



ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО MCP-1

Кат. № : BMS281 / BMS281TEN
Количество тестов : 96
Производитель : Bender MedSystems GmbH, (Австрия)

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

Методика от 11-09-2012
Версия 23

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данный набор предназначен для количественного определения человеческого MCP-1. Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в диагностических или терапевтических процедурах.

2. ВВЕДЕНИЕ (См. оригинал инструкции).

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Антитела, специфичные к MCP-1, сорбированы в ячейках планшета.

Человеческий MCP-1, присутствующий в образце или стандарте, связывается с антителами, адсорбированными на лунках, и HRP-конъюгированное античеловеческое MCP-1 антитело добавляется и связывается с человеческим MCP-1, захваченным первым антителом.

После инкубации несвязанный HRP-конъюгированный античеловеческий MCP-1, удаляется во время стадии промывки, а раствор субстрата, реактивный с пероксидазой хрена, добавляют в лунки.

Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации MCP-1, присутствующего в образцах. Концентрация MCP-1 в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта.

4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты в наборе Человеческий MCP-1 ELISA BMS281 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому MCP-1 1 планшет
HRP-Конъюгат моноклональных анти-MCP-1 антител, 100 мкл 1 флакон
Стандарт MCP-1, лиофилизированный, 2 нг/мл до разведения 2 флакона

Контроль высокий, лиофилизированный 1 флакон
Контроль низкий, лиофилизированный 1 флакон
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
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл 1 флакон
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл 1 флакон
Голубой краситель, 0,4 мл 1 флакон
Зелёный краситель, 0,4 мл 1 флакон
Плёнки для заклеивания стрипов 2

4.2 Реагенты в наборе Человеческий MCP-1 ELISA BMS281TEN (10x96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому MCP-1 10 планшетов
HRP-Конъюгат моноклональных анти-MCP-1 антител, 100 мкл 10 флаконов
Стандарт MCP-1, лиофилизированный, 2 нг/мл до разведения 10 флаконов
Контроль высокий, лиофилизированный 10 флаконов
Контроль низкий, лиофилизированный 10 флаконов
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл 3 флакона
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл 4 флаконов
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл 10 флаконов
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл 10 флаконов
Голубой краситель, 0,4 мл 6 флаконов
Зелёный краситель, 0,4 мл 6 флаконов
Плёнки для заклеивания стрипов 10

5. ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ – НАБОР ИФА

Храните компоненты набора при температуре 2-8°C, кроме контролей. Храните лиофилизированные контроли при температуре -20 °C. Сразу после использования верните реагенты в холодильник (2-8°C) или -20 °C, соответственно. Храните до даты, указанной на упаковке реагентов.

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

6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Супернатант культуры клеток, сыворотка, плазма (ЭДТК, гепариновая) и околородные воды 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 отделения.

Обратите внимание на возможный «Хук-эффект» в связи с высокой концентрацией образца (См. раздел 11).

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 биологической активности человеческого MCP-1. 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). Добавление ингибиторов протеазы может обеспечить более высокую стабильность образцов.

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
- 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 °C. 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 HRP

Заметьте, что Конъюгат 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	Конъюгат HRP (мл)	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0.03	2.97
1-12	0.06	5.94

9.4 Стандарт человеческого MCP-1

Растворите лиофилизированный Стандарт MCP-1 в дистиллированной воде. Необходимый объем для растворения указан на этикетке флакона, содержащего стандарт. Оставьте 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 9.4.1).

9.4.1 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:

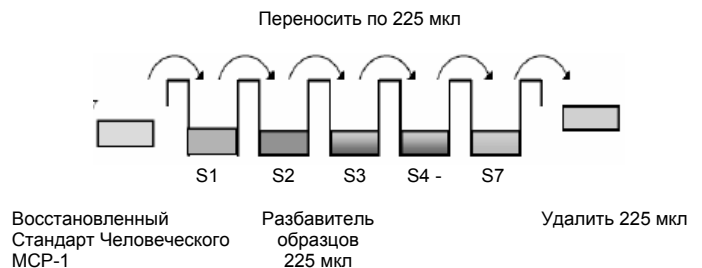
Пипетировать 225 мкл Разбавителя Образцов в каждую пробирку.

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.



9.5 Контроли

Растворите лиофилизированные контроли в 150 мкл дистиллированной воды. Тщательно перемешайте до полного растворения. При проведении анализа обращайтесь с контролями как с образцами. Диапазон контролей указан в сертификате анализа или на этикетке флакона. Храните разведенные стандарты при -20°C. Избегайте повторных циклов замораживания-размораживания.

9.6 Добавление окрашивающих реагентов: голубого и зеленого

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
----------------------------	-----------------------------------

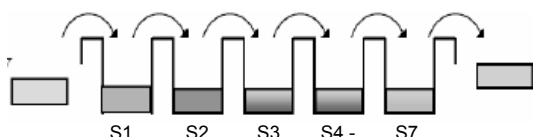
2. Конъюгат HRP: перед разбавлением концентрата биотинового конъюгата добавьте **зелёный краситель** в соотношении 1:100 (смотри таблицу) к Рабочему буферу, используемому для разбавления конъюгата, окрашенный HRP-конъюгат используйте согласно инструкции.

3 мл Рабочего буфера (1 х)	30 мкл Зеленого красителя
6 мл Рабочего буфера (1 х)	60 мкл Зеленого красителя
12 мл Рабочего буфера (1 х)	120 мкл Зеленого красителя

10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

- a. Достаньте требуемое для проведения анализа число 8-луночных стрипов. Поместите требуемое количество стрипов в держатель (к необходимому числу ячеек для Образцов добавьте ячейки для Бланка, Стандартов и Контроля). Все Стандарты, Бланк и Образцы необходимо анализировать в дублях. **Неиспользованные стрипы** сразу уберите в пакет с осушителем и храните плотно закрытым при 2-8°C.
- b. Промойте ячейки 2 раза 400 мкл **Промывочного Буфера**, полностью удаляя жидкость между промывками. Оставьте 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 высыхать!**
- c. **Разведение стандарта на планшете** (альтернативно разбавление стандарта может быть приготовлено в пробирках): Добавьте 100 мкл Разбавителя для образцов в дублях ко всем **стандартам**. Приготовьте стандартные разведения добавлением по 100 мкл разбавленного **Стандарта** (раздел «Приготовление реагентов» 9.4) 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 MCP-1 в диапазоне от 1000.0 до 15.6 пг/мл. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).

Переносить по 100 мкл



Восстановленный Стандарт Человеческого MCP-1

Разбавитель образцов 100 мкл

Удалить 100 мкл

При **внешнем разведении стандарта** пипетировать 100 мкл этих разведений стандартов (S1-S7) в лунки для стандартов согласно таблице 1.

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

	1	2	3	4
A	Ст #1 (1000 пг/мл)	Ст #1 (1000 пг/мл)	О 1	О 1
B	Ст #2 (500 пг/мл)	Ст #2 (500 пг/мл)	О 2	О 2
C	Ст #3 (250 пг/мл)	Ст #3 (250 пг/мл)	О 3	О 3
D	Ст #4 (125 пг/мл)	Ст #4 (125 пг/мл)	О 4	О 4
E	Ст #5 (62.5 пг/мл)	Ст #5 (62.5 пг/мл)	О 5	О 5
F	Ст #6 (31.3 пг/мл)	Ст #6 (31.3 пг/мл)	О 6	О 6
G	Ст #7 (15.6 пг/мл)	Ст #7 (15.6 пг/мл)	О 7	О 7
H	Бланк	Бланк	О 8	О 8

Ст – Стандарт, О – образец

- d. Внесите по 100 мкл **Рабочего буфера** в дубликаты в ячейки «Бланк».
- e. Внесите по 80 мкл **Рабочего буфера** в ячейки, предназначенные для образцов.

- f. Внесите по 20 мкл каждого **образца** в дублях в соответствующие ячейки.
- g. Приготовьте **HRP-конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов»).
- h. Добавьте 50 мкл **HRP-конъюгата** во все лунки.
- i. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- j. Снимите плёнку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 3 раза как указано в шаге «b.» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- k. Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора** ТМБ во все ячейки.
- l. Инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течение примерно 10 минут. Время инкубации с субстратным раствором определяется типом используемого микропланшетного ридера. Многие ридеры способны считать оптическую плотность только до 2,0 Ед оптической плотности.

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

Рекомендуется добавление стоп раствора, когда наивысший стандарт достиг темно-синего цвета. Реакция должна быть остановлена как только Стандарт 1 достиг значения ОП 0.9 – 0.95.

- m. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в ячейках. Важно вносить стоп-реагент быстро и с той же скоростью, что и субстратный раствор. Оптическую плотность считать немедленно после внесения стоп-реагента или в течение 1 часа при условии, что стрипы находились всё это время при температуре 2-8 °C в темноте.
- n. Определите оптическую плотность всех ячеек при 450 нм против «Бланка», желательнее 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 MCP-1.

Замечание: если инкубация проводилась без встряхивания, значения могут быть ниже, чем в примере, приведённом ниже. Тем не менее, эти результаты также считаются достоверными.

11. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитайте результаты. Для этого рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта и образца. Отклонение от среднего не должно быть более 20%.
- Используя графическую бумагу, отметьте точки считанных значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации MCP-1 на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации MCP-1 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 MCP-1 в соответствующей пробе.
- В ходе анализа, согласно данной инструкции, образцы были разведены 1:5, следовательно концентрации, полученные из калибровочной кривой, должны быть умножены на коэффициент разведения (x5).**
- Расчет концентрации в образцах, где О.П. превышает ОП Стандарта 1 может привести к неверным результатам, занижению уровня MCP-1. Такие образцы должны быть предварительно разведены в соответствии с ожидаемыми значениями Разбавителем образцов и проанализированы еще раз для получения более точного значения актуального уровня MCP-1.**
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией MCP-1. Если значения контроля не укладываются в ожидаемый диапазон, результаты анализа могут быть не достоверны.
- 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 MCP-1. MCP-1 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.

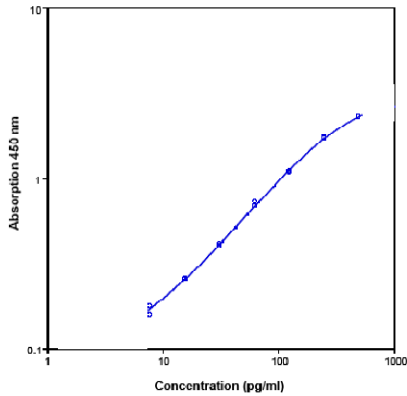


Таблица. Типичные результаты, полученные с использованием данного набора.

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	MCP-1, пг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	1000.0	2.226 2.359	2.292	2.9
2	500.0	1.322 1.360	1.341	1.4
3	250.0	0.722 0.758	0.740	2.4
4	125.0	0.411 0.417	0.414	0.8
5	62.5	0.216 0.239	0.227	5.0
6	31.3	0.123 0.131	0.127	2.9
7	15.6	0.083 0.085	0.084	0.8
Бланк	0	0.022 0.022	0.022	0.2

ОП, полученные для стандартов, могут меняться в зависимости от условий выполнения анализа (например, температурный режим).

Кроме того, на протяжении срока годности набора энзиматическая активность, и, следовательно, интенсивность окрашивания, могут изменяться. При этом результаты тестирования остаются достоверными.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Так как условия могут меняться от анализа к анализу, стандартная кривая должна быть включена в каждую серию анализа.
- Бактериальное или грибковое загрязнение образцов или реактивов может привести к недостоверным результатам.
- Используйте одноразовые наконечники.
- Стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта.
- Неполная промывка негативно влияет на точность результатов. Полностью удаляйте Промывочный буфер из ячеек между циклами промывки. Не позволяйте ячейкам высохнуть между шагами анализа.
- Использование радиоиммунотерапии значительно увеличило число пациентов с человеческими антимышиными IgG (НАМА). НАМА могут интерферировать в анализе, использующем мышиные моноклональные антитела, приводя к ложно положительным и ложно отрицательным результатам. Образцы сыворотки, содержащие антитела к мышиным иммуноглобулинам, могут быть проанализированы в случае, когда мышиные иммуноглобулины (сыворотка, асцитная жидкость или моноклональные антитела другой специфичности) добавляются к Разбавителю образцов.

13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация MCP-1, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 2.3 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 8 образцов сывороток, содержащих различные концентрации MCP-1. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения MCP-1 и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 4.7 %.

Sample	Experiment	Mean Human MCP-1 Concentration (pg/ml)	Coefficient of Variation (%)
1	1	1074	3.2
	2	965	4.3
	3	923	3.6
2	1	256	9.7
	2	233	9.1
	3	205	7.3
3	1	393	1.7
	2	354	8.3
	3	357	2.8
4	1	1194	3.2
	2	1177	7.6
	3	1037	2.6
5	1	118	4.3
	2	129	2.8
	3	137	1.6
6	1	562	4.6
	2	630	8.7
	3	494	0.9
7	1	949	6.5
	2	1112	9.1
	3	910	1.4
8	1	131	2.8
	2	137	4.7
	3	120	2.6

13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями в одной лаборатории определялась в 3-х независимых сериях анализа. В каждой серии анализа было выполнено по 6 определений каждого образца сыворотки, содержащих различные концентрации MCP-1. Коэффициент вариации составил в среднем 8,7 %.

Sample	Mean Human MCP-1 Concentration (pg/ml)	Coefficient of Variation (%)
1	987	7.9
2	231	11.1
3	368	5.9
4	1136	7.6
5	128	7.5
6	562	12.1
7	991	10.8
8	129	6.8

13.3 Извлечение

Извлечение оценивали, тестируя пулированные образцы человеческой сыворотки, обогащенные 4 различными уровнями MCP-1. Извлечение определяли в трёх независимых экспериментах в 6 повторах каждого образца. Количество эндогенного MCP-1 в не обогащенной сыворотке вычитали из двух значений обогащения. Извлечение лежало в диапазоне 84% - 98% составило в среднем 92%.

13.4. Линейность

4 образца сыворотки с разными уровнями MCP-1 были проанализированы в серии двукратных разведений в 4 репликах каждая. Ниже в таблице (таблица 5) приведены результаты. Извлечение составило 93% - 117% или в среднем 105%.

Образец	Разведение	Ожидаемая концентрация MCP-1 (пг/мл)	Наблюдаемая концентрация MCP-1 (пг/мл)	Извлечение от ожидаемого, (%)
1	1:5	--	3320	--
	1:10	1660	1731	104

	1:20	830	901	109
	1:40	415	441	106
2	1:5	--	2983	--
	1:10	1491	1503	101
	1:20	746	763	102
	1:40	373	364	98
3	1:5	--	3287	--
	1:10	1643	1811	110
	1:20	822	949	116
	1:40	411	481	117
4	1:5	--	3521	--
	1:10	1760	1787	102
	1:20	880	889	101
	1:40	440	409	93

13.5 Стабильность образцов

13.5.1 Стабильность при замораживании-размораживании

Аликвоты образцов сыворотки (обогащенные и нет) хранили при температуре -20°C , и оттаивали до 5 раз, после чего определяли уровни MCP-1. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности MCP-1 после 5 повторных циклов замораживания/оттаивания.

13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты образцов сыворотки (обогащенные и нет) хранились при температуре -20°C , $2-8^{\circ}\text{C}$, комнатной температуре (RT) и при 37°C в течение 24 часов, после чего определялись уровни MCP-1. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности MCP-1 при хранении при всех перечисленных условиях.

13.6 Специфичность

Влияние циркулирующих факторов иммунной системы было оценено путем добавления к образцам с известной концентрацией MCP-1 физиологически значимых количеств исследуемых факторов. Перекрестная реактивность не была выявлена ни с одним из исследованных факторов, в частности с MCP-3.

13.7 Ожидаемые значения

Панель из 40 образцов сыворотки от случайно выбранных здоровых доноров (мужчин и женщин) была испытана с MCP-1.

Обнаруженные человеческие MCP-1 уровни оказались в диапазоне между 74 и 760 пг/мл.

14. ЛИТЕРАТУРА (См. в оригинале инструкции).

15. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

15.1 Промывочный буфер (1 x)

Добавить Концентрат Промывочного буфера 20x (50 мл) в 950 мл дистиллированной воды.

Количество стрипов	Концентрат Рабочего буфера, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

15.2 Рабочий буфер (1 x)

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

15.3 Конъюгат HRP (1 x)

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

15.4 Стандарт

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

15.5 Контроли

Добавить 100 мкл дистиллированной воды к лиофилизированным контролям.

16. ПРОТОКОЛ ТЕСТА (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

1. Приготовить необходимое количество полосок.
2. Промыть ячейки планшета дважды Промывочным буфером
3. Приготовьте стандартные разведения на планшете: добавить 100 мкл рабочего буфера в все ячейки. создайте разведения стандарта переносом по 100 мкл из ячейки в ячейку. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2). Альтернативное разведение стандарта в пробирках: пипетировать 100 мкл этих разведений стандарта в лунки.
4. Внесите по 100 мкл Разбавителя образцов в ячейки «Бланк».

5. Внесите по 80 мкл Разбавителя образцов в ячейки, предназначенные для образцов.
6. Внесите по 20 мкл каждого образца в соответствующие ячейки.
7. Приготовьте HRP-конъюгат.
8. Добавьте по 50 мкл HRP-конъюгата во все ячейки.
9. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре ($18-25^{\circ}\text{C}$).
10. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 3 раза Промывочным буфером.
11. Внесите по 100 мкл стрептавидинового конъюгата во все ячейки.
12. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 10 минут при комнатной температуре ($18-25^{\circ}\text{C}$).
13. Добавьте по 100 мкл стоп-раствора во все ячейки, включая Бланк.
14. Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм против «Бланка», желательнее использовать длину волны сравнения 610-650 нм.

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

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

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