



# ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОЙ ФОРМЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ВАСКУЛОЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА A (VEGF-A)

**Кат. №** : BMS277/2 / BMS277/2TEN  
**Количество тестов** : 96  
**Производитель** : Bender MedSystems GmbH, (Австрия)

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

Методика от 09-07-2012  
Версия 23

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

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данный набор предназначен для количественного определения активной формы человеческого васкулоэндотелиального фактора роста A (VEGF-A) в супернатанте клеточных культур, человеческой сыворотке, плазме и других биологических жидкостях.

**Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.**

## 2. ВВЕДЕНИЕ

Нормальное функционирование тканей зависит от регулярной доставки кислорода кровеносными сосудами. На понимании того, как формируются кровеносные сосуды, сфокусирована большая часть исследовательских усилий в последнее десятилетие.

Васкулогенез у эмбрионов – это процесс, в результате которого образуются *de novo* кровеносные сосуды из предшественников эндотелиальных клеток. Ангиогенез – это процесс образования новых кровеносных сосудов из уже существующей сосудистой системы. Он играет важную роль в развитии, нормальном росте ткани, заживлении ран, репродуктивном цикле у женщин (развитии плаценты, овуляции, желтого тела) и также играет основную роль в различных заболеваниях (1). Особый интерес сфокусирован на росте опухолей, так как опухоли не могут расти более, чем на несколько миллиметров по размеру без образования нового поставщика крови. Этот процесс, описанный как опухолевый ангиогенез, также является неотъемлемой частью при распространении опухолевых клеток и росте метастазов. Одной из ключевых молекул ангиогенеза и выживаемости эндотелия является васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF-A) (2). Это специфический митоген эндотелиальных клеток и строгий фактор проницаемости сосудов (VPF) (3). VEGF-A – это гепарин-связывающий гликопротеин, секретируемый в виде гомодимера с молекулярной массой 45 кДа множеством клеток различных типов. VEGF-A также является причиной вазодилатации через NO-синтетазный путь в эндотелиальных клетках и может активировать миграцию моноцитов. Было описано много различных вариантов сплайсинга VEGF-A, но преобладающим белком является VEGF165, и связывается своим гепарин-связывающим доменом с экстрацеллюлярным матриксом и с гепарин сульфатом. В течение последних нескольких лет были клонированы несколько других членов семейства VEGF, включая VEGF-B, -C- и -D. В отличие от сосудистого ангиогенеза, который в основном регулируется VEGF-A, лимфангиогенез большей частью регулируется VEGF-C и -D (4).

Транскрипция VEGF-A сильно активируется при гипоксии и различными онкогенами (5), такими как H-ras и некоторые трансмембранные тирозинкиназы, такие как рецептор эпидермального фактора роста и ErbB2 (6). Совместно эти два пути являются причиной значительно повышенной регуляции VEGF-A в опухоли по сравнению с нормальными тканями и часто имеет прогностическую значимость и актуальность (7,8). VEGF-A может определяться и в плазме и в сыворотке пациентов, но его уровень в сыворотке значительно выше (9). Чрезвычайно высокие уровни можно обнаружить в содержимом кист, образующихся в мозге у пациентов с опухолями головного мозга (10,11) или в асцитной жидкости пациентов. Тромбоциты высвобождают VEGF-A при агрегации и могут быть другим основным источником доставки VEGF-A к опухолям (12). Различные исследования показали, что ассоциация высокого уровня VEGF-A в сыворотке с плохим

прогнозом у пациентов со злокачественными опухолями может коррелировать повышенным содержанием тромбоцитов (13). Опухоли могут секретировать цитокины и факторы роста, которые стимулируют продукцию мегакариоцитов в костном мозге и повышают содержание тромбоцитов. Это, в свою очередь, может приводить к другому, непрямому усилению доставки VEGF-A к опухоли (14). Более того, VEGF-A вовлечен во множество других патологических процессов, ассоциированных с усилением ангиогенеза или увеличением проницаемости сосудов. Примерами, где VEGF-A играет важную роль, могут служить псориаз и ревматоидный артрит (15), а так же синдром гиперстимуляции яичников (16). Диабетическая ретинопатия так же ассоциирована с высокими внутриглазными уровнями VEGF-A, и ингибирование функции VEGF-A может привести к бесплодию из-за блокировки функции желтого тела (17). Важность VEGF-A для роста опухоли была наглядно продемонстрирована с помощью доминантных отрицательных VEGF рецепторов для блокировки пролиферации *in vivo* (18), а также блокирующих антител к VEGF или к одному из VEGF рецепторов (19). Вследствие этого интерференция с функцией VEGF-A стала основным интересом для разработки лекарственных препаратов для блокировки ангиогенеза и метастазирования. В настоящий момент более 110 фармацевтических компаний во всем мире вовлечены в разработку таких антагонистов. Их подходы включают антагонисты VEGF-A или его рецепторов, селективные ингибиторы тирозинкиназ, адресность лекарств и токсинов по отношению к VEGF рецепторам и генотерапию, регулирующую тем же путем гипоксии и контролирующую продукцию VEGF-A. Адресность передачи сигналов VEGF может иметь очень важное терапевтическое значение для многих заболеваний (20) и служить основой для разработки будущих (анти-)ангиогенных методов лечения.

## 3. ПРИНЦИП ТЕСТА

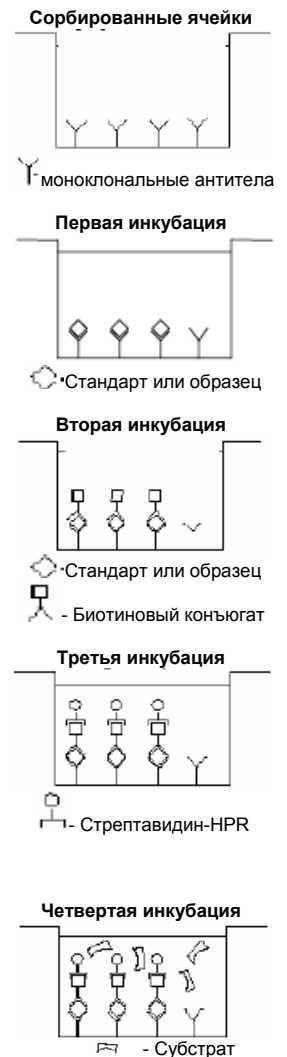
Античеловеческие VEGF-A антитела адсорбированы в ячейках планшета.

Активный VEGF-A, присутствующий в образцах или стандартах, связывается с рецептором, сорбированным в ячейках планшета.

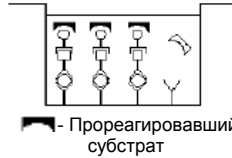
После инкубации при промывке из ячеек удаляется несвязавшийся биологический материал. Добавляемые биотинилированные анти-VEGF-A антитела связываются с VEGF-A, захваченным сорбированным первым антителом.

После инкубации и промывки из ячеек удаляется не связавшийся биотиновый конъюгат, и в ячейки добавляется конъюгат стрептавидин-пероксидаза, связывающий биотин, конъюгированный с анти- VEGF-A антителами.

После 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 VEGF-A, присутствующего в образцах.



Концентрация VEGF-A в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта.

#### 4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

##### 4.1 Реагенты в наборе Человеческий VEGF-A ELISA BMS277/2 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый поликлональными антителами к человеческому VEGF-A	1 планшет
Конъюгат поликлональных анти- VEGF-A антител и биотина, 120 мкл	1 флакон
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 150 мкл	1 флакон
Стандарт VEGF-A, лиофилизированный, 2 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 VEGF-A ELISA BMS277/2TEN (10x96 тестов)

Микропланшет, покрытый поликлональными антителами к человеческому VEGF-A	10 планшетов
Конъюгат поликлональных анти- VEGF-A антител и биотина, 120 мкл	10 флаконов
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 150 мкл	10 флаконов
Стандарт VEGF-A, лиофилизированный, 2 нг/мл до разведения	10 флаконов
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	10 флаконов
Разбавитель образцов, 12 мл	3 флакона
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл	8 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
Плётки 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 (2-8°C). Храните до даты, указанной на упаковке реагентов.

Только при соответствующем хранении и, если набор используется для нескольких постановок, исключения контаминации во время предыдущего использования, гарантируется качественная работа реагентов.

#### 6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Культура клеток супернатанта, 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 VEGF-A. Если образцы будут тестироваться в течение 24 часов, они могут храниться при

температуре от 2 до 8 °C (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  $\geq 620$  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 °C.
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 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 °C. 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.

Разбавьте Концентрат Биотинового Конъюгата Рабочим буфером (Реагент В) 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(1x) (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.

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

**9.5 Стандарт человеческого VEGF-A**

Растворите лиофилизированный Стандарт VEGF-A в дистиллированной воде. Необходимый объем для растворения указан на этикетке флакона, содержащего стандарт. Оставить на 10-30 минут. Осторожно перемешивайте до полного растворения. Конечная концентрация полученного раствора составит 2 нг/мл.

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

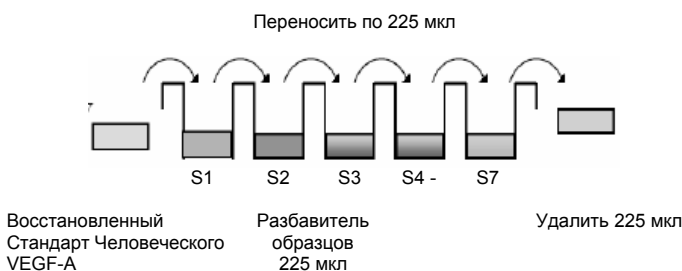
Затем подготовить серийные разведения 1:2 для стандартной кривой как указано ниже:

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

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

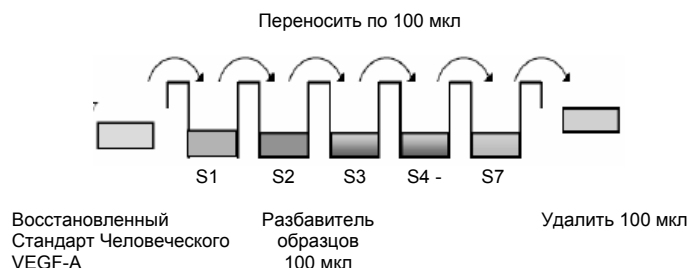
**10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА**

a. Все реагенты и образцы перед началом анализа должны быть выдержаны при комнатной температуре. 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°С.

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 перевернутом виде. **Не позволяйте ячейкам высохнуть!**

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 VEGF-A в диапазоне от 1000 до 15.6 пг/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
<b>A</b>	Ст #1 (1000.0 пг/мл)	Ст #1 (1000.0 пг/мл)	О 1	О 1
<b>B</b>	Ст #2 (500.0 пг/мл)	Ст #2 (500.0 пг/мл)	О 2	О 2
<b>C</b>	Ст #3 (250.0 пг/мл)	Ст #3 (250.0 пг/мл)	О 3	О 3
<b>D</b>	Ст #4 (125.0 пг/мл)	Ст #4 (125.0 пг/мл)	О 4	О 4
<b>E</b>	Ст #5 (62.5 пг/мл)	Ст #5 (62.5 пг/мл)	О 5	О 5
<b>F</b>	Ст #6 (31.3 пг/мл)	Ст #6 (31.3 пг/мл)	О 6	О 6
<b>G</b>	Ст #7 (15.6 пг/мл)	Ст #7 (15.6 пг/мл)	О 7	О 7
<b>H</b>	Бланк	Бланк	О 8	О 8

Ст – Стандарт, О – образец

- Внесите по 100 мкл **Разбавителя образцов** в дубликаты в ячейки «Бланк».
- Внесите по 50 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для образцов.
- Внесите по 50 мкл каждого **образца** в дубликаты в соответствующие ячейки.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- Приготовьте **биотиновый конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов»).
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 6 раз как указано в шаге «б.» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Добавьте по 100 мкл **биотинового конъюгата** во все ячейки.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- Приготовьте **стрептавидиновый конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов»).
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 6 раз как указано в шаге «б.» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Внесите по 100 мкл разбавленного стрептавидинового конъюгата во все ячейки, включая бланк.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 6 раз как указано в шаге «б.» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора** ТМБ во все ячейки.
- Инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течение **примерно 30 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.

- 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 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.

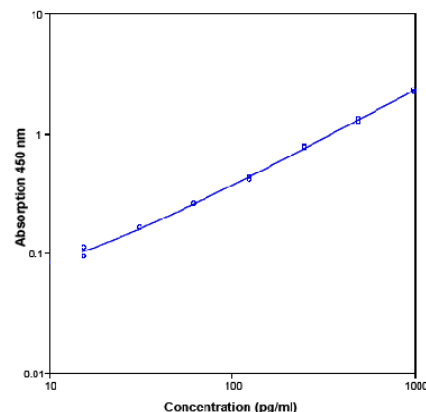
- Определите оптическую плотность всех ячеек при 450 нм против «Бланка», желательно использовать длину волны сравнения 620 нм (допустима длина волны сравнения в диапазоне 610-650 нм). Бланкируйте микропланшетный ридер согласно руководству производителя, используя ячейки «Бланк». Определите ОП как в ячейках, содержащих образцы, так и в ячейках, содержащих разведения стандарта VEGF-A.

## 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 VEGF-A на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации VEGF-A 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 VEGF-A в соответствующей пробе.
- В ходе анализа, согласно данной инструкции, образцы были разведены 1:2, следовательно концентрации, полученные из калибровочной кривой, должны быть умножены на коэффициент разведения (x2).**
- 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 VEGF-A.**
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией VEGF-A. 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 VEGF-A. VEGF-A 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	VEGF-A, пг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	1000.0	2.201 2.308	2.254	2.4
2	500.0	1.244 1.327	1.286	3.2
3	250.0	0.766	0.771	0.6

		0.775		
4	125.0	0.409 0.429	0.419	2.5
5	62.5	0.258 0.258	0.258	0.1
6	31.3	0.162 0.163	0.163	0.3
7	15.6	0.112 0.093	0.102	9.4
Бланк	0	0.066 0.073	0.069	4.9

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. Стеклопосуда 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.

## 13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 13.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация VEGF-A, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 7.9 пг/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 каждой серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 6 образцов сывороток, содержащих различные концентрации VEGF-A. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения VEGF-A и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 6.2 %.

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

Образец	Серия анализа	Концентрация VEGF-A, (пг/мл)	Коэффициент вариации, (%)
Значения см. оригинал инструкции.			

#### 13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определялась в одной лаборатории в 3-х независимых сериях анализа, различными лаборантами. В каждый серии анализа было выполнено 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации VEGF-A. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения VEGF-A и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации был рассчитан из 18 определений каждого образца и составил в среднем 4,3 %.

Образец	Концентрация, (пг/мл)	Коэффициент вариации, (%)
Значения см. оригинал инструкции		

## 13.3 Извлечение

Извлечение оценивали тестируя различные образцы человеческой сыворотки, обогащенные рекомбинантным VEGF-A человека. Извлечение определяли в трех независимых экспериментах в 4 образцах сывороток. Количество эндогенного VEGF-A в не обогащенной сыворотке вычитали из двух значений обогащения. Данные: см таблицу в оригинале инструкции.

## 13.4. Линейность

Образцы сыворотки, плазмы, супернатанта клеточной культуры с разными уровнями VEGF-A были проанализированы в сериях двукратных разведений в 4 репликах каждая.

Данные: см. таблицу в оригинале инструкции.

## 13.5 Стабильность образцов

### 13.5.1 Стабильность при замораживании-размораживании

Аликвоты сыворотки (обогащенные и не обогащенные) хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  и размораживались до 5 раз, после чего определялись уровни VEGF-A. Наблюдалась значимая потеря иммунореактивности VEGF-A. Таким образом, образцы надо хранить в аликвотах при  $-20^{\circ}\text{C}$  и размораживать только раз.

### 13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты сыворотки (обогащенные и не обогащенные) хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $2-8^{\circ}\text{C}$ , комнатной температуре и при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов, после чего определялись уровни VEGF-A. Наблюдалась значительная потеря иммунореактивности VEGF-A при хранении при комнатной температуре и при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ , поэтому следует избегать хранения при таких температурах при работе с образцами.

## 13.6 Специфичность

Набор определяет как натуральный, так и рекомбинантный VEGF-A. Перекрестная реактивность и влияние циркулирующих факторов иммунной системы была исследована добавлением этих протеинов в физиологических концентрациях в человеческую VEGF-A позитивную сыворотку. Не было замечено перекрестной реактивности с человеческими VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и PlGF. Интерференция обнаружена для VEGF-R1 при концентрациях  $> 200$  пг/мл но не для VEGF-R2.

## 13.7 Ожидаемые значения

Панель из 40 сывороток, EDTA, цитратной и гепаринизированной плазмы практически здоровых людей (мужчин и женщин) была протестирована на содержание VEGF-A. Измеряемые нормальные уровни могут варьировать в зависимости от используемого набора образцов.

## 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	0,06	5,94
1-12	0,12	11,88

### 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. Определите необходимое число стрипов
2. Промыть ячейки планшета дважды **Промывочным буфером**
3. Приготовьте стандартные разведения добавлением 100 мкл разбавленного **Стандарта VEGF-A** в ячейки A1 и A2, создайте разведения стандарта VEGF-A в диапазоне от 1000 до 15,6 пг/мл переносом по 100 мкл из ячейки в ячейку. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2). – или используйте альтернативное внешнее разведение и перенесите по 100 мкл стандарта в соответствующие лунки микропланшета
4. Внесите по 100 мкл **Буфера для разведения образцов** в ячейки «Бланк», в дублях
5. Внесите по 50 мкл **Буфера для разведения образцов** во все ячейки, предназначенные для образцов
6. Внесите по 50 мкл каждого **образца** в дублях в соответствующие ячейки.
7. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18 – 25°C) со встряхиванием
8. Приготовьте **Биотиновый конъюгат**.
9. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 6 раз **Буфером для промывок**.
10. Добавьте по 100 мкл готового **Биотинового конъюгата**, во все ячейки, включая Бланк.
11. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18 – 25°C) со встряхиванием
12. Приготовьте **Стрептавидин-HRP**
13. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 6 раз **Буфером для промывок**.
14. Внесите по 100 мкл разведенного **Стрептавидин-HRP** во все ячейки.
15. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18 – 25°C) со встряхиванием.
16. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 6 раз **Буфером для промывок**.
17. Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора** во все ячейки, включая Бланк.
18. Инкубируйте при комнатной температуре (18 – 25°C) примерно 30 минут
19. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки, включая Бланк.
20. Бланкируйте микропланшетный ридер и определите оптическую плотность всех ячеек при длине волны 450 нм.

**Замечание:** Для образцов, разведенных согласно инструкции в соотношении 1:2 (50 мкл образца + 50 мкл растворителя образцов), умножьте результат на соответствующий фактор разведения (x2).

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА**

ООО «ДИАМЕБ»  
 Ул. Чорновола, 97  
 г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: info@diameb.ua  
 www.diameb.ua