



ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР (ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ) ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАСТВОРИМОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО sCD40L

Кат. № : BMS293 / BMS293TEN
Количество тестов : 96, 10 x 96
Производитель : Bender MedSystems GmbH, (Австрия)

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

Методика от 09-07-2012
Версия 25

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный иммуноферментный метод предназначен для определения концентрации растворимой молекулы лиганда CD40 (высокочувствительный). Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в диагностических или терапевтических процедурах.

2. ВВЕДЕНИЕ

CD40 принадлежит семейству рецепторов TNF. Не смотря на то, что биологическая значимость некоторых пар лиганд-рецептор, относящихся к данному семейству, остается неясной, для молекулы CD40 доказана ее важная биологическая роль.

Взаимодействию CD40/ CD40L предсказывают ключевую роль в иммунной активации, в особенности при активации В-клеток Т-клетками. Эта молекула, так же как и другие лиганды, принадлежащие данному семейству, проявляет свойства ко-стимулятора пролиферации Т-клеток, и, как и все остальные, экспрессируется активированными Т-клетками. Было показано, что процесс запрограммированной клеточной гибели вовлечен в элиминирование клонов самореактивных лимфоцитов при нормальной функции иммунной системы. Взаимодействие с собственными антигенами, связанными с мембраной, может элиминировать класс самореактивных В-клеток путем апоптоза. Антиген-рецептор опосредованный В-клеточный апоптоз блокируется при передаче сигнала через молекулу CD40 на поверхность В-клетки (10). Так как лиганд CD40 (CD40L) экспрессируется активированными Т-хелперными клетками, В-клетки могут удаляться путем апоптоза и активироваться при взаимодействии иммунной системы с внешним антигеном, который в норме может активировать Т-хелперные клетки. Таким образом, взаимодействие CD40 - CD40L играет центральную роль на различных фазах В-клеточного ответа на Т-зависимые антигены.

Подводя итог, можно сказать, что В-клетки могут участвовать в процессе регуляции их собственного разрушения. Защита против Fas-зависимого апоптоза, возможная благодаря связи иммуноглобулин-рецептор, может составлять надежный механизм, с помощью которого элиминируются случайные В-клетки, активированные CD40L, экспрессирующимися Т-клетками, но сохраняя антиген-специфические В-клетки.

CD40L экспрессируется на поверхности активированных CD4+ Т-клеток, базофилов, тучных клеток. Связывание CD40L с его рецептором, CD40, на поверхности В-клеток, стимулирует пролиферацию, адгезию и дифференцировку В-клеток. В циркулирующей крови было показано присутствие растворимой изоформы CD40L. Растворимая молекула представляет из себя гомотример белка с молекулярной массой 18 кДа, проявляющего полную активность в пролиферации В-клеточной дифференцировки и дифференцировки, способна «спасать» В-клетки от апоптоза и связывать растворимый CD40. Обсуждается потенциальная вспомогательная роль CD40L при В-клеточных опухолях, кроме того было обнаружено, что молекулярный дефект при X-связанном гипер-IgM синдроме относится к гену CD40L, его функции затрагиваются в В-клеточных гибридомах, при хроническом лимфоцитарном лейкозе, а так же при различных аутоиммунных заболеваниях.

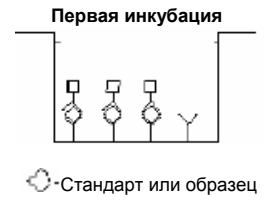
Список литературы доступен на интернет-странице производителя:
www.bendermedsystems.com

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

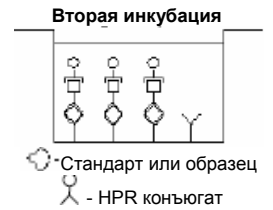
Антитела к человеческому sCD40L адсорбированы в лунках микропланшета.



Человеческий sCD40L, присутствующий в образцах или стандартах, связывается с антителами, адсорбированными в лунках. Антитела к sCD40L, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP-конъюгат), связывают молекулы человеческого sCD40L, захваченные первыми антителами.



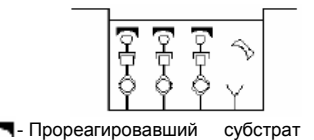
После инкубации при промывке из лунок удаляются не связавшиеся биологические компоненты и добавляются антитела к sCD40L, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP-конъюгат), связывают молекулы человеческого sCD40L, захваченные первыми антителами.



После инкубации несвязавшиеся антитела, конъюгированные с HRP, и в лунки добавляется субстратный раствор. Реакция останавливается добавлением кислоты.



Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации человеческого sCD40L, присутствующего в образцах. Концентрация человеческого sCD40L в образцах определяется по калибровочной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта человеческого sCD40L.



4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты в наборе Человеческий sCD40L Platinum ELISA (высокочувствительный) BMS293 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому sCD40L	1 планшет
HRP-Конъюгат анти-sCD40L моноклональных антител (150 мкл)	1 флакон
Стандарт sCD40L, 20 нг/мл, лиофилизированный	2 флакона
Высокий контроль, лиофилизированный	1 флакон
Низкий контроль, лиофилизированный	1 флакон
Разбавитель образцов, 12 мл	1 флакон
<i>(Замечание: в некоторых случаях Разбавитель образцов содержит нерастворимый белый осадок, который не влияет на характеристики теста. Используйте в соответствии с протоколом.)</i>	
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
Плётки для заклеивания стрипов	4

4.2 Реагенты в наборе Человеческий sCD40L Platinum ELISA (высокочувствительный) BMS293TEN (10x96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому sCD40L	10 планшетов
HRP-Конъюгат анти-sCD40L моноклональных антител (150 мкл)	10 флаконов
Стандарт sCD40L, 20 нг/мл, лиофилизированный	10 флаконов
Высокий контроль, лиофилизированный	10 флаконов
Низкий контроль, лиофилизированный	10 флаконов
Разбавитель образцов, 12 мл	10 флаконов
<i>(Замечание: в некоторых случаях Разбавитель образцов содержит нерастворимый белый осадок, который не влияет на характеристики теста. Используйте в соответствии с протоколом.)</i>	
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл	2 флакона
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	4 флакона
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
Плётки для заклеивания стрипов	20

5. ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ – НАБОР ИФА

Храните компоненты набора при температуре 2-8°C, кроме контролей. Хранить лиофилизированные контроли при -20 °С.

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.

Стандарт должен быть использован сразу же после разведения и не может быть оставлен на хранение.

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 °С, чтобы избежать потери биологически активного человеческого sCD40L. 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 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 °С. 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 HRP-Конъюгат

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

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

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

9.4 Стандарт человеческого sCD40L

Растворите лиофилизированный стандарт **Рабочим буфером** (точный объем стандартного раствора, который должен получиться в результате растворения, указан на этикетке флакона). Оставьте Стандарт на 10-30 минут. Аккуратно перемешайте (концентрация стандарта = 20 нг/мл).

Развести стандарт еще раз 1:2 таким же количеством Разбавителя для образцов (концентрация полученного стандарта = 10 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 10с) или в пробирках (9.4.1).

9.4.1 Внешнее разведение Стандарта

Пометить 7 пробирок, одну для каждой точки стандарта. S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7.

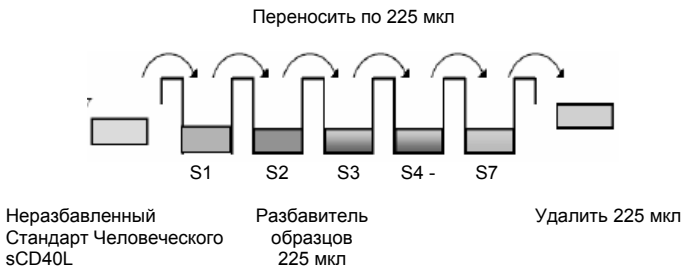
Затем подготовить серийные разведения 1:2 для стандартной кривой как указано ниже:

Пипетировать 225 мкл Разбавителя Образцов в каждую пробирку. Пипетировать 225 мкл восстановленного стандарта (концентрация стандарта = 10 нг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1 = 5 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 Контроль

Растворите лиофилизированные контроли в 200 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, 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), 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 HRP-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

10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

a. 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°C.

b. 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 перевернутом виде. **Не позволяйте лункам высыхать!**

c. **Приготовление разведений стандарта в лунках микропланшета** (альтернативно разведения стандарта могут быть приготовлены в пробирках – см. 9.4.1):

Внесите по 100 мкл рабочего буфера во все лунки, предназначенные для стандартов. Внесите 100 мкл приготовленного стандарта (см. раздел «Приготовление реагентов», п. 9.4, концентрация = 10 нг/мл), в дублях, в лунки A1 и A2 (см. Таблицу 1). Перемешайте содержимое лунок A1 и A2 повторным пипетированием (концентрация стандарта 1, S1 = 5.00 нг/мл), и перенесите по 100 мкл раствора из лунок A1 и A2 в лунки B1 и B2, соответственно (см. рис. 7). 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 sCD40L в диапазоне 5.00 - 0.08 нг/мл. Удалите по 100 мкл жидкости из последних использованных лунок (G1, G2).

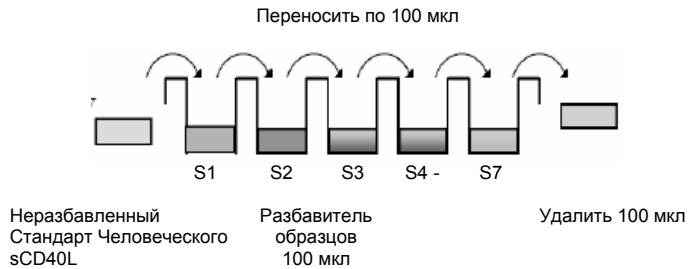


Рисунок 7. Приготовление серийных разведений из Стандарта sCD40L

Если разведение стандарта было выполнено в пробирках (см.п.9.4.1), 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 (5.00 нг/мл)	Ст #1 (5.00 нг/мл)	O 1	O 1
B	Ст #2 (2.50 нг/мл)	Ст #2 (2.50 нг/мл)	O 2	O 2
C	Ст #3 (1.25 нг/мл)	Ст #3 (1.25 нг/мл)	O 3	O 3
D	Ст #4 (0.63 нг/мл)	Ст #4 (0.63 нг/мл)	O 4	O 4
E	Ст #5 (0.31 нг/мл)	Ст #5 (0.31 нг/мл)	O 5	O 5
F	Ст #6 (0.16 нг/мл)	Ст #6 (0.16 нг/мл)	O 6	O 6
G	Ст #7 (0.08 нг/мл)	Ст #7 (0.08 нг/мл)	O 7	O 7
H	Бланк	Бланк	O 8	O 8

Ст – Стандарт, O – образец

d. Внесите по 100 мкл **буфера для разведения образцов** в лунки «Бланк».

e. Внесите по 80 мкл **буфера для разведения образцов** в лунки, предназначенные для **сыворотки и контрольных образцов**.

- Добавьте 50 мкл **буфера для разведения** образцов в лунки, предназначенные для **образцов плазмы**.
- Внесите по 20 мкл образцов сыворотки и контрольного образца в дублях в лунки, предназначенные для образцов. Внесите по 50 мкл образцов плазмы в дублях в лунки, предназначенные для образцов.
 - Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, то на орбитальном шейкере, установленном на 400 об/мин.
 - Приготовьте **HRP-конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов» 9.3).
 - Снимите пленку. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием (сливом). Промойте лунки 3 раза как указано в шаге «b» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
 - Добавьте по 100 мкл **HRP-конъюгата** во все лунки.
 - Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, то на орбитальном шейкере, установленном на 400 об/мин.
 - Снимите пленку. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием (сливом). Промойте лунки 3 раза как указано в шаге «b» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
 - Внесите по 100 мкл **TMB субстрата** во все лунки.
 - Инкубируйте при комнатной температуре (18° to 25°C) в течение приблизительно 10 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.

- Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все лунки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в лунках. 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.
- 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 sCD44std.

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

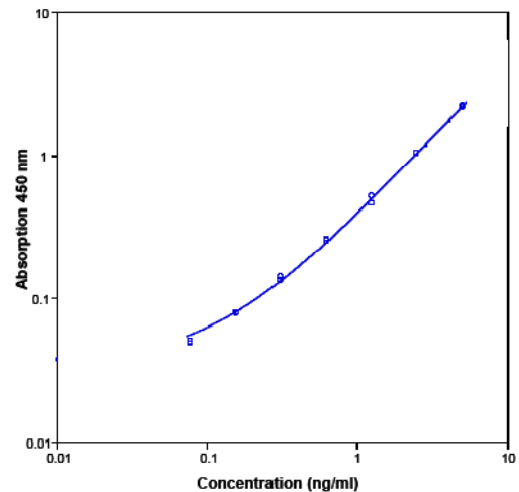
11. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 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 sCD40L на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации sCD40L 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 sCD40L в соответствующей пробе.
- Для образцов сыворотки и контролей, которые были разведены согласно данной инструкции в соотношении 1:5 перед исследованием, концентрация, полученная исходя из стандартной кривой, должна быть умножена на фактор разведения, (x5).
Для образцов плазмы, которые были разведены согласно данной инструкции в соотношении 1:2 перед

исследованием, концентрация, полученная исходя из стандартной кривой, должна быть умножена на фактор разведения, (x2).

- Расчет концентрации в образцах, где ОП. превышает ОП Стандарта 1 может привести к неверным результатам, занижению уровня sCD40L. Такие образцы должны быть предварительно разведены в соответствии с ожидаемыми значениями Разбавителем образцов и проанализированы еще раз для получения более точного значения актуального уровня sCD40L.
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией sCD40L. Если значения контроля не укладываются в ожидаемый диапазон, результаты анализа могут быть недостоверны.
- Пример стандартной кривой показан на Рисунке 8. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

Рисунок. Пример стандартной кривой для sCD40L. sCD40L 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.



Типичные результаты, полученные с использованием набора Human sCD40L ELISA:

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарты	Концентрация sCD40L, нг/мл	О.П. (450 нм)	О.П. среднее	C.V. (%)
1	5.00	2,189	2,163	1,2
		2,136		
2	2.50	1,013	1,017	0,4
		1,021		
3	1.25	0,508	0,483	5,2
		0,458		
4	0.63	0,260	0,257	1,2
		0,254		
5	0.31	0,141	0,138	2,5
		0,134		
6	0.16	0,080	0,079	1,3
		0,078		
7	0.08	0,050	0,049	2,0
		0,048		
Бланк	0	0,022	0,019	15,8
		0,016		

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 удалите Промывочный буфер из ячеек между циклами промывки. Наполняйте лунки буфером для промывок как это указано, для каждого цикла промывки. Не позволяйте ячейкам высыхать или оставаться незакрытыми долгий 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 мышиным 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 sCD40L ELISA 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, 6 независимых постановок) и составляет 0.01 нг/мл.

13.2. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

13.2.1 Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась в 3 независимых сериях анализа. В каждой серии анализа было выполнено 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации человеческого sCD40L. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения человеческого sCD40L и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 5.5%.

Таблица 3. Средние концентрации человеческого sCD40L и коэффициент вариации для каждого образца

Образец	№	Концентрация sCD40L, нг/мл	C.V. (%)
1	1	28,4	9,5
	2	25,8	9,3
	3	23,3	5,2
2	1	22,8	4,8
	2	20,7	5,4
	3	21,5	3,0
3	1	15,7	6,9
	2	12,2	8,7
	3	13,1	6,1
4	1	10,1	4,7
	2	8,8	4,9
	3	8,8	4,0
5	1	5,1	5,1
	2	4,2	8,4
	3	4,5	8,9
6	1	12,9	3,1
	2	12,6	5,1
	3	10,5	2,2
7	1	9,9	1,3
	2	9,5	5,1
	3	10,1	6,3
8	1	6,2	5,2
	2	6,5	7,0
	3	6,7	1,5

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 sCD40L. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения человеческого sCD40L и коэффициенты вариации для каждого образца. Коэффициент вариации был рассчитан из 18 определений каждого образца и составил в среднем 6.6 %.

Образец	Концентрация sCD40L, нг/мл	C.V. (%)
1	25,8	8,1
2	21,7	3,8
3	13,7	10,5
4	9,2	6,8
5	4,6	8,7
6	12,0	8,8
7	9,8	2,7
8	6,5	3,3

13.3. ИЗВЛЕЧЕНИЕ

Извлечение оценивали тестируя пулированные образцы человеческой сыворотки, обогащенные 4 различными уровнями человеческого sCD40L. Извлечение определяли в трёх независимых экспериментах в 6 повторах каждого образца. Количество эндогенного человеческого sCD40L в не обогащенной сыворотке вычитали из двух значений обогащения. Извлечение лежало в диапазоне 87% - 112% составило в среднем 99%.

13.4 ЛИНЕЙНОСТЬ РАЗВЕДЕНИЯ

Образцы сыворотки с разными уровнями человеческого sCD40L были проанализированы в серии двукратных разведений в 4 репликах каждая. Ниже в таблице (таблица 5) приведены результаты. Извлечение составило 84% - 114% или в среднем 97%.

Образец	Разведение	Ожидаемая концентрация человеческого sCD40L(нг/мл)	Наблюдаемая концентрация человеческого sCD40L (нг/мл)	Извлечение от ожидаемого, (%)
1	1:5	--	25.2	--
	1:10	12.6	14.3	114
	1:20	7.2	6.7	94
	1:40	3.4	3.5	104
2	1:5	--	23.5	--
	1:10	11.7	12.0	103
	1:20	6.0	5.1	85
	1:40	2.5	2.3	92
3	1:5	--	27.5	--
	1:10	13.7	13.5	98
	1:20	6.7	7.3	109
	1:40	3.7	3.6	97
4	1:5	--	28.1	--
	1:10	14.1	11.7	84
	1:20	5.9	5.5	94
	1:40	2.8	2.6	93

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 sCD40L. Не наблюдалось значительной потери активности человеческого sCD40L 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 sCD40L. Наблюдалась значительная потеря иммунореактивности человеческого sCD40L при хранении при комнатной температуре (57 %) и при 37 °C (4%).

13.6. СРАВНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ И ПЛАЗМЫ

Образцы сыворотки и ЭДТА, цитратной и гепариновой плазмы были взяты одновременно у 2 пациентов и протестированы данным методом. Все перечисленные матрицы образцов могут быть использованы для анализа данным методом.

13.7. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Влияние циркулирующих факторов иммунной системы было оценено путем добавления к образцам сывороток с известной концентрацией sCD40L физиологически значимых количеств исследуемых факторов. Не была выявлена перекрестная реактивность.

13.8. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

40 образцов сывороток и плазмы практически здоровых людей (мужчин и женщин) были протестированы на содержание человеческого sCD40L. Полученные уровни Уровень человеческого sCD40L может варьироваться в зависимости от используемого метода забора образца. См. таблицу ниже.

Образец	N	Диапазон (нг/мл)	% детектируемый	Полученное значение (нг/мл)
Сыворотка	40	nd* - 29.1	32,5	4,2
Плазма (ЭДТА)	40	nd* - 10.6	72,5	2,9
Плазма (цитрат)	40	nd* - 7.5	80	2,0
Плазма (гепарин)	40	nd* - 7.5	77,5	1,8

nd* - не детектируемые уровни

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 Конъюгат-HRP

Количество стрипов	Концентрат HRP-конъюгата, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,06	5,94
1-12	0,12	11,88

15.4 Стандарт человеческого sCD40L

Развести лиофилизированный человеческий sCD40L с дистиллированной водой. (Объемы разведения указаны на этикетке флакона со стандартом). Разбавить разведенный стандарт 1:2 добавлением такого же количества Разбавителя образцов.

15.5 Контроли

Добавить 200 мкл дистиллированной воды к лиофилизированным контролям.

16. ПРОТОКОЛ ТЕСТА (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

1. Определитесь с необходимым количеством микролуночных полосок.
2. Промыть ячейки планшета дважды **Промывочным буфером**
3. **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.
4. Внесите по 100 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки «Бланк», в дублях.
5. Внесите по 80 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для **образцов сыворотки и контрольных образцов**.
Добавить 50 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для **образцов плазмы**.
6. Внесите по 20 мкл **сыворотки и контрольного образца** в соответствующие ячейки, в дублях.
Внесите по 50 мкл **образца плазмы** в соответствующие ячейки, в дублях.
7. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18 – 25°C).

8. Приготовьте **HRP- конъюгат**.
9. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 3 раза **Промывочным буфером**.
10. Добавьте по **100 мкл HRP- конъюгата** во все ячейки.
11. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18 – 25°C).
12. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 3 раза **Промывочным буфером**.
13. Внесите по 100 мкл **ТМВ субстрата** во все ячейки.
14. Инкубируйте при комнатной температуре примерно 10 минут.
15. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки.
16. Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм.

Замечание: Для образцов сыворотки и контрольных образцов, разведенных согласно инструкции 1:5 (20 мкл образца + 80 мкл буфера для разведения образцов), концентрацию, полученную из калибровочной кривой, необходимо умножить на соответствующий коэффициент разведения (x5).

Для образцов плазмы, разведенных 1:2 (50 мкл образца + 50 мкл буфера для разведения образцов), концентрацию, полученную из калибровочной кривой, необходимо умножить на соответствующий коэффициент 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