



Набор ИФА для определения человеческого интерлейкина (IL-2)

Кат. № : IL02001
Количество : 96
Производитель : Origenium (Финляндия)

Версия 2.10

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

ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА интерлейкин-2 (IL-2) компании «Орджениум Лабораториз» является ферментосвязанным иммуносорбентным анализом для количественного определения человеческого IL-2 в супернатантах культуры клеток, плазме (гепариновой или цитратной) и сыворотке. Анализ определяет как природный, так и рекомбинантный человеческий IL-2.

2. ВВЕДЕНИЕ

IL-2 является гликопротеидом размером 15 кДа, закодированный единственным геном, расположенным в области q26-28 человеческой хромосомы 4. IL-2 вырабатывается Th1 клетками. Это стимулятор T, NK и B-лимфоцитарного роста и дифференцирования, очень напоминает IL-15. Было продемонстрировано, что IL-2 стимулирует рост и дифференциацию B-лимфоцитов, естественных клеток-убийц (NK), лимфокинактированных клеток-киллеров (LAK-клеток), моноцитов/макрофагов и олигодендроцитов. Определение уровней IL-2 в сыворотке обеспечивает более детальную способность проникновения в суть нескольких патологических случаев, таких как рак, инфекционные болезни, отторжение трансплантата, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, системная красная волчанка и диабет 1 типа.

Настоящий набор является ферментосвязанным иммуносорбентным анализом *in vitro* для количественного определения человеческого IL-2 в супернатантах культуры клеток, плазме, сыворотке и моче. Этот анализ использует антитело, свойственное для человеческого IL-2, нанесенное на 96-луночный планшет. Стандарты, образцы и биотинилированный анти-человеческий IL-2 каплются в лунки и IL-2, присутствующий в образце, захватывается антителом, иммобилизованным на лунках и биотинилированным IL-2 специфическим обнаруживающим антителом. После вымывания несвязанного биотинилированного антитела, капается в лунки стрептавидин, конъюгированный пероксидазой хрена. Лунки промываются снова. После этого второго этапа промывки в лунки добавляется раствор субстрата ТМБ, что ведет к развитию цвета, который пропорционален количеству связанного IL-2. Стоп-раствор изменяет цвет из синего на желтый, и интенсивность цвета измеряется при 450 нм.

3. СОСТАВ НАБОРА

Компоненты набора	Количество/Объем
96-луночный планшет с 12 стрипами Делимые микротирационные стрипы для анализа, каждый с антителом IL-2, нанесенным на отдельные лунки.	1 рамка
Стандарт (готовый к использованию) Лиофилизированный и стабилизированный рекомбинант человеческого IL-2 (исходную концентрацию см. на этикетке). Перед использованием добавить 1 мл "Разбавителя Образца".	2x1 мл
Раствор биотинилированного антитела IL-2. Готов к использованию.	10 мл
Авидин, конъюгированный пероксидазой хрена. Готов к использованию.	12 мл
20x концентрат промывочного раствора (достаточно для 1000 мл). Разбавить 1:20	50 мл
Разбавитель образца. Готов к использованию.	100 мл
Стоп-раствор. 0,9N H ₂ SO ₄	8 мл
Субстрат ТМБ. Готов к использованию	8 мл

4. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагент	Хранение	Стабильность
96-луночный планшет с 12 стрипами. Делимые микротирационные стрипы для анализа с 8 отдельными лунки, покрытыми антителом	Хранить при 2-8°C в закрытом мешочке из фольги с осушителями. Неиспользуемые стрипы должны храниться в запечатывающемся герметичном и влагозащитном мешочке из фольги!	3 месяца после вскрытия
Лиофилизированный стандарт	Хранить при 2-8°C.	До истечения срока годности в лиофилизированном виде. По крайней мере 3 недели после разбавления разбавителем образца.
Раствор биотинилированного антитела. Готов к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники!)</i>	3 месяца после вскрытия
Авидин, конъюгированный пероксидазой хрена. Готов к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники!)</i>	3 месяца после вскрытия
Разбавитель образца	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники или пипетки!)</i>	3 месяца после вскрытия
20x концентрат промывочного буфера. Разбавленный промывочный буфер	Хранить при комнатной температуре. 1x рабочее разбавление. <i>Бутылки, используемые для рабочего разбавления, должны регулярно промываться. Уничтожить мутные растворы</i>	До истечения срока годности при комнатной температуре. 3 рабочих дня при комнатной температуре или 2 недели при +4°C.
Раствор ТМБ-субстрата	Раствор готов для использования, при 2-8°C, защищая от света. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники или пипетки!)</i>	До истечения срока годности.
Стоп-раствор	Хранить при комнатной температуре.	До истечения срока годности при комнатной температуре.

5. ДОПОЛНИТЕЛЬНО ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер для измерения абсорбции при 450 нм.
- Точные пипетки для внесения объемов от 2 мкл до 1 мл.
- Многоканальная пипетка (от 25 – 350 мкл).
- Мерные колбы на 100 мл и 1 л.
- Промокательная бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Логарифмическая графопостроительная бумага или ПК с ПО для анализа данных ИФА.
- Пробирки для подготовки стандарта или разбавлений образца.

6. ОБЪЕМЫ РЕАГЕНТОВ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

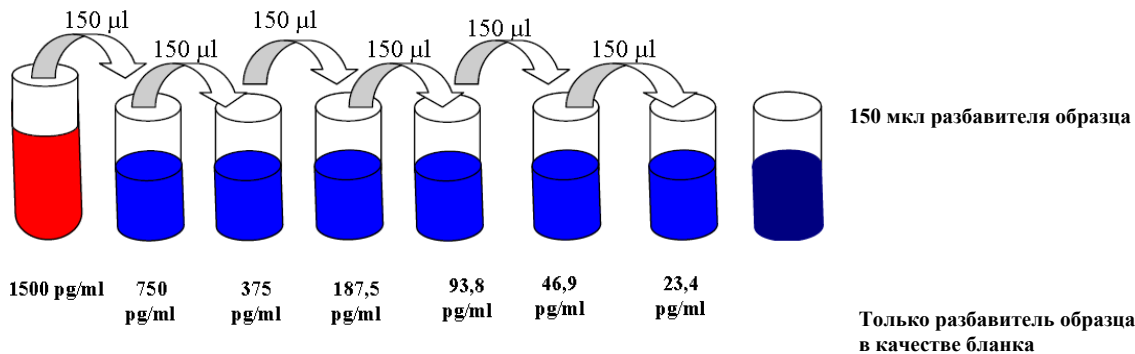
Реагенты					
К-во используемых стрипов (каждый на 8 лунок)	Биотинилированное антитело 50 мкл/лунку	Авидин-пероксидаза хрена 100 мкл/лунку	Субстрат ТМБ 50 мкл/лунку	Стоп-раствор 25 мкл/лунку	Промывочный буфер 300 мкл/лунку
1 (8 лунок)	500 мкл	900 мкл	500 мкл	300 мкл	30 мл
2 (16 лунок)	1 мл	1,8 мл	1 мл	600 мкл	55 мл
4 (32 лунок)	2 мл	3,6 мл	2 мл	1,2 мл	110 мл
6 (48 лунок)	3 мл	5,4 мл	3 мл	1,8 мл	165 мл
8 (64 лунок)	4 мл	7,2 мл	4 мл	2,4 мл	220 мл
12 (96 лунок)	6 мл	11 мл	6 мл	4 мл	350 мл

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ

1. Перед использованием привести все реагенты и образцы к комнатной температуре (18-25°C).
2. **Планшет, покрытый антителами:** До вскрытия мешочка из фольги определить количество стрипов, необходимых для исследования требуемого количества образцов, плюс 16 лунок, необходимых для стандартов и бланков в дубле. Удалить неиспользуемые стрипы из рамки планшета и вернуть их в мешочек, содержащий осушитель, на хранение до 1 месяца при 2-8°C.
3. **Разбавление стандарта для исследования:** Растворить лиофилизированный стандарт IL-2 1 мл "Разбавителя Образца", чтобы получить 3000 пг/мл концентрацию исходного стандарта IL-2. Стандарт IL-2 стабилен по крайней мере 3 недели после растворения.

Для получения калибровочной кривой проводят разбавления следующим образом:

- Добавить **150 мкл** разбавителя образца в пробирку 1.
- Добавить **150 мкл** разбавителя образца в пробирки 2 - 7. Всего 6 пробирок для разбавления.
- Добавить **150 мкл** разбавителя образца в пробирку 8 и использовать ее в качестве **бланка** [контрольной пробы] (0 пг/мл).
- Взять с пробирки набора стандарта, содержащей 3000 пг/мл IL-2, **150 мкл** стандарта IL-2, и раскатать в пробирку стандарта 1, чтобы получить **1500 пг/мл в первой пробирке**.
- Взять **150 мкл** из первой пробирки (1500 пг/мл) и начать 2-кратные последовательные разбавления в пробирках для разбавления (с 2 по 7) как изображено на рисунке, перемешивая несколько раз пипеткой в каждой пробирке (всего 7 пробирок для разбавления).
- **150 мкл** разбавителя образца служит как нулевой стандарт (0 пг/мл) в пробирке 8.



4. **Подготовка образца и разбавление:** Разбавитель образца используется для разбавления всех образцов (сыворотки/плазмы, культуры супернатантов и мочи), требующих разбавления. Хранить и разбавлять все образцы в пробирках или планшетах, изготовленных из материала с низкой связывающей поверхностью, типа полипропилена. Перед началом анализа замороженные образцы нужно как можно быстрее разморозить в водопроводной воде (18-25°C). Для этой цели не использовать 37°C или 56°C водяную баню.

Подготовка образца и разбавление: Разбавитель образца используется для разбавления образцов сыворотки/плазмы, культуры супернатантов и образцов мочи, требующих разбавления. Хранить и разбавлять все образцы в пробирках или планшетах, сделанных из материала с низкой связывающей поверхностью.

Разбавление образцов: В начальном скрининге разбавление образцов не требуется. Образцы, которые превышают диапазон измерений, должны быть разбавлены 1:2 или 1:5 разбавителем образца и измерены снова. Образцы со значениями меры поглощения света > 1.900 могут быть последовательно разбавлены 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 разбавителем образца. При вычислении результатов должен быть принят во внимание коэффициент разбавления. Сыворотка, ЭДТА-антикоагулирующие плазмы, цереброспинальная жидкость и жидкости культур подходят для использования в настоящем анализе (**предостережение:** отделить плазму/сыворотку и клетки крови в пределах 4 часов после сбора. Неотделенные образцы должны храниться при температуре от 2 до 8°C). Не использовать чрезвычайно гемолизированные или липемические образцы. Если образцы должны анализироваться в пределах 24 часов, они могут храниться при 2-8°C; иначе образцы должны храниться замороженными (между -18 и -32°C, предпочтительно < -70°C). Необходимо избегать неоднократных циклов замораживания/замораживания.

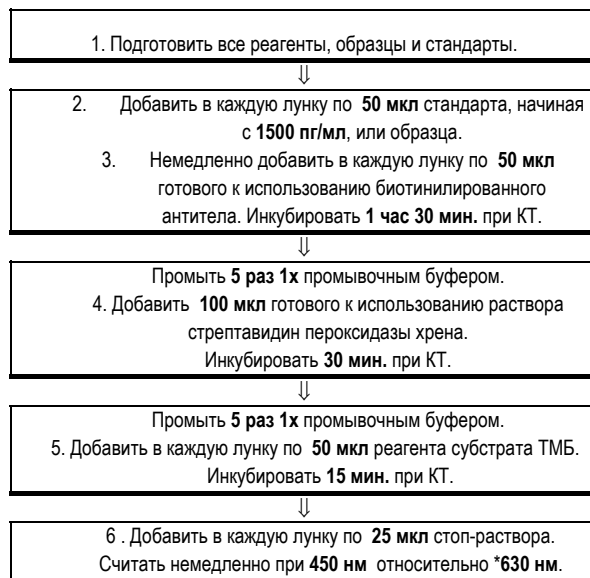
5. **Промывочный буфер:** Если 20x концентрированный промывочный буфер содержит видимые кристаллы, нагреть его при 37°C и осторожно перемешать до растворения. Разбавить 25 мл концентрата промывочного раствора деионизированной или дистиллированной водой, чтобы получить 500 мл 1x промывочного буфера.

6. Перед использованием осторожно перемешать вортексом раствор **биотинилированных антител**.

7. Перед использованием осторожно перемешать **меченный пероксидазой авидин**.

Предостережение: субстрат ТМБ (тетрамтилбензидин) и стоп-раствор (H₂SO₄) токсичны и едкие и должны использоваться с осторожностью. Во время применения использовать перчатки.

8. СХЕМА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА



*Рекомендуется проводить корректировку оптических неточностей в микропланшетах, отнимая $A_{630\text{нм}}$, но не в качестве обязательной процедуры.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

(См. в оригинале инструкции на стр. 10).

9. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ / ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Компоненты набора должны храниться в холодильнике и/или не используются. Все реагенты должны быть нагреты до комнатной температуры перед использованием.
- Перед вскрытием мешков из фольги микротитрационным планшетам нужно позволить достичь комнатной температуры.
- Как только было извлечено желаемое количество стрипов, немедленно герметично закрыть мешочек и хранить при 2 - 8°C, чтобы сохранить целостность планшета. Защищать от влажности.
- Образцы должны быть собраны в пробирки не содержащие пирогена/эндотоксина.
- Образцы должны быть заморожены если не анализируются вскоре после сбора. Избегать многократных циклов размораживания/замораживания образцов. Полностью разморозить и хорошо перемешать перед анализом.
- Когда возможно избегать использования чрезмерно гемолизованных или липемических сывороток. Если присутствует большое количество макрочастиц, центрифугировать или фильтровать перед анализом.
- Рекомендуется, чтобы все стандарты, контроли и образцы использовались в двойном экземпляре.
- Образцы, которые составляют > 1500 пг/мл, должны быть разбавлены буфером разбавителя образца.
- При капании реагентов из пипетки сохранять последовательный порядок переноса из лунки в лунку. Это обеспечивает одинаковое время инкубации для всех лунок.
- Накрывать или закрыть все неиспользуемые реагенты.
- Не использовать реагенты по истечении срока годности набора.
- Считать абсорбции в пределах 20 минут после завершения анализа.
- Внутренние контроли должны применяться в каждом анализе. Если значения контролей вне предустановленных диапазонов - точность пробирного анализа под сомнением.
- Все остатки промывочной жидкости должны высушиваться в лунках достаточной аспирацией или декантацией, сопровождаемой постукиванием с усилием планшетом о промокательную бумагу. **Никогда** не вставлять промокательную бумагу непосредственно в лунку.
- Поскольку хромоген ТМБ высокочувствителен, избегать длительного контакта со светом. Также избегать контакта между стабилизированным хромогеном и металлом, иначе может развиваться цвет.

10. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Перед использованием привести все реагенты и образцы к комнатной температуре (18 - 25°C). Рекомендуется, чтобы все стандарты и образцы применялись по крайней мере в двойном экземпляре. Оставить некоторые лунки в качестве реагента бланка (от 2 до 4 лунок).

ПЕРВЫЙ ШАГ: СТАНДАРТ, ОБРАЗЦЫ И БЛАНК+БИОТИНИЛИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО

2. Раскапать в соответствующие лунки по 50 мкл образца и 50 мкл каждого разбавленного стандарта, начиная с 1500 пг/мл (более детально см. стр. 7).

3. Добавить по 50 мкл биотинилированного обнаруживающего антитела во все лунки, содержащие стандарты и образцы (общий реакционный объем = 100 мкл). Осторожно постучать по планшету, чтобы гомогенизировать смесь.

4. Инкубировать при комнатной температуре 1 час 30 мин. без встряхивания.

5. Промыть 5 раз 1х промывочным раствором (по 300 мкл на каждую лунку).

Для промывки: Удалить содержимое планшета. Использовать многоканальную пипетку, чтобы заполнить каждую лунку 300 мкл промывочного буфера, затем удалить содержимое планшета. Повторить процедуру еще 4 раза, чтобы в сумме получилось **ПЯТЬ** промывок. Осторожно стукнуть планшетом о бумажные полотенца или другой гигроскопичный материал. **Внимание:** Для автоматизированной промывки аспирировать все лунки и промыть 5 раз промывочным буфером. Стукнуть планшетом о бумажные полотенца или другой гигроскопичный материал. **Никогда** не позволять реакционным лункам высохнуть. Продолжить следующий этап без задержки или прерывания.

ВТОРОЙ ШАГ: СТРЕПТАВИДИН-ПЕРОКСИДАЗА ХРЕНА

6. Добавить в каждую лунку по 100 мкл подготовленного раствора стрептавидин-пероксидазы хрена (готовый к использованию). Инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре.

7. Промыть 5 раз 1х промывочным раствором (300 мкл на каждую лунку).

ТРЕТИЙ ШАГ: СУБСТРАТ ТМБ

8. Добавить в каждую лунку по 50 мкл готового к использованию реагента субстрата. Инкубировать в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте.

ЧЕТВЕРТЫЙ ШАГ: ОСТАНОВКА РЕАКЦИИ

9. Добавить в каждую лунку по 25 мкл стоп-раствора. Считать при 450 нм в пределах 15 минут.

ПЯТЫЙ ШАГ: СЧИТЫВАНИЕ И ВЫЧИСЛЕНИЕ

10. Вычислить среднее из значений абсорбции реагента бланка и вычитать от всего значений исследуемых лунок (стандарта и образцов). Среднее значение реагента бланка должно быть меньше 0.200

11. Вычислить результаты относительно стандарта.

11. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Калибровочная кривая должна быть определена индивидуально для каждого эксперимента. Исправьте каждое значение меры поглощения света всех стандартов, вычитая ОП значения реагента бланка (Бл = только разбавитель образца). Вычислить из дубликатов среднее значение абсорбции каждого стандарта.

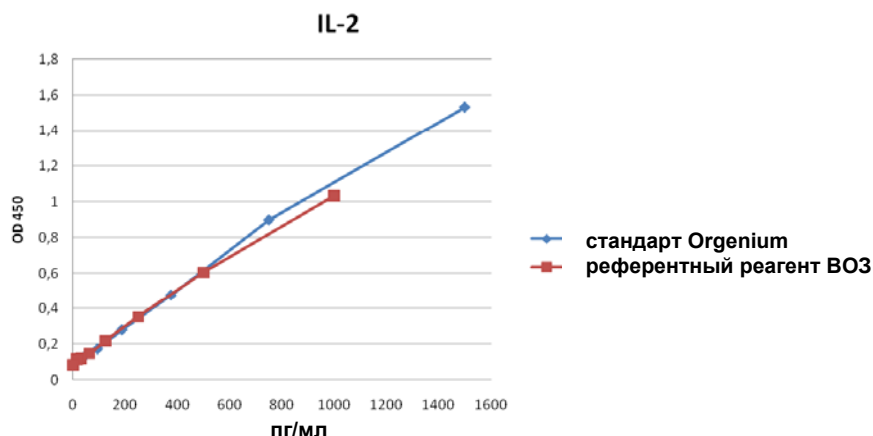
Калибровочная кривая используется, чтобы определить количество IL-2 в неизвестном образце. Калибровочная кривая производится изображением средней ОП (450 нм), полученной для каждой из концентраций стандартов на вертикальной (Y) оси против соответствующей концентрации IL-2 (пг/мл) на горизонтальной (X) оси.

Создать калибровочную кривую, используя миллиметровку или статистическое программное обеспечение.

Если образцы производят значения выше чем самый высокий стандарт, разбавить образцы разбавителем образца и повторить анализ. Концентрация, полученная из калибровочной кривой должна быть умножена на коэффициент разбавления.

12. ТИПИЧНЫЕ ДАННЫЕ

Следующие данные были получены для различных стандартов IL-2 в диапазоне от 0 до 1500 пг/мл.



13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

IL-2	
Диапазон анализа	0-1500 пг/мл
Точки калибровочной кривой	1500, 750, 375, 187,5, 93,8, 46,9, 23,4, 0 пг/мл.
Точность в анализе	<7%
Точность между анализами	<10%
Точность между сериями	<10%
Перекрестная реактивность	Перекрестной реактивности не наблюдалось в следующий рекомбинантах белков человека: IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, TNF α , тимус и регулируемый активацией хемокин (TARC)
Интерференции	Отсутствуют интерференции к билирубину до 0.3 мг/мл, гемоглобину до 8.0 мг/мл и триглицеридам до 5.0 мг/мл.
Специфичность	Отличает и природный и рекомбинантный человеческий IL-2.
Чувствительность	<15 пг/мл.

15. ОБНАРУЖЕНИЕ И УСТРАНЕНИЕ ТРУДНОСТЕЙ

Проблема	Причина	Решение
Некачественная калибровочная кривая	1. Неточное капанье или ошибка капанья. 2. Неправильное разбавление стандарта	Проверять пипетки и регулярно калибровать. Перемешать вортексом состав перед использованием и осторожно разбавить в пробирке Эппендорфа.
Слабый сигнал	1. Инкубация короче рекомендуемой. 2. Несоответствующие объемы реагента, неправильное разбавление или ошибка капанья.	Убедиться в достаточности времени инкубации. Проверить пипетки и убедиться в правильности их работы.
Большой КВ	Неправильное капанье и высушивание лунок в течении процедуры анализа.	Проверить пипетки. Немедленно заполнить лунки промывочным буфером и реагентами.
Высокий фон	1. Недостаточная промывка планшета. 2. Загрязненный промывочный буфер. 3. Объем промывочного буфера меньше рекомендуемого.	Посмотреть руководство по правильности промывки. При использовании планшетного промывателя проверить открытость и чистоту всех проточных путей. Приготовить новый промывочный буфер. Использовать 300 мкл/лунку.
Низкая чувствительность	1. Неправильное хранение набора ИФА. 2. Стоп-раствор. 3. Загрязнение реагентов.	Хранить компоненты набора для исследования следуя рекомендациям настоящего руководства пользователя. Защищать раствор субстрата от света. Стоп-раствор должен добавляться в каждую лунку перед измерением. Использовать чистые стерильные наконечники. Удалить загрязненные реагенты.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

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