



Набор ИФА для определения человеческого ФНО-альфа (TNF- α)

Кат. № : TNFa021
Количество : 96
Производитель : Origenium (Финляндия)

Версия 02.10

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

ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА ФНО-альфа (TNF- α) компании «Ордженум Лабораториз» является ферментосвязанным иммуносорбентным анализом для количественного определения человеческого ФНО-альфа в супернатантах культуры клеток, плазме (ЭДТА, гепариновой или цитратной), сыворотке, цереброспинальной жидкости, моче, синовиальная жидкость или других жидкостях тела. Анализ определяет как природный, так и рекомбинантный человеческий ФНО-альфа.

2. ВВЕДЕНИЕ

Настоящий набор является ферментосвязанным иммуносорбентным анализом *in vitro* для количественного определения человеческого ФНО-альфа в супернатантах культуры клеток, плазме (ЭДТА, гепариновой или цитратной), сыворотке, цереброспинальной жидкости, моче, синовиальной жидкости или других жидкостях тела. Этот анализ использует антитело, свойственное для человеческого ФНО-альфа, нанесенное на 96-луночный планшет. Стандарты, образцы и биотинилированный анти-человеческий ФНО-альфа каплются в лунки и ФНО-альфа, присутствующий в образце, захватывается антителом, иммобилизованным на лунках и биотинилированным ФНО-альфа 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 ФНО-альфа. 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 ФНО-альфа, нанесенным на отдельные лунки. Готовый к использованию.	1 рамка
Стандарт ФНО-альфа 4000 пг/мл Лиофилизированный и стабилизированный рекомбинант человеческого ФНО-альфа. Перед использованием добавить 0,9 мл «Разбавителя образца».	4 x 0,9 мл
Раствор биотинилированных антител ФНО-альфа 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
Буфер для разбавления Готов к использованию.	100 мл
Стоп-раствор 0,9N H ₂ SO ₄ . Готов к использованию.	8 мл
Субстрат ТМБ Готов к использованию.	8 мл
Сертификат контроля качества	1

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
Стандарт ФНО-альфа. Лиофилизированный.	Хранить при 2-8°C.	До истечения срока годности в лиофилизированном виде. Нестабилен. Использовать сразу после растворения. После растворения держать на льду в течение 1 часа.
Раствор биотинилированных антител. 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. Готов к использованию.	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. 1 неделя при комнатной температуре или 1 месяц при 2 - 8°C.

Раствор ТМБ-субстрата. Готов к использованию.	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 (указан на флаконе).
Стоп-раствор. Готов к использованию.	Хранить при комнатной температуре. Также может храниться 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).
- Регулируемая пипетка 1-25 мл для подготовки реагентов.
- Мерный цилиндр 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.
- Таймер

6. ОБЪЕМЫ РЕАГЕНТОВ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

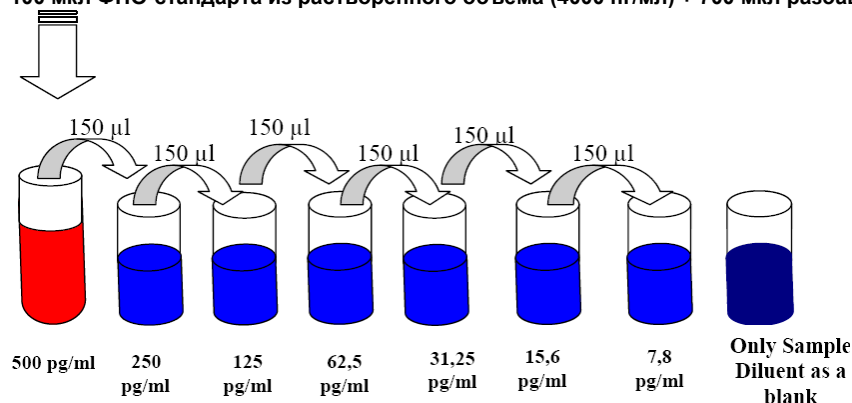
Реагенты					
К-во используемых стрипов (каждый на 8 лунок)	Биотинилированные антитела 50 мкл/лунку	Авидин-пероксидаза хрена 50 мкл/лунку	Субстрат ТМБ 50 мкл/лунку	Стоп-раствор 25 мкл/лунку	Промывочный буфер 300 мкл/лунку
1 (8 лунок)	500 мкл	500 мкл	500 мкл	300 мкл	30 мл
2 (16 лунок)	1 мл	1 мл	1 мл	600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

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ

Примечание: Перед использованием привести все реагенты и образцы к комнатной температуре (18-25°C).

- 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 3 месяцев при 2-8°C.
- Разбавление стандарта для исследования:** Растворить лиофилизированный стандарт ФНО-альфа 0,9 мг "Разбавителя образца". Стандарт ФНО-альфа нестабилен после растворения. Использовать сразу или хранить на льду в течение 1 часа после растворения, если не используется. Для получения стандартной кривой разбавлять его следующим образом:
 - Добавить **100 мкл** стандарта ФНО-альфа, который содержит 4000 пг/мл ФНО-альфа и 700 мкл разбавителя образца в пробирку 1, чтобы получить концентрацию ФНО-альфа 500 пг/мл (пробирка стандарта 1).
 - Добавить **150 мкл** разбавителя образца в другие 6 пробирок. Взять 150 мкл из 1 пробирки (500 пг/мл) и начать 2-кратные последовательные разбавления в пробирках для разбавления как описано на рисунке путем перемешивания несколько раз пипеткой в каждой пробирке (всего 7 пробирок для разбавления).
 - Разбавитель образца в пробирке 8 служит в качестве нулевого стандарта (0 нг/мл).

100 мкл ФНО-стандарта из растворенного объема (4000 пг/мл) + 700 мкл разбавителя образца



- Подготовка и разбавление образца:** Не требуется разбавление образцов при первичном скрининге. Образцы, которые превышают диапазон измерений, должны быть разбавлены последовательно 1:2, 1:4 или больше если необходимо, а измерение должно быть проведено повторно. При вычислении результатов должен быть принят во внимание коэффициент разбавления. Разбавлять и хранить все образцы в пробирках или планшетах из материала с низкой связывающей способностью, такого как полипропилен.
- Сбор и хранение образцов:** Сыворотка, ЭДТА, гепариновая или цитратная антикоагулирующие плазмы, цереброспинальная жидкость, моча, синовиальная жидкость или другие жидкости тела 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). До 3 циклов замораживания/размораживания не влияют на уровни ФНО-альфа в образцах. Тем не менее, необходимо избегать неоднократных циклов замораживания/замораживания. Перед анализом замороженные образцы необходимо разморозить как можно скорее под проточной водой (18-25°C), не использовать для этих процедур водяную баню 37°C или 56°C.

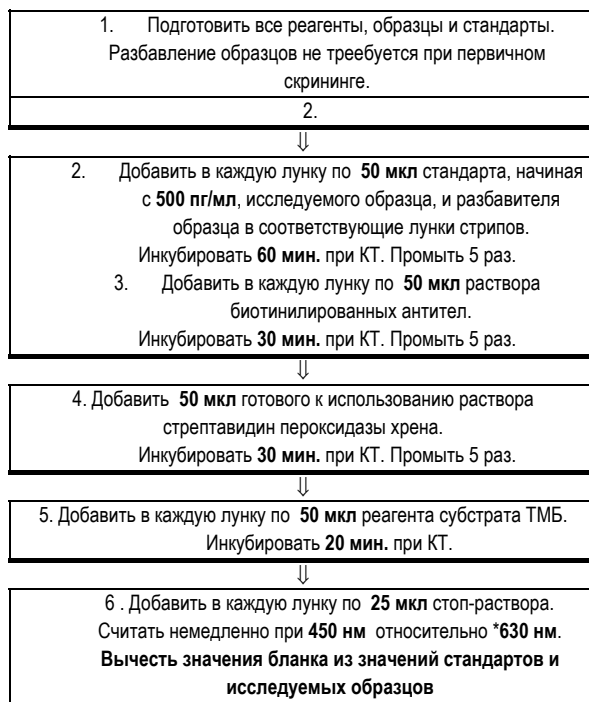
5. Подготовка реагентов:

а. **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. Проверить уровень pH разбавленного промывочного буфера и довести при необходимости до 7.4.

б. Перед использованием осторожно перемешать вортесом раствор **биотинилированных антител**.

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

Предостережение: субстрат ТМБ (тетраметилбензидин) и стоп-раствор (H_2SO_4) 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_{630nm} , но не в качестве обязательной процедуры.

9. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ / ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Компоненты набора должны храниться в холодильнике если 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 гемолизированных 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+РАСТВОР БИОТИНИЛИРОВАННЫХ АНТИТЕЛ

2. Раскапать в соответствующие лунки по 50 мкл образца и 50 мкл каждого разбавленного стандарта, начиная с 500 пг/мл (более детально см. стр. 7). Раскапать по 50 мкл разбавителя образца в лунки, которые будут использоваться в качестве контрольной пробы. Инкубировать 1 час при комнатной температуре без встряхивания.

ВТОРОЙ ШАГ: РАСТВОР БИОТИНИЛИРОВАННЫХ АНТИТЕЛ

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

Для ручной промывки: Удалить содержимое планшета. Использовать многоканальную пипетку, чтобы заполнить каждую лунку 300 мкл разбавленного промывочного буфера, затем удалить содержимое планшета. Повторить процедуру еще 4 раза, чтобы в сумме получилось

ПЯТЬ промывок. Осторожно постучать планшетом о бумажные полотенца или другой гигроскопичный материал. Никогда не позволять высохнуть реакционным лункам. Перейти к следующему этапу без задержки или прерывания.

Для автоматической промывки: Провести аспирацию всех лунок и промыть 5 раз с 300 мкл разбавленным промывочным буфером. Осторожно постучать планшетом о бумажные полотенца или другой гигроскопичный материал. Никогда не позволять высохнуть реакционным лункам. Перейти к следующему этапу без задержки или прерывания.

4. Быстро добавить во все лунки по 50 мкл зеленого раствора биотинилированных обнаруживающих антител ФНО-альфа. Осторожно постучать о планшет рукой, чтобы гомогенизировать смесь. Стараться не прикасаться к реакционным лункам наконечником пипетки. Инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут без встряхивания.

ТРЕТИЙ ШАГ: КОНЪЮГИРОВАННЫЙ ПЕРОКСИДАЗОЙ ХРЕНА АВИДИН

5. Промыть 5 раз 1х промывочным раствором как описано в шаге 3.

Добавить в каждую лунку по 50 мкл готового к использованию раствора конъюгированного пероксидазой авидина. Инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте.

ЧЕТВЕРТЫЙ ШАГ: СУБСТРАТ ТМБ

6. Промыть 5 раз как описано в шаге 3.

7. Используя многоканальную пипетку, быстро добавить в каждую лунку по 50 мкл готового к использованию субстрат реагента ТМБ. Инкубировать 20 минут при комнатной температуре в темном месте.

8. 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 ФНО-альфа в неизвестном образце. Калибровочная кривая производится изображением средней ОП (450 нм), полученной для каждой из концентраций стандартов на вертикальной (Y) оси против соответствующей концентрации ФНО-альфа (пг/мл) на горизонтальной (X) оси.

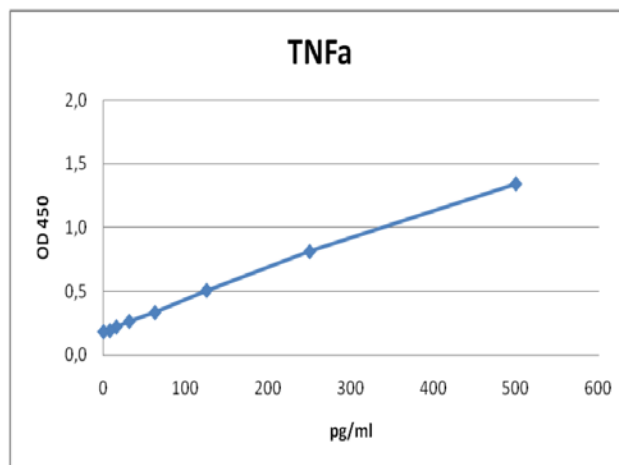
Создать калибровочную кривую, используя миллиметровку или статистическое программное обеспечение.

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 ФНО-альфа в диапазоне от 0 до 500 пг/мл.

Внимание: кривая приводится только для иллюстрации. Калибровочная кривая должна строиться каждый раз при проведении исследования.



13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

	ФНО-альфа
Диапазон анализа	0-500 пг/мл
Точки калибровочной кривой	500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,8 и 0 пг/мл.
Точность в анализе	≤6%
Точность между анализами	≤4%
Точность между сериями	≤8%
Перекрестная реактивность	Перекрестной реактивности не наблюдалось в следующий рекомбинантах белков человека: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, тимус и регулируемом активацией хемокине (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 ФНО-альфа.
Чувствительность	<7 пг/мл

15. ОБНАРУЖЕНИЕ И УСТРАНЕНИЕ ТРУДНОСТЕЙ

Проблема	Причина	Решение
Некачественная калибровочная кривая	1. Неточное капанье или ошибка капанья. 2. Неправильное разбавление стандарта. 3. Бактериологическое загрязнение реагентов.	Проверить 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