип образца	Среднее обнаруживаемого (пг/мл)	% Обнаруживаемых значений	Диапазон (пг/мл)
Сыворотка (n=95)	18	35	ND-26
ЭДТА плазма (n=35)	19	26	ND-24
Цитратная плазма (n=35)	16	6	ND-17
Гепариновая плазма (n=35)	22	6	ND-26
Моча (n=18)	34	39	ND-54

ND - не обнаружено

Супернатанты клеточных культур – Клетки периферической крови человека (1×10^6 клеток/мл) растили в среде RPMI, дополненной 10% FCS, 50 мкМ β -меркаптоэтанолом, 2 мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицин сульфата. Клетки стимулировали в течение 1 и 5 дней с 10 мкг/мл РНА. Аликвоты культуральной надосадочной жидкости удаляли в дни 1 и 5 и анализировали на уровни естественной PIGF. Все образцы имели значения меньше наименьшего стандарта PIGF, 15.6 пг/мл.

Клетки JAR человеческой хориокарциномной плаценты выращивали в DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки в течение 4 дней. Измеренная величина была 4320 пг/мл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Данный метод распознаёт рекомбинантную и нативную формы человеческого PIGF. Факторы, перечисленные ниже, были приготовлены в концентрации 50 нг/мл в буферах для разведения стандарта и были проанализированы на перекрестную реактивность. Приготовленные нижеперечисленные факторы в концентрации 50 нг/мл в среднем диапазоне контролей были проанализированы на интерференцию. Не обнаружено значительной перекрестной реактивности, за исключением PLGF-подобных белков, как указано. Интерференция не была обнаружена ни для одного из протестированных веществ.

Рекомбинантные, человека:

ANG	IL-1 β	MCP-1
AR	IL-1 ra	MIP-1 α
CNTF	IL-1 sRI	MIP-1 β
β -ECGF	IL-1 sRII	β -NGF
EGF	IL-2	OSM
Epo	IL-2 sR α	PD-ECGF
FGF acidic	IL-3	PDGF-AA
FGF basic	IL-3 sR α	PDGF-AB
FGF-4	IL-4	PDGF-BB
FGF-5	IL-4 sR	PTN
FGF-6	IL-5	RANTES
FGF-7	IL-5 sR β	SCF
G-CSF	IL-6	SLPI
GM-CSF	IL-6 sR	TGF- α
sgp130	IL-7	TGF- β 1
GRO α	IL-8	TGF- β 3
GRO β	IL-9	TGF- β sRII
GRO γ	IL-10	TNF- α
HB-EGF	IL-11	TNF- β
HGF	IL-12	sTNF RI
IFN- γ	IL-13	sTNF RII
IGF-I	LAP (TGF- β 1)	VEGF
IGF-II	LIF	
IL-1 α	M-CSF	

Рекомбинантные, мышинные:

GM-CSF
IL-1 α
IL-1 β
IL-3
IL-4
IL-5
IL-5 sR α
IL-6
IL-7
IL-9
IL-10
IL-13
LIF
MIP-1 α
MIP-1 β
SCF
TNF- α

Другие рекомбинанты:

amphibian TGF- β 5
chicken TGF- β 3

Натуральные протеины:

bovine FGF acidic
bovine FGF basic
human PDGF
porcine PDGF
human TGF- β 1
porcine TGF- β 1
porcine TGF- β 2

Рекомбинантный человеческий PIGF/VEGF гетеродимер перекрестно реагирует 5% в данном анализе.

Рекомбинантный человеческий PIGF-2 перекрестно реагирует 50% в данном анализе.

Рекомбинантный человеческий VEGF R1/Flt-1/Fc Химера найден интерферирующим в концентрациях более 2000 пг/мл.



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
www.diameb.com