



**ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО
SUPPRESSION OF TUMORIGENICITY 2 (ST2)
В СУПЕРНАТАНТАХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР, СЫВОРОТКЕ И
ПЛАЗМЕ**

Кат. № :DST200
Кол-во определений :96 определений

*Методика от 08.09-12/11
Версия 752065.2*

**Только для исследовательских целей
Не для диагностического использования**

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный тест основан на методе количественного твердофазного иммуноферментного анализа типа «сэндвич». Микропланшет покрыт специфическими моноклональными антителами к ST2. В ходе реакции в лунки планшета добавляются стандарты и образцы, и любой ST2, присутствующий в образце, связывается с иммобилизованными антителами. После промывки несвязавшиеся компоненты удаляются, и в ячейки добавляется конъюгат поликлональных антител к ST2 с ферментом. После второй промывки и удаления несвязавшегося конъюгата фермент-антитела добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментом с образованием цветного комплекса. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации ST2, присутствующей в образце. Цветная реакция останавливается стоп-реагентом и интенсивность окраски измеряется на планшетном фотометре.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- ИСПОЛЬЗОВАТЬ ТОЛЬКО ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЕЙ. НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР
- Данный Набор должен быть использован до истечения срока годности указанного на этикетке набора.
- Не смешивайте и не заменяйте реагенты с реагентами других лотов или других производителей.
- Если значения концентрации образцов выше, чем концентрация самого высокого стандарта, разведите образцы соответствующим буфером для разведения стандарта и повторите анализ.
- Любые изменение в буфере для разведения стандарта, выполнении процедуры, техники пипетирования, промывки, времени инкубации или температуре и сроке годности набора могут быть причиной изменений в связывании.
- Данный метод предполагает исключение влияния растворимых рецепторов, связывающих белков и других факторов, присутствующих в биологических образцах. До проверки всех факторов, однако, возможность влияния не может быть исключена.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- При перемешивании белковых растворов избегайте вспенивания.

- Избегайте взаимной контаминации растворов, заменяйте наконечник на новый каждый раз при внесении стандарта другой концентрации, нового образца и нового реагента. Также для каждого реагента необходимо использовать отдельные резервуары (ванночки).
- Для получения корректных результатов закрывайте планшет адгезивной плёнкой каждый раз на время инкубации.
- При использовании автоматического вошера для промывок, установите после добавления буфера для промывок период замачивания 30 секунд, и/или вращение микропланшета на 180 градусов между шагами промывок может повысить точность результатов.
- Субстратный раствор должен оставаться бесцветным до момента добавления в ячейки. Храните в тёмном месте. Цвет Субстратного раствора во время реакции должен изменяться от бесцветного до голубого различной интенсивности.
- Стоп-раствор необходимо добавлять в ячейки в той же последовательности и с той же скоростью, что и Субстратный раствор. Цвет в ячейках будет меняться с голубого на жёлтый при добавлении стоп-реагента. Зеленый цвет в лунках свидетельствует о том, что стоп-раствор не был тщательно перемешан с раствором субстрата.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА, И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Хранить невскрытый набор при 2-8 °С. Не использовать после окончания срока годности.

Реагент	№ реагента	Описание	Хранение открытых / восстановленных материалов
ST2 микропланшет	893762	96-луночный полистироновый микропланшет (12 x 8 лунок), покрытый мышинными моноклональными антителами к ST2	Верните оставшиеся стрипы в пакет с осушителем, закройте зип-застёжку и поместите в холодильник. Неиспользованные стрипы храните в пакете при 2-8°C 1 месяц*.
ST2 стандарт	893764	3 флакона (20 нг/флакон). Рекомбинантный человеческий ST2 в белковом буферном растворе с консервантами, лиофилизированный.	Выбросить после использования. Использовать свежий стандарт для каждого анализа.
ST2 конъюгат	893763	12 мл поликлональных антител к ST2, конъюгированных с пероксидазой хрена, с консервантами.	Можно хранить 1 месяц при температуре 2-8°C*
Рабочий буфер RD1-63	895352	12 мл белкового буферного раствора с консервантами.	
Буфер для разведения стандарта RD5-26 Концентрат	895525	21 мл белкового буферного раствора с консервантами.	
Концентрат буфера для промывок	895003	21 мл 25х буферного солевого раствора с консервантами	
Цветной реагент А	895000	12 мл стабилизированного раствора перекиси водорода	
Цветной реагент В	895001	12 мл стабилизированного раствора хромогена (тетраметилбензидин)	
Стоп-раствор	895174	23 мл разбавленного раствора серной кислоты	
Плёнки для заклеивания стрипов	Без номера	4 Адгезивные пленки	

*Учитывая, что не заканчивается срок годности.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Микропланшетный ридер с фильтром 450 нм с фильтром сравнения 540 или 570 нм.
- Калиброванные пипетки переменного объема с одноразовыми наконечниками.
- Деионизированная или дистиллированная вода.
- Впрыскивающая бутылка, ручное или автоматическое промывающее устройство
- Градуированные цилиндры на 100 мл и 500 мл.
- Тестовые пробирки для разбавления стандартов и образцов.
- Контроли ST2 человека (опционально; могут быть заказаны отдельно в R&D Systems).

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Стоп-раствор содержит раствор кислоты. Защищайте глаза, руки, лицо и надевайте защитную одежду при работе с данным набором.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Условия сбора и хранения образцов, перечисленные ниже, представляют собой общие руководящие принципы. Оценка стабильности образца не проводилась.

Образцы супернатантов клеточных культур

Центрифугируйте образцы для удаления частиц и анализируйте немедленно или приготовьте аликвоты и храните при $\leq -20^\circ\text{C}$. Избегайте повторного замораживания-размораживания.

Образцы сыворотки

Если используете сепарационные пробирки, позвольте крови свернуться в течение 30 минут при комнатной температуре. Центрифугируйте 15 минут при 1000 g. Анализируйте сыворотку сразу или приготовьте аликвоты и храните при $\leq -20^\circ\text{C}$. Избегайте повторного замораживания-размораживания образцов.

Образцы плазмы

Соберите плазму, используя для сбора образцов в качестве антикоагулянта ЭДТА или гепарин. Отделите плазму центрифугированием в течение 15 минут при 1000 g. Анализируйте плазму сразу или приготовьте аликвоты и храните при $\leq -20^\circ\text{C}$. Избегайте повторного замораживания-размораживания.

Замечание: Использование цитратной плазмы не было протестировано для данного метода.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы сыворотки и плазмы должны быть разведены не менее, чем в 20 раз буфером для разведения стандарта RD5-26 перед тестированием. Например, 10 мкл образца + 190 мкл буфера для разведения стандарта RD6-11.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты должны достичь комнатной температуры (18-25°) перед использованием.

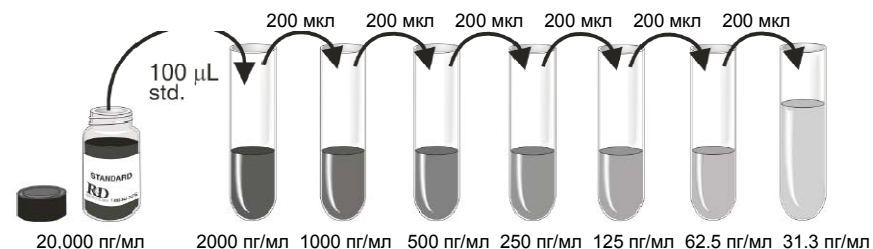
Буфер для промывок - нагрейте концентрат буфера для промывок до комнатной температуры и перемешайте, убедившись, что кристаллы соли, выпавшие в осадок, полностью растворились. Разведите 20 мл концентрата буфера для промывок дистиллированной или деионизированной водой для приготовления до 500 мл готового буфера для промывок.

Субстратный раствор - Смешайте равные доли Цветных реагентов А и В в подходящей емкости за 15 минут до использования. Защищайте от света. Для одной ячейки необходимо 100 мкл смеси.

Растворитель калибратора RD5-26 (1X) - Для подготовки Разбавителя калибратора RD5-26 (1X), добавьте 20 мл Концентрата Разбавителя калибратора RD5-26 к 60 мл деионизированной или дистиллированной воды.

ST2 стандарт - Растворите лиофилизированный ST2 стандарт в 1.0 мл дистиллированной или деионизированной воды. В результате растворения будет получен сток-раствор с концентрацией 20,000 пг/мл. Оставьте на **15 минут** для полного растворения, затем перед дальнейшим разведением перемешайте осторожно, покачиванием.

Добавьте 900 мкл буфера для разведения стандарта RD5-26 (1X) в пробирку, помеченную 2000 пг/мл. Добавьте по 200 мкл соответствующего буфера для разведения стандарта в каждую из оставшихся пробирок. Используйте сток-раствор для приготовления серии разведений (см. рисунок), тщательно перемешивая полученные стандарты между шагами разведения. Стандарт 2000 пг/мл используйте в качестве самого высокого стандарта и соответствующий буфер для разведения стандарта в качестве нулевого стандарта (0 пг/мл).

**ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

Все реагенты и образцы должны достичь комнатной температуры (18-25°) перед использованием. Рекомендуется все образцы анализировать в дублях.

1. Приготовьте все реагенты, рабочие разведения стандартов и образцы как это описано в предыдущем разделе.
2. Достаньте требуемое для проведения анализа число стрипов. Неиспользованные стрипы храните в пакете с осушителем при 2-8°C. Поместите требуемое количество стрипов в держатель. Верните оставшиеся стрипы в пакет с осушителем и поместите в холодильник.
3. Добавьте 50 мкл Рабочего буфера RD1-63 во все ячейки.
4. Добавьте по 50 мкл каждого стандарта, контроля или образца* в соответствующие ячейки. Закройте стрипы адгезивной плёнкой. Инкубируйте 2 часа при комнатной температуре на рабочей поверхности.
5. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 4 раза. Промывайте, заполняя каждую ячейку 400 мкл буфера для промывок, используя сжимаемую бутылку, многоканальную пипетку ручной диспенсер или устройство для автоматической промывки (вошер). Полное удаление жидкости в каждом цикле промывки принципиально для хорошего качества анализа. После последнего цикла промывки удалите остатки буфера для промывок аспирацией или декантированием. Переверните и подсушите планшет на чистой фильтровальной бумаге.
6. Добавьте по 100 мкл ST2 конъюгата в каждую лунку. Закройте стрипы новой адгезивной плёнкой. Инкубируйте 2 часа при комнатной температуре.
7. Повторите промывку как указано в п. 5.
8. Внесите по 100 мкл Субстратного раствора во все ячейки. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре. **Защитайте планшет от воздействия света.**

- Добавьте по 100 мкл стоп-раствора во все ячейки. Если цвет в ячейках зеленый или, если изменение цвета не происходит однородно, постучите осторожно по держателю стрипов для перемешивания реагентов.
- Определите оптическую плотность ячеек в течение 30 минут при 450 нм. Используйте, если это возможно, длину волны сравнения 540 или 570 нм. Это необходимо для устранения оптических дефектов планшета. Если измерения с корректировкой невозможны, вычитите значения, полученные для лунок при длине волны 540 нм или 570 нм из значений, полученных при 450 нм. Считывание только при 450 нм может быть выше и менее точным по сравнению с двухволновым считыванием.

*Образцы сыворотки необходимо развести перед использованием.

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

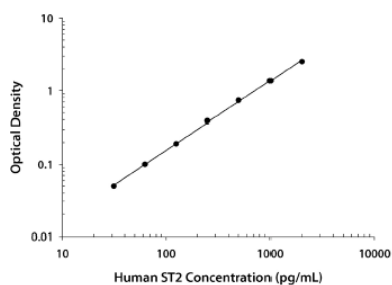
Рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта, контроля и образца и вычитите среднее значение О.П. нулевого стандарта.

Используя графическую бумагу, отметьте точки рассчитанных значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую. Оптимально может использоваться график в координатах log/log, для log трансформации может быть использован регрессионный анализ.

Для определения концентрации PDGF-AB каждого образца сначала найдите соответствующее значение О.П. на оси y и проведите горизонтальную линию до пересечения с калибровочной кривой. Затем из точки пересечения проведите вертикальную линию до пересечения с осью x. Значение на оси X в точке пересечения будет соответствовать концентрации PDGF-AB в образце. Так как образцы разводили, то значение найденной концентрации необходимо умножить на коэффициент разведения.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Пример результатов измерения стандартов PDGF-AB. Эти данные приводятся только в качестве примера. Стандартная кривая должна строиться для каждой серии анализов:



пг/мл	ОП	Среднее ОП	Скорректированное
0	0.036	0.038	-
	0.040		
31.3	0.085	0.088	0.050
	0.090		
62.5	0.137	0.138	0.100
	0.138		
125	0.228	0.229	0.191
	0.229		
250	0.420	0.425	0.387
	0.430		
500	0.764	0.774	0.736
	0.783		
1000	1.373	1.408	1.370
	1.442		
2000	2.536	2.544	2.506
	2.552		

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась путем 20 определений каждого из 3 образцов с известной концентрацией на одном планшете.

Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями исследований определялась анализом трех образцов сыворотки с известной концентрацией 40 раз в независимых сериях анализа.

Внутри серии:

Образец	Образец 1	Образец 2	Образец 3
п	20	20	20
Среднее значение, (пг/мл)	273	628	1027
Стандартное отклонение	15.2	27.5	46.3
Коэффициент вариации CV, (%)	5.6	4.4	4.5

Между сериями:

Образец	Образец 1	Образец 2	Образец 3
п	40	40	40
Среднее значение, (пг/мл)	262	642	1064
Стандартное отклонение	18.7	34.7	67.2
Коэффициент вариации CV, (%)	7.1	5.4	6.3

ИЗВЛЕЧЕНИЕ

Извлечение ST2, добавленного в образцы с различными концентрациями белка, охватывающими весь измеряемый диапазон, было определено для различных матриц.

Тип образца	Среднее извлечения, %	Диапазон
Культуральная среда (n=4)	97	89-106%

ЛИНЕЙНОСТЬ

Образцы с высоким содержанием, или насыщенные до высокой концентрации ST2 были серийно разведены *буфером для разведения стандарта* и проанализированы.

		Культуральная среда (n=4)	Сыворотка* (n=4)	ЭДТА плазма без тромбоцитов (n=4)	Гепариновая плазма без тромбоцитов (n=4)
1:2	Среднее ожидаемое, %	105	105	104	105
	Диапазон, %	102-109	97-109	98-109	98-110
1:4	Среднее ожидаемое, %	105	104	103	107
	Диапазон, %	102-112	98-109	96-110	98-115
1:8	Среднее ожидаемое, %	102	102	104	104
	Диапазон, %	90-111	91-113	93-110	92-112
1:16	Среднее ожидаемое, %	98	100	100	98
	Диапазон, %	85-113	87-112	89-111	89-112

* Образцы сыворотки перед анализом были разведены.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Минимально определяемая концентрация (MDD) или чувствительность метода, измеренная в 45 анализах составила в среднем 5.1 пг/мл с диапазоном 2.45 – 13.5 пг/мл.

Чувствительность была рассчитана добавлением 2 стандартных отклонений к среднему значению оптической плотности 20 измеренных реплик стандарта 0 нг/мл и расчетом соответствующей концентрации.

КАЛИБРОВКА

Данный иммуноферментный метод был прокалиброван по высокочистому препарату рекомбинантного человеческого ST2, экспрессируемому в NSO, произведенному R&D Systems.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Сыворотка/плазма - Данным методом был протестированы образцы сыворотки и плазмы.

Тип образца	Среднее (пг/мл)	Диапазон (пг/мл)	Отклонение (пг/мл)
Сыворотка (n=35)*	13.0	6.74-20.4	4.15
Гепариновая плазма (n=35)	12.3	5.72-19.8	4.10
ЭДТА плазма (n=35)	12.2	4.90-19.9	4.08

* Образцы были разведены.

Супернатанты клеточных культур –

Клетки VJAV человеческой лимфомы Беркитта (1 × 10⁵ клеток/мл) высевали в DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина сульфата. Аликвота супернатанта клеточной культуры была удалена, анализирована в отношении уровней природного ST2 и измерена 126 пг/мл.

Клетки BUD-8 человека фибробластов высевали в MEM NEAA 90% с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл сульфата стрептомицина до однородности. Аликвота клеточной культуры супернатант была удалена, анализирована в отношении уровней природного ST2 и составила 273 пг/мл.

Клетки U-87 MG глиобластомы человека/астроцитомы (2,1 × 10⁵ клеток/мл) высевали в MEM, дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки, 1% пирувата натрия и 2 mM L-глутамин до однородности. Аликвота клеточной культуры супернатант была удалена, анализирована в отношении уровней природного ST2 и составила 63,9 пг/мл.

Клетки HUVEC пупочной вены человека эндотелиальных (1 × 10⁴ клеток / мл) не высевали в EGM-2 среды до однородности. Аликвоту клеточной культуры супернатант был удален, анализировали в отношении уровней природного ST2 и измеряли 29920 пг/мл.

HUT-78 человека кожные Т-клеточной лимфомы клеток (1 × 10⁴ клеток / мл) высевали в среде RPMI не дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки, 5 мкМ β-меркаптоэтанола и 10 нг / мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека, до однородности. Аликвоту клеточной культуры супернатант был удален, анализировали в отношении уровней природного ST2 и измерили 54,9 пг / мл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Данный метод распознаёт рекомбинантную и нативную формы человеческого ST2. Факторы, перечисленные ниже, были приготовлены в концентрации 50 нг/мл в буферах для разведения стандарта RD5-26 и были проанализированы на перекрестную реактивность. Приготовленные нижеперечисленные факторы в концентрации 50 нг/мл в среднем диапазоне контролей были проанализированы на интерференцию. Не обнаружено значительной перекрестной реактивности, за исключением PDGF-подобных белков, как указано. Интерференция не была обнаружена ни для одного из протестированных веществ.

Рекомбинантные, человека:

- IL-1α
- IL-1β
- Pro-IL-1β
- IL-1F5
- IL-1F6
- IL-1F7
- IL-1F8
- IL-1F9
- IL-1F10
- IL-1ra
- IL-1 RI

- IL-1 RII
- IL-1 R AcP
- IL-1 RAPL1
- IL-1 RAPL2
- IL-1 Rrp2
- IL-18
- IL-18 Rβ
- IL-33
- Pro-IL-33
- Integrin αM/CD11b
- SIGIRR
- Siglec-2/CD22

Рекомбинантные, мышинные:

- IL-33
- Pro-IL-33
- ST2

ЛИТЕРАТУРА

(См. Оригинал инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

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