

# НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-12

## КНС0121, IL-12

Каталог. № : КНС0121  
Количество : 96  
Производитель: Invitrogen, (США)

Методика от 05-19-2010  
Версия В9



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

**Для исследовательских целей. Не для использования в диагностических целях**

### СФЕРА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

ELISA-набор IL-12 р40/р70 предназначен для количественного определения in vitro человеческого IL-12 в человеческой сыворотке, плазме, в культуре клеток супернатанта и буферном растворе. Этот набор использует и натуральный и рекомбинантный гетеродимер hIL-12, как и свободную р40 субъединицу.

### ПРИНЦИП ТЕСТА

Данный набор является твердо фазовым иммуно-ферментным анализом. Моноклональное антитело, специфическое к IL-12 привито к ячейкам микропланшетных стрипов. Образцы, включая стандарты с известным количеством IL-12, контроли и неизвестные, пипетируются в эти ячейки следом за добавлением второго биотинального моноклонального антитела.

Во время этой первой инкубации, IL-12 антиген связывается с иммобилизованным (захваченным) антителом с одной стороны и биотинальным антителом в фазе раствора с второй стороны.

После удаления остатка второго антитела, добавляется стрептавидин-пероксидаза (энзим). Происходит связывание биотинального антитела до полного четырех-складового сэндвича. После второй инкубации и промывания для удаления несвязанного энзима, добавляется раствор субстрата, который реагирует с связанным энзимом для продуцирования цвета. Интенсивность этого цвета прямо пропорциональна концентрации IL-12 в образце.

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

Хранить все реагенты при 2-8°C.

Реагент	96 тестовый набор
IL-12+р40 Стандарт, очищенный рекомбинант IL-12 выраженный в E.coli. Следуйте этикетке флакона для количества и объема разбавления	2 флакона
Буфер для разбавления стандарта, содержит 8 мМ азид натрия; 25 мл в бутылке	1 бут.
IL-12 ячейки, покрытые антителом, 96 ячеек в планшете	1 планшет
Биотиновый конъюгат IL-12 (биотин-меченный анти- IL-12+р40). Содержит 8 мМ азида натрия, 11 мл в бутылке.	1 бут.
Стрептавидин-пероксидаза (HRP), концентрат (100x); содержит 0,3мМ тимол; 0,125 мл во флаконе	1 фл.
Разбавитель стрептавидин-пероксидазы. Содержит 3 мМ тимол и 0,05% проклин; 25 мл в бут.	1 бут.
Концентрат моющего раствора (25x), 100 мл/бут.	1 бут.
Стабилизирующий хромоген (ТМВ), 25 мл/бут.	1 бут.
Стоп раствор, 25 мл/бут	1 бут
Накрыватель планшета	3

**Примечание:** Этот набор содержит материалы с небольшим количеством азида натрия. Азид натрия реагирует с медью и свинцом, формируя азид металла, что является взрывоопасным. При удалении, промойте большим количеством воды для предотвращения аккумуляции натрия. Не употребляйте во внутрь и избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми. При контакте промойте большим количеством воды. Следуйте федеральному, государственному и местному урегулированию для удаления.

### НЕПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

1. Микропланшетный ридер для измерения при или около 450 нм.
2. Калиброванные точные пипетки, предпочтительно со сменными наконечниками (многократные многоканальные пипетки желательны для большого анализа)..
3. Калиброванная 8 канальная пипетка
4. Деионизированная или дистиллированная вода.
5. Промыватель планшета: автоматический или ручной (сдавливающая бутылка, разнородный диспенсер и т.п.)
6. Бумага для построения графиков: линейная, логарифмическая, полулогарифмическая, по желанию.
7. Стеклянные или пластиковые пробирки для разбавления стандартов и приготовления аликвот.
8. Абсорбирующее бумажное полотенце.
9. Калиброванные мензурки и градуированные цилиндры разных размеров.

### ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ / КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Если набор не используется, храните в холодильнике. Все реагенты необходимо нагреть до комнатной температуры перед использованием.
2. Микропланшет необходимо привести к комнатной температуре перед вскрытием пакета. После того как необходимое количество стрипов взято, немедленно закройте пакет и храните при 2-8°C для сохранения планшета в целостности.
3. Образцы необходимо собрать в пробирки без пирогена/эндотоксина.
4. По возможности используйте свежие образцы. Если необходимо хранение, образцы следует распределить в аликвоты и хранить при -20°C. Перед анализом растопите образцы и тщательно перемешайте. Избегайте повторных циклов замораживания / оттаивания.
5. По возможности избегайте сильно гемолизированной или липемической сыворотки. Если присутствует большое количество частиц, центрифугируйте или профильтруйте перед началом анализа.
6. Рекомендуется, что б стандарты, контроли и образцы анализировались в дубликате.
7. Образцы, которые больше 500 пг/мл должны быть разбавлены рабочим буфером.
8. При пипетировании соблюдайте соответствующий порядок добавления от ячейки до ячейки. Это даст возможность достигнуть одинакового времени инкубирования для всех ячеек.
9. Накрывайте реагенты, если не используете их.
10. Не смешивайте и не меняйте реагенты разных лотов.
11. Не используйте реагенты после окончания срока пригодности.
12. Считайте абсорбцию в течении 2 часов после проведения анализа.
13. Внутренний контроль должен проводиться при каждом анализе. Если контрольные значения не попадают в предварительно установленные границы, точность анализа будет под подозрением.
14. Остатки воды необходимо удалить с ячеек аспирацией или декантацией, постукивая планшет на абсорбирующую бумагу. Никогда не прикасайтесь абсорбирующей бумагой ячеек. Не давайте возможность высохнуть ячейкам.
15. Поскольку реагент субстрата является чувствительным, избегайте длительного попадания света. Также избегайте контакта реагента с металлом.

### БЕЗОПАСНОСТЬ

Обращайтесь со всеми компонентами крови или биологическими материалами как с потенциально инфицированными. Придерживайтесь установленных правил работы при обращении с потенциально инфицированными материалами.

### УКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРОМЫВАНИЯ

Не полное промывание влияет на результаты анализа. При промывании используйте мощный раствор. Мощный раствор необходимо использовать при комнатной температуре.

Промывание может проводиться вручную: полностью аспирируйте жидкость с ячеек аккуратным опусканием аспирационного наконечника (аспирационное устройство) на дно каждой ячейки. Следите, что б не чиркнуть внутренние стороны ячейки.

После аспирации, наполните ячейки по крайней мере 0,4 мл разбавленного моющего раствора. Дайте возможность впитаться 15-30 секунд, потом аспирируйте жидкость. Повторите, как указано в пункте ПРОЦЕДУРА РАБОТЫ. После промывания, удалите остатки жидкости переворачиванием планшета на абсорбирующую бумагу и постукиванием. Важно, что б ячейки не высохли.

Альтернативно, разбавленный мощный раствор можно набрать в сдавливающую бутылку. При использовании сдавливающей бутылки, наполните планшет моющим раствором, полностью наполняя ячейки. После промывания, удалите остатки жидкости

переворачиванием планшета на абсорбирующую бумагу и постукиванием. Важно, что б ячейки не высохли. При использовании автоматического промывания, следуйте руководству данного устройства.

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

### А. Реконституция и разбавление IL-12 стандарта

Этот анализ калиброван согласно международному приготовлению стандартов для IL-12 (NIBS). Одна пикограмма стандарта равна 22 мЕд NIBS (95/544).

Могут использоваться и пластиковые, и стеклянные пробирки для разбавления стандартов.

- Разбавьте стандарт до 5000 пг/мл буфером для разбавления стандарта. Следуйте этикетке на флаконе стандарта. Вращайте или смешайте легко и дайте возможность выстояться 10 минут для полного разбавления. Используйте стандарт в течении 1 часа после разбавления.
- Добавьте 0,100 мл разбавленного стандарта в пробирку, содержащую 0,900 мл буфера для разбавления стандарта. Пометьте как 500 пг/мл IL-12. Смешайте.
- Добавьте 0,200 мл буфера для разбавления стандарта в каждую из 6 пробирок, меченных как 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 и 7,8 пг/мл IL-12.
- Сделайте последовательные разбавления стандарта как описано в следующей таблице. Тщательно перемешивайте между шагами.

### В. Разбавление IL-12 стандарта

Стандарт, пг/мл	Добавить, мл	В, мл
500	Приготовьте, как описано в шаге 2	
250	0,200 станд. 500 пг/мл	0,200 буфера для разбавления
125	0,200 стан. 250 пг/мл	0,200 буфера для разбавления
62,5	0,200 стан. 125 пг/мл	0,200 буфера для разбавления
31,2	0,200 станд. 62,5 пг/мл	0,200 буфера для разбавления
15,6	0,200 стан. 31,2 пг/мл	0,200 буфера для разбавления
7,8	0,200 станд. 15,6 пг/мл	0,200 буфера для разбавления
0	0,200 буфера для разбавления	В пустую пробирку

Уничтожьте все оставшиеся реконституированные и разбавленные стандарты после завершения анализа. Поместите буфер для разбавления стандарта обратно в холодильник.

### С. Хранение и окончательное разбавление HRP конъюгата

1. Разбавьте 10 мкл 100х концентрированного раствора 1 мл разбавителя стрептавидин-HRP для каждого 8-ячейкового стрипа, что используется в анализе. Пометьте как стрептавидин-HRP рабочий раствор.

Например:

Кол-во 8-ячейковых стрипов	Объем стрептавидин-HRP концентрата	Объем разбавителя, мл
2	20 мкл раствора	2
4	40 мкл раствора	4
6	60 мкл раствора	6
8	80 мкл раствора	8
10	100 мкл раствора	10
12	120 мкл раствора	12

2. Поместите неиспользованный стрептавидин-HRP концентрат в холодильник.

### D. Моющий раствор

Приведите 25х концентрат к комнатной температуре и смешайте, что бы все частицы соли растворились. Разбавьте 1 объем 25х концентрата моющего буфера с 24 объемами деионизированной воды (напр. 50 мл могут быть разбавлены до 1,25 л, 100 мл могут быть разбавлены до 2,5 л). Пометьте как рабочий моющий буфер. Храните и концентрат и рабочий моющий буфер в холодильнике. Разбавленный буфер следует использовать в течении 14 дней.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА И ВЫЧИСЛЕНИЕ

Прочитайте пункты *Процедурные замечания / контроль качества перед проведением анализа.*

Приведите реагенты к комнатной температуре перед использованием. Аккуратно перемешайте все жидкие реагенты перед использованием.

Примечание: Стандартная кривая должна использоваться при каждом анализе.

1. Определите необходимое количество 8-ячейковых стрипов, необходимых для анализа. Поместите их в держатель. (Остальные стрипы поместите в пакет и храните в холодильнике.)
  2. Добавьте 50 мкл буфера для разбавления стандарта в нулевую ячейку. Ячейки, зарезервированные для бланка хромогена, необходимо оставить пустыми.
  3. Добавьте 50 мкл стандартов, образцов или контролей в соответствующие ячейки.
  4. Пипетируйте 100 мкл биотинального анти-IL-12 (биотин конъюгат) раствора в каждую ячейку, кроме бланка хромогена. Легко постучите по сторонам планшета для смешивания.
  5. Накройте планшет накрывателем и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре.
  6. Тщательно аспирируйте или декантируйте раствор из ячеек. Промойте ячейки 4 раза.
  7. Добавьте 100 мкл стрептавидин-HRP рабочего раствора в каждую ячейку, кроме бланка хромогена.
  8. Накройте планшет накрывателем и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
  9. Тщательно аспирируйте или декантируйте раствор из ячеек. Промойте ячейки 4 раза.
  10. Добавьте 100 мкл стабилизирующего хромогена в каждую ячейку. Жидкость в ячейках начнет окрашиваться в голубой цвет
  11. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре в темноте.
- Примечание: не накрывайте планшет алюминиевой фольгой или металлической пластинкой. Инкубационное время для субстрата хромогена часто определяется использованным микропланшетным ридером. Много планшетных ридеров имеют способность записывать максимальную оптическую плотность 2,0. Определяется значение ОП и субстратная реакция останавливается перед тем, как ОП положительных ячеек превысит лимит прибора. Значения ОП при 450 нм могут быть считаны после добавления стоп раствора. При использовании ридера, что записывает до 2,0ОП, остановите анализ после 20-25 минут.
12. Добавьте 100 мкл стоп раствора в каждую ячейку. Легко постучите по стенкам планшета. Раствор должен изменить цвет из голубого на желтый.
  13. Считайте абсорбцию при 450 нм каждой ячейки, ридером, блинкированным против бланка хромогена, вместе с 100 мкл стабилизирующего хромогенного и стоп раствора. Считайте планшет в течении 2 часов после добавления стоп раствора.
  14. Отметьте абсорбцию стандартов против концентрации стандартов на графической бумаге. (Оптимально поглощение в фоне должен отниматься от всех данных точек, включая стандарты, неизвестные и контроли до откладывания их на кривой). Проведите плавную прямую через эти точки и постройте стандартную кривую. При использовании обеспечения, оптимальной является четырех параметровый логарифм.
  15. Считайте концентрацию IL-12 неизвестных образцов и контролей со стандартной кривой, построенной в шаге 14. Образцы, вырабатываемые сигнал выше, чем наивысший стандарт (500 пг/мл) следует разбавить рабочим разбавителем и повторить анализ, умножая найденную концентрацию на соответствующий фактор разбавления.

### ТИПИЧНЫЕ ДАННЫЕ

Следующие данные могут быть получены для разных стандартов в диапазоне 0-500 пг/мл IL-12.

Стандарт IL-12(пг/мл)	ОП (450 нм)
0	0,054 0,059
7,8	0,126 0,127
15,6	0,203 0,191
31,2	0,345 0,323
62,5	0,611 0,600
125	1,210 1,081
250	2,042 2,062
500	3,528 3,465

## ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Не экстраполируйте стандартную кривую выше точки стандарта 500 пг/мл; соответствующая доза в этой области не линейная и тяжело получить точность. Разбавьте образцы >500 пг/мл рабочим разбавителем, повторите анализ и умножьте на соответствующий фактор разбавления.

Влияние различных лекарств, сыворотки, отклонившейся от нормы (гемолизированной, желтушной и т.п.), и использование других биологических жидкостей не исследовано. Степень понижения IL-12 +p40 в разных матриксах не исследовано. Литература по иммунодиагностике часто содержит посылание на отклонившиеся от нормы сигналы для некоторых сывороток, приписываемое гетерофильным антителам. Поскольку, эти образцы не относятся к данным, возможность этого не исключается.

Данный набор только для исследовательских целей.

Не для терапевтических или диагностических целей.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

### Чувствительность

Минимальный определяемый уровень IL-12+p40 < 2,0 пг/мл. Это было определено добавлением двух стандартных отклонений к значению ОП, полученной при анализе нулевого стандарта 24 раза.

### Воспроизводимость

#### 1. Внутри тестовая

внутри тестовая воспроизводимость была определена измерением концентрации IL-12+p40 в сыворотке 16 раз.

	Сыворотка 1	Сыворотка 2	Сыворотка 3
Среднее(пг/мл)	79,7	189,0	384,1
СО	3,1	7,3	7,1
КВ (%)	3,9	3,9	1,8

#### 2. Между тестовая

Между тестовая воспроизводимость была определена в 40 разных анализах.

	Сыворотка 1	Сыворотка 2	Сыворотка 3
Среднее(пг/мл)	79,3	187,6	370,2
СО	3,1	5,5	14,8
КВ (%)	3,9	2,9	4,0

### Линейность разбавления

Среда культуры, содержащая 412 пг/мл измеренной IL-12+p40 была последовательно разбавлена буфером для разбавления стандарта. Линейная регрессия анализа образцов против ожидаемой концентрации дала коэффициент корреляции 0,99.

Разбавление	Культура клеток		
	Измеренная (пг/мл)	Ожидаемая (пг/мл)	%, ожидаемой
Чистый	412	-	-
1/2	191,7	206	93,1
1/4	95	103	92,2
1/8	52,6	51,5	102,1
1/16	25,3	25,7	98,4
1/32	12,4	12,8	96,9

### Восстановление

Восстановление IL-12+p40 добавленный к человеческой сыворотке EDTA плазме и гепаризированной плазме равно 97%, 94% и 90% соответственно. Восстановление IL-12 + p40 добавленного к среде культуры тканей, содержащий 1% и 10% эмбриональной сыворотки равно 105% и 116% соответственно.

### Ожидаемые значения

Каждая лаборатория должна устанавливать собственные нормальные границы. Для примера, среднее 12 нормальных сывороток составило 74,9 пг/мл (СО=28,9), в диапазоне 404,4 – 150 пг/мл.

Среднее 12 нормальных образцов EDTA плазмы составило 67,8 пг/мл (СО=27,5) в диапазоне 37,4 – 140,9 пг/мл.

Среднее 12 нормальных образцов гепаризированной плазмы составило 55,8 пг/мл (СО=26,9) в диапазоне 31,8-131 пг/мл.

### Параллелизм

Натуральный IL-12+p40 был последовательно разбавлен буфером для разбавления стандарта. ОП каждого разбавления откладывалась на стандартной кривой. Параллелизм между натуральным и рекомбинантом протеина показан на рис. (см. оригинал инструкции), и указывает, что стандарт в точности отображает натуральный IL-12, содержащийся в образце.

## Специфичность

Буферные растворы наборов веществ были проанализированы с данным набором. Следующие вещества были проанализированы и не было перекрестной реактивности со следующими веществами: IL-1a, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-7, IL-8, IFN-a, IL-1b, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-15, GM-CSF, OSM, MIP-1a< MIP-1b, LIF, MCP-1, G-CSF, GRO, IP-10, TNF-a, TNF-b, MCP-3, RANTES, NAP-2, SCF, PDGF



## 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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

