



ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО TGF-β1

Кат. № : BMS249 /4 BMS249/4TEN
Количество тестов : 96, 10 x 96
Производитель : Bender MedSystems GmbH, (Австрия)

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

Методика от 27-07-2012
Версия 20

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для количественного определения уровня человеческого трансформирующего фактора роста бета-1 (TGF-β1). Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.

2. ВВЕДЕНИЕ

(См. оригинал инструкции).

Список литературы доступен на интернет-странице производителя:
www.bendermedsystems.com

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

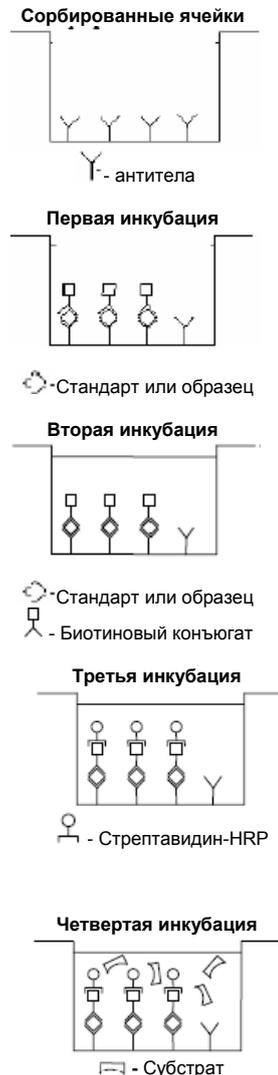
Антитела к человеческому TGF-β1 адсорбированы в лунках микропланшета.

Человеческие TGF-β1, присутствующие в образце или стандартах, связываются с антителами, адсорбированными в лунках.

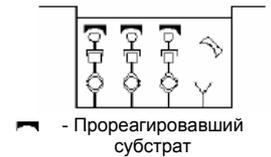
Антитела к античеловеческому TGF-β1, конъюгированные с биотином, добавляются и связываются с человеческим TGF-β1, захваченным первыми антителами.

После инкубации при промывке из лунок удаляются не связавшиеся антитела к античеловеческому TGF-β1, конъюгированные с биотином. Добавляется Стрептавидин-HRP, который связывается с антителами к античеловеческому TGF-β1, конъюгированными с биотином.

После инкубации не связавшийся Стрептавидин-HRP удаляется при промывке и добавляется субстратный раствор, реактивный с HRP.



Формируется окрашенное вещество в пропорции к количеству человеческого TGF-β1, присутствующего в образце или стандарте. Реакция останавливается добавлением кислоты. Измеряется плотность при длине волны 450 нм. Концентрация человеческого TGF-β1 в образцах определяется по калибровочной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта человеческого TGF-β1.



4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты в наборе Человеческий TGF-β1 ELISA BMS249/4 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому TGF-β1	1 планшет
Биотиновый конъюгат античеловеческого поликлонального антитела к TGF-β1 (120 мкл)	1 флакон
Стрептавидин-HRP (150 мкл)	1 флакон
Стандарт TGF-β1, 4 нг/мл, лиофилизированный	2 флакона
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
1 N HCl (3 мл)	1 флакон
1 N NaOH (3 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
Плёнки для заклеивания стрипов	6

4.2 Реагенты в наборе Человеческий TGF-β1 ELISA BMS249/4TEN (10x96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому TGF-β1	10 планшетов
Биотиновый конъюгат античеловеческого поликлонального антитела к TGF-β1 (120 мкл)	10 флаконов
Стрептавидин-HRP (150 мкл)	10 флаконов
Стандарт TGF-β1, 4 нг/мл, лиофилизированный	10 флаконов
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10% BSA), 5 мл	5 флаконов
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	7 флаконов
1 N HCl (3 мл)	6 флаконов
1 N NaOH (3 мл)	6 флаконов
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
Плёнки для заклеивания стрипов	30

5. ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ – НАБОР ИФА

Храните компоненты набора при температуре 2-8°C. Сразу после использования верните реагенты в холодильник. Храните до даты, указанной на упаковке реагентов.

Стабильность набора компонентов может быть гарантирована только при надлежащем хранении, и, в случае повторного использования одного компонента, если этот компонент не был загрязнен при первом использовании.

6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Супернатант культуры клеток*, сыворотка и плазма (EDTA, цитратная, гепариновая) были протестированы с помощью этого анализа. Другие биологические образцы могут быть пригодны для использования в анализе. Отделить сыворотку или плазму от сгустка или клеток, как можно скорее после свертывания и разделения. Образцы, содержащие видимый осадок, необходимо очистить перед использованием в анализе. Не используйте сильно гемолизированные или липемические образцы.

Образцы должны быть аликвотированы и должны храниться в замороженном виде при -20 °C, чтобы избежать потери биологически активного человеческого TGF-β1. Если образцы будут тестироваться в течение 24 часов, они могут храниться при

температуре от 2 до 8 °С (стабильность образца указана в разделе 13.5).

Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания. Перед анализом замороженные образцы должны быть доведены до комнатной температуры медленно и осторожно перемешаны.

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
- Статистический калькулятор с программным обеспечением 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 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 (1 х)

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 х) 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 х)

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 х) 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.

Разбавьте Концентрат Биотинового Конъюгата Рабочим буфером в соотношении 1:100 в чистой пластиковой посуде.

Биотиновый конъюгат может быть приготовлен в необходимом количестве согласно приведенной ниже таблице.

Кол-во стрипов	Биотиновый конъюгат (мл)	Рабочий буфер(1х) (мл)
1-6	0.06	5.94
1-12	0.12	11.88

9.4 Стрептавидин-HRP

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

Провести разбавление 1:100 с рабочим буфером (1 х) как указано в таблице:

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

9.5 Стандарт человеческого TGF-β1

Растворите лиофилизированный стандарт Рабочим буфером (точный объем стандартного раствора, который должен получиться в результате растворения, указан на этикетке флакона). Оставить Стандарт на 10-30 минут. Аккуратно перемешайте (концентрация стандарта = 4 нг/мл).

После использования оставшийся стандарт не может быть оставлен на хранение и должен быть уничтожен.

Разбавленные Стандарты могут быть приготовлены прямо на планшете (См. пункт 10d) или в пробирках (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:

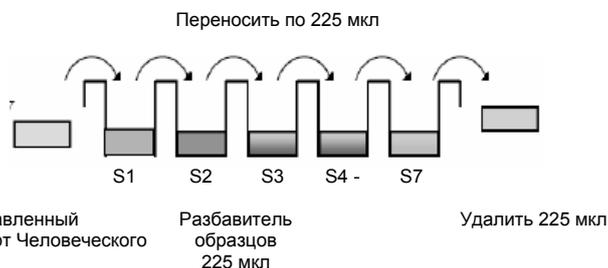
Пипетировать 225 мкл Разбавителя Образцов в каждую пробирку.

Пипетировать 225 мкл восстановленного стандарта (концентрация стандарта = 4 нг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1 = 2 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.



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
12 мл Рабочего буфера (1 x)	120 мкл Зеленого красителя

3. Стрептавидин-HRP: перед разбавлением концентрата конъюгата стрептавида 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.

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

10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

a. Все реагенты и образцы перед началом анализа должны быть выдержаны при комнатной температуре (~25° С). Разведите образцы сыворотки, плазмы, супернатанта культуры 1:10 Рабочим буфером согласно следующей схеме разведения:

20 мкл образца +180 мкл Рабочего буфера

Добавьте 20 мкл 1N HCl к 200 мкл разведенных образцов, перемешайте и оставьте инкубироваться в течение 1 часа при комнатной температуре.

Нейтрализуйте добавлением 20 мкл 1N NaOH.

b. Достаньте требуемое для проведения анализа число 8-луночных стрипов. Поместите требуемое количество стрипов в держатель (к необходимому числу лунок для Образцов добавьте лунки для Бланка и Стандартов). Все Стандарты, Бланк и Образцы необходимо анализировать в дублях. Неиспользованные стрипы сразу уберите в пакет с осушителем, запечатайте пакет и храните его при 2-8°С.

c. Промойте лунки 2 раза, используя по 400 мкл **буфера для промывок**, на одну лунку на один цикл промывки, полностью удаляя жидкость между промывками. Оставьте буфер в лунках на **10 – 15 секунд** перед удалением («замачивание»). Избегайте царапин на поверхности лунок. После окончания промывки переверните микропланшет и постучите им по чистой фильтровальной бумаге. Используйте стрипы немедленно после окончания промывки или не позднее чем через 15 минут при условии, что стрипы уложены на фильтровальную бумагу в перевёрнутом виде. **Не позволяйте лункам высохнуть!**

d. **Приготовление разведений стандарта в лунках микропланшета** (альтернативно разведения стандарта могут быть приготовлены в пробирках – см. 9.5.1):

Внесите по 100 мкл рабочего буфера во все лунки, предназначенные для стандартов. Внесите 100 мкл приготовленного стандарта (см. раздел «Приготовление реагентов», п. 9.5, концентрация = 4000 пг/мл), в дублях, в лунки A1 и A2 (см. Таблицу 1). Перемешайте содержимое лунок A1 и A2 повторным пипетированием (концентрация стандарта 1, S1 = 2000 пг/мл), и перенесите по 100 мкл раствора из лунок A1 и A2 в лунки B1 и B2, соответственно (см. рис. 8). Во время этих манипуляций постарайтесь не поцарапать внутреннюю поверхность лунок. Повторите перенос и разведение стандартов еще 5 раз, получив в итоге 2 ряда разведений Стандарта человеческого TGF-β1 в диапазоне 2000 - 31 пг/мл. Удалите по 100 мкл жидкости из последних использованных лунок (G1, G2).

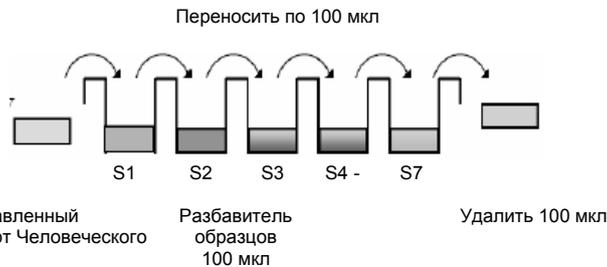


Рисунок 8. Приготовление серийных разведений Стандарта TGF-β1

Если разведение стандарта было выполнено в пробирках (см.п.9.5.1), внесите по 100 мкл разведений из пробирок S1 – S7 в лунки микропланшета, предназначенные для стандартов, согласно таблице 1.

Таблица 1: Пример расположения образцов, бланка и стандартов на планшете

	1	2	3	4
A	Ст #1 (2000 пг/мл)	Ст #1 (2000 пг/мл)	O 1	O 1
B	Ст #2 (1000 пг/мл)	Ст #2 (1000 пг/мл)	O 2	O 2
C	Ст #3 (500 пг/мл)	Ст #3 (500 пг/мл)	O 3	O 3
D	Ст #4 (250 пг/мл)	Ст #4 (250 пг/мл)	O 4	O 4
E	Ст #5 (125 пг/мл)	Ст #5 (125 пг/мл)	O 5	O 5
F	Ст #6 (63 пг/мл)	Ст #6 (63 пг/мл)	O 6	O 6
G	Ст #7 (31 пг/мл)	Ст #7 (31 пг/мл)	O 7	O 7
H	Бланк	Бланк	O 8	O 8

Ст – Стандарт, O – образец

- Внесите по 100 мкл **буфера для разведения образцов** в лунки «Бланк», в дублях.
- Внесите по 60 мкл **буфера для разведения образцов** в лунки, предназначенные для **образцов**.
- Добавьте по 40 мкл каждого подготовленного **образца** в дублях в лунки, предназначенные для **образцов**.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°С) на орбитальном шейкере, установленном на 400 об/мин. (**Шейкирование является обязательным для оптимальной работы теста**).
- Приготовьте **Биотиновый конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов» 9.3).
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием (сливом). Промойте лунки 5 раз как указано в шаге «с» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Добавьте по 100 мкл **Биотинового конъюгата** во все лунки.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°С) на орбитальном шейкере, установленном на 400 об/мин. (**Шейкирование является обязательным для оптимальной работы теста**).
- Приготовьте **Стрептавидин-HRP** (раздел «Приготовление реагентов» 9.4).
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием (сливом). Промойте лунки 5 раз как указано в шаге «с» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Добавьте по 100 мкл разведенного **Стрептавидин-HRP** во все лунки, включая лунки бланк.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°С) на орбитальном шейкере, установленном на 400 об/мин. (**Шейкирование является обязательным для оптимальной работы теста**).
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием (сливом). Промойте лунки 5 раз как указано в шаге «с» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Внесите по 100 мкл **ТМВ субстрата** во все лунки.
- Инкубируйте при комнатной температуре (18° - 25°С) в течение **приблизительно 30 минут**. Избегайте воздействия 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 останавливать реакцию добавлением стоп-раствора тогда, когда самый высокий стандарт окрасится в темно-голубой цвет. Альтернативно, развитие окрашивания можно наблюдать с помощью ИФА анализатора при длине волны 620 нм. Субстратная реакция должна быть остановлена, как только ОП S1 достигнет 0.9 – 0.95.

- t. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все лунки, чтобы полностью инактивировать фермент в лунках. Важно вносить стоп-реагент быстро и с той же скоростью, что и субстратный раствор. Оптическую плотность считайте 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.
- и. Определите оптическую плотность во всех лунках при 450 нм против «Бланка», желательно использовать длину волны сравнения 620 нм (допустима длина волны сравнения в диапазоне 610-650 нм). Бланкируйте микропланшетный ридер так, как это описано в инструкции производителя, с использованием лунок «бланк». Абсорбцию определяйте как в тестируемых образцах, так и в стандартах человеческого TGF-β1.

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 TGF-β1 на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации TGF-β1 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 TGF-β1 в соответствующей пробе.
- Для образцов, которые были разведены согласно данной инструкции в соотношении 1:30 перед исследованием, концентрация, полученная исходя из стандартной кривой, должна быть умножена на фактор разведения, (x30).
- Расчет концентрации в образцах, где О.П. превышает ОП Стандарта 1 может привести к неверным результатам, занижению уровня TGF-β1. Такие образцы должны быть предварительно разведены в соответствии с ожидаемыми значениями Разбавителем образцов и проанализированы еще раз для получения более точного значения **актуального уровня** TGF-β1.
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией TGF-β1. Если значения контроля не укладываются в ожидаемый диапазон, результаты анализа могут быть недостоверны.
- Пример стандартной кривой показан на Рисунке 9. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

Рисунок. Пример стандартной кривой для TGF-β1. TGF-β1 был разбавлен в серии двукратных последовательных шагов титрования Разбавителем образцов. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

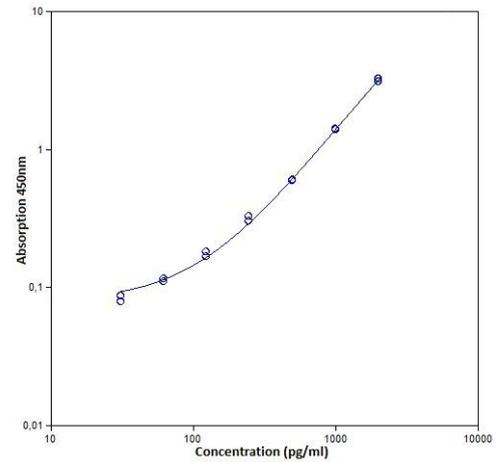


Таблица 2: Типичные результаты, полученные с использованием набора Human TGF-β1 ELISA:

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	TGF-β1, пг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	2000	3.227 3.068	3.148	2.5
2	1000	1.373 1.402	1.387	1.0
3	500	0.587 0.592	0.590	0.4
4	250	0.300 0.326	0.313	4.1
5	125	0.178 0.166	0.172	3.5
6	63	0.109 0.114	0.112	2.0
7	31	0.078 0.086	0.082	4.7
Бланк	0	0.052 0.050	0.051	2.0

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 МЕТОДА

- 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.
- Предпочтительно использование одноразовых наконечников, флаконов, многоразовая стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта и следы детергента должны быть полностью удалены перед использованием.
- Неполная промывка на любом этапе негативно влияет на точность результатов и может привести как к ложноположительным, так и к ложноотрицательным результатам. Полностью удаляйте Промывочный буфер из ячеек между циклами промывки. Наполняйте лунки буфером для промывок как это указано, для каждого цикла промывки. Не позволяйте ячейкам высохнуть или оставаться незакрытыми длительный период времени.
- Использование радиоиммунотерапии значительно увеличило число пациентов с человеческими антимышиными IgG (НАМА). НАМА могут влиять на результаты анализа, использующего мышиные моноклональные антитела, приводя к ложно положительным или ложно отрицательным результатам. Образцы сыворотки, содержащие антитела к мышным иммуноглобулинам, могут быть проанализированы в случае, когда мышиные иммуноглобулины (сыворотка, асцитная жидкость или моноклональные антитела другой специфичности) добавляются к буферу для разведения образцов.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

13.1. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИЗА

Предел чувствительности для Human TGF-β1 определялся как концентрация аналита, для которой О.П., получаемая в результате

анализа, значительно выше, чем О.П. среды, используемой для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения) и составляет 8.6 пг/мл.

13.2. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

13.2.1 Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась в 3 независимых сериях анализа. В каждый серии анализа было выполнено 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации человеческого TGF-β1. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения человеческого TGF-β1 и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 3.2%.

Таблица 3. Средние концентрации человеческого TGF-β1 и коэффициент вариации для каждого образца

Образец	Анализ	Среднее значение концентрации TGF-β1 (пг/мл)	Коэффициент вариации, (%)
1	1	38237.8	3.6
	2	39660.8	2.6
	3	39216.3	0.8
2	1	20394.0	1.4
	2	21289.3	3.0
	3	21513.2	2.5
3	1	22408.0	2.1
	2	23957.9	3.4
	3	24232.4	1.8
4	1	18901.8	1.7
	2	19649.6	3.0
	3	21305.9	8.3
5	1	4428.0	2.9
	2	4723.3	2.8
	3	4670.0	7.1
6	1	4764.2	3.2
	2	5063.1	2.5
	3	4703.2	4.6
7	1	3357.8	2.2
	2	3887.2	3.2
	3	3212.4	5.5
8	1	4159.7	2.5
	2	4455.3	2.1
	3	3924.2	4.5

13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определялась в одной лаборатории в 3-х независимых сериях анализа. В каждой серии анализа было выполнено 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации человеческого TGF-β1. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения человеческого TGF-β1 и коэффициенты вариации для каждого образца. Коэффициент вариации был рассчитан из 18 определений каждого образца и составил в среднем 4.9%.

Таблица 4

Образец	Среднее значение концентрации TGF-β1 (пг/мл)	Коэффициент вариации, (%)
1	39038.3	1.9
2	21065.5	2.8
3	23532.8	4.2
4	19952.4	6.2
5	4607.1	3.4
6	4843.5	4.0
7	3485.8	10.2
8	4179.7	6.4

13.3. ИЗВЛЕЧЕНИЕ

Извлечение оценивали, тестируя пулированные образцы человеческой сыворотки, плазмы и супернатанта культуры клеток, обогащенные 3 различными уровнями человеческого TGF-β1. Извлечение определяли в 4 повторах каждого образца. Количество эндогенного человеческого TGF-β1 в не обогащенных образцах вычитали из значений обогащения. См. таблицу 5.

Таблица 5

Образец	Высокое насыщение		Среднее насыщение		Низкое насыщение	
	Среднее, %	Диапазон, %	Среднее, %	Диапазон, %	Среднее, %	Диапазон, %
Сыворотка	85	83-87	97	96-99	96	92-101
Плазма (ЭДТК)	90	80-114	84	74-97	82	78-85
Плазма (Цитратная)	108	96-122	92	88-95	92	88-96
Плазма (гепариновая)	110	98-119	87	87-110	93	87-100
Супернатант						

культуры клеток	87	85-89	85	84-85	95	92-98
-----------------	----	-------	----	-------	----	-------

13.4 ЛИНЕЙНОСТЬ РАЗВЕДЕНИЯ

Образцы сыворотки, плазмы и супернатанта культуры клеток с разными уровнями человеческого TGF-β1 были проанализированы в серии двукратных разведений в 4 репликах каждая. Ниже в таблице (таблица 6) приведены результаты.

Таблица 6

Образец	Восстановление		
	Разведение	Среднее, %	Диапазон, %
Сыворотка	1:60	103	93-108
	1:120	112	81-128
	1:240	97	75-113
Плазма (ЭДТК)	1:60	119	114-128
	1:120	129	118-142
	1:240	138	127-150
Плазма (Цитратная)	1:60	108	102-113
	1:120	119	110-128
	1:240	130	112-139
Плазма (гепариновая)	1:60	121	112-134
	1:120	130	119-150
	1:240	126	120-131
Супернатант культуры клеток	1:60	95	--
	1:120	103	--
	1:240	118	--

13.5. СТАБИЛЬНОСТЬ ОБРАЗЦОВ

13.5.1 Стабильность при замораживании-оттаивании

Аликвоты сыворотки (обогащенные и не обогащенные) хранились при температуре -20°C и размораживались до 5 раз, после чего определялись уровни человеческого TGF-β1. Не наблюдалось значительной потери активности человеческого TGF-β1 после каждого цикла повторного замораживания-оттаивания.

13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты сыворотки (обогащенные и не обогащенные) хранились при температуре -20°C, 2-8°C, комнатной температуре и при 37°C в течение 24 часов, после чего определялись уровни человеческого TGF-β1. Не наблюдалась значительная потеря иммунореактивности человеческого TGF-β1 при хранении при вышеперечисленных условиях.

13.6 СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Анализ обнаруживает оба, естественный и рекомбинантный человеческий TGF-β1. Перекрестная реактивность TGF-β2 и TGF-β3, и TNF-β, IL-8, IL-6, IL-2, TNF-α, IL-1β, IL-4, IFN-γ, IL12p70, IL-5 и IL-10 была оценена путем добавления к образцам сывороток с известной концентрацией физиологически значимых количеств исследуемых факторов. Не была выявлена перекрестная реактивность.

13.7 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Панель образцов практически здоровых людей (мужчин и женщин) была протестирована на содержание человеческого TGF-β1. Полученные уровни человеческого TGF-β1 приведены в таблице 7.

Таблица 7

Образец	Кол-во образцов	Диапазон, %	Среднее, %	Стандартное отклонение, пг/мл
Сыворотка	16	5222-13731	6723	1978
Плазма (ЭДТК)	40	0-2644	729	389
Плазма (Цитратная)	40	908-3378	1726	578
Плазма (гепариновая)	40	0-377	46	96

15. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

15.1 Промывочный буфер (1 х)

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 х)

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

15.3 Биотиновый конъюгат

Количество стрипов	Биотиновый конъюгат, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,06	5,94
1-12	0,12	11,88

15. 4 Стрептавидин-HRP

Количество стрипов	Концентрат HRP-конъюгата, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,06	5.94
1-12	0,12	11.88

15.5 Стандарт человеческого TGF-β1

Развести лиофилизированный **человеческий TGF-β1** с дистиллированной водой. (Объёмы разведения указаны на этикетке флакона со стандартом).

16. ПРОТОКОЛ ТЕСТА (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

1. Подготовка: провести разведение 1:10 (20 мкл образца + 180 мкл Рабочего буфера), добавить 20 мкл 1N HCl к 200 мкл предварительно разведенного образца, перемешать и инкубировать 1 час при комнатной температуре, добавить 20 мкл 1N NaOH.
2. Определиться с необходимым количеством микролуночных полосок.
3. Промыть ячейки планшета дважды **Промывочным буфером**
4. Разбавление стандартов на планшете: Добавьте по 100 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для Стандартов (в дублях). Пипетировать 100 мкл приготовленного стандарта в первые лунки и приготовить разведенные стандарты перемещением 100 мкл из лунки в лунку. Удалить 100 мкл из последних лунок.
Альтернативное разведение стандарта в пробирках: пипетировать 100 мкл этих разведений стандарта в лунки.
5. Внесите по 100 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки «Бланк», в дублях.
6. Внесите по 60 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для образцов.
7. Добавьте 40 мкл **образцов** в дублях в ячейки, предназначенные для образцов.
8. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18 – 25°C).
9. Приготовьте **Биотиновый конъюгат**.
10. Удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 5 раз **Промывочным буфером**.
11. Добавьте 100 мкл Биотинового конъюгата во все лунки.
12. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18 – 25°C).
13. Приготовьте **Стрептавидин-HRP**.
14. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 5 раз **Промывочным буфером**.
15. Добавьте по **100 мкл** разбавленного **Стрептавидин-HRP** во все ячейки.
16. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18 – 25°C).
17. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 5 раз **Промывочным буфером**.
18. Внесите по 100 мкл **ТМВ субстрата** во все ячейки.
19. Инкубируйте при комнатной температуре **примерно 30 минут**.
20. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки.
21. Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм.

Замечание: Для образцов сыворотки и контрольных образцов, разведенных согласно инструкции 1:30 (20 мкл образца + 180 мкл буфера для разведения образцов + 20 мкл 1N HCl + 20 мкл 1 N NaOH и 40 мкл подготовленного образца + 60 мкл рабочего буфера), концентрацию, полученную из калибровочной кривой, необходимо умножить на соответствующий коэффициент разведения (x30).

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

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