

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАСПАЗЫ-8 ЧЕЛОВЕКА

BMS2024/BMS2024TEN, Human Caspase-8 Platinum ELISA

Каталог. №: **BMS2024/BMS2024TEN**
Количество : **96, 10x96**
Производитель: **Bender MedSystems
GmbH, (Австрия)**

Методика от **17-09-2012**
Версия **23**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данный набор предназначен для количественного определения Каспазы-8 человека. **Набор предназначен только для исследований и не должен использоваться в диагностических или терапевтических целях.**

2. ВВЕДЕНИЕ

См. инструкцию на английском языке.

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

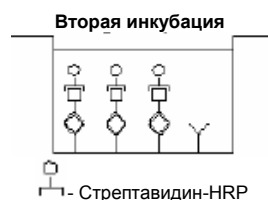
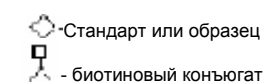
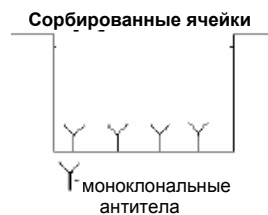
Античеловеческие антитела, покрытые Каспаза-8, сорбированы в ячейках планшета.

Человеческая Каспаза-8 в образце или стандарте связывается с антителами в ячейках планшета. Поликлональные антитела обнаружения (кролик) связывают Каспаза-8, захваченный первыми антителами.

После инкубации из ячеек удаляются не связавшиеся антитела обнаружения, и в ячейки добавляется Анти-кролик-IgG-HRP, который связывается с Антителом обнаружения.

После второй инкубации и промывки из ячеек удаляются не связавшийся Анти-кролик-IgG-HRP, и в ячейки добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора.

Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации Каспаза-8, присутствующего в образцах. Концентрация Каспаза-8 в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта.



4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты в наборе Человеческий Каспаза-8 ELISA BMS2024 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому Каспаза-8	1 планшет
Антитело обнаружения поликлональных анти-Каспаза-8 антител, 100 мкл	1 флакон
Анти-кролик-IgG-HRP, 10 мкл	1 флакон
Стандарт, лиофилизированный, 20.00 нг/мл	2 флакона
Разбавитель образцов, 12 мл	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
Лизирующий буфер 10x, 15 мл	1 бутылка
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	1 флакон
Стоп-раствор (1M фосфорная кислота), 15 мл	1 флакон
Голубой краситель, 0,4 мл	1 флакон
Зелёный краситель, 0,4 мл	1 флакон
Красный краситель, 0,4 мл	1 флакон
Плётки для заклеивания стрипов	4

4.2 Реагенты в наборе Человеческий Каспаза-8 ELISA BMS2024TEN (10 x 96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому Каспаза-8	10 планшетов
Антитело обнаружения поликлональных анти-Каспаза-8 антител, 100 мкл	10 флаконов
Анти-кролик-IgG-HRP, 10 мкл	10 флаконов
Стандарт, лиофилизированный, 20.00 нг/мл	10 флаконов
Разбавитель образцов, 12 мл	10 флаконов
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
Лизирующий буфер 10x, 15 мл	10 бутылок
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	10 флаконов
Стоп-раствор (1M фосфорная кислота), 15 мл	10 флаконов
Голубой краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Зелёный краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Красный 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. Сразу после использования верните реагенты в холодильник. Храните до даты, указанной на упаковке реагентов.

Только при соответствующем хранении и исключении контаминации во время предыдущего использования набора гарантируется качественная работа реагентов.

6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Супернатант культуры клеток, сыворотка, плазма (ЭДТК, гепариновая) и околоплодные 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
- Статистический калькулятор или 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 кислоты, 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 кислоты, 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 Рабочий буфер при 2-8 °C. Рабочий буфер 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 Лизирующий буфер

Налить все содержимое (15 мл) Концентрата Лизирующего буфера (10x) в чистый 150 мл градуированный цилиндр. Довести до конечного объема 150 мл дистиллированной водой и аккуратно перемешать. Хранить при комнатной температуре. Обратите внимание, что Лизирующий буфер (1x) стабилен в течение 30 дней.

9.4 Антитела обнаружения

Пожалуйста, обратите внимание, что Антитела обнаружения следует использовать в течение 30 минут после разведения. Провести 1:100 разбавление концентрированного раствора Антител обнаружения Рабочим буфером (1x) в чистой пластиковой пробирке в соответствии со следующей таблицей:

Кол-во стрипов	Антитела обнаружения (мл)	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0.03	2.97
1-12	0.06	5.94

9.5 Anti-Кролик-IgG-HRP

Пожалуйста, обратите внимание, что Anti-Кролик-IgG-HRP следует использовать в течение 30 минут после разведения. Провести 1:2000 разбавление концентрированного раствора Anti-Кролик-IgG-HRP с Рабочим буфером (1x) в чистой пластиковой пробирке в соответствии со следующей таблицей:

Кол-во стрипов	Anti-Кролик-IgG-HRP (мл)	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0.003	6.000
1-12	0.006	12.000

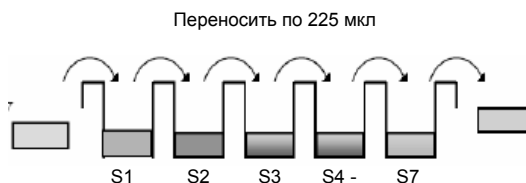
9.6 Стандарт человеческого гена Каспаза-8

Растворите Стандарт Каспаза-8 в дистиллированной воде. Необходимый объем для растворения указан на этикетке флакона, содержащего стандарт. Осторожно перемешивайте до полного растворения. Конечная концентрация полученного раствора составит 20.00 нг/мл. Оставить стандарт для восстановления на 10-30 минут. Хорошо перемешать перед разведениями. После использования оставшийся стандарт не может храниться и должен быть выброшен.

Разведения стандарта могут производиться непосредственно на планшете (см. пункт 10d) или альтернативно в пробирках (см. Пункт 9.6.1)

9.6.1 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=20.00 нг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1=10.00 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.



Восстановленный Стандарт Человеческого Каспаза-8 Разбавитель образцов 225 мкл Удалить 225 мкл

9.7 Добавление окрашивающих реагентов: голубого, зеленого и красного

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. Антитела обнаружения: перед разбавлением концентрата Антитела обнаружения 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

3. Anti-Кролик-IgG-HRP: перед разбавлением концентрата Anti-Кролик-IgG-HRP добавьте **красный краситель** в соотношении 1:250 (смотри таблицу) к Рабочему буферу, используемому для разбавления конъюгата, окрашенный Anti-Кролик-IgG-HRP используйте согласно инструкции.

6 мл Рабочего буфера (1 x)	24 мкл Красного красителя
12 мл Рабочего буфера (1 x)	48 мкл Красного красителя

10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

а. Для лизиса клеток следовать протоколу клеточного лизата: Многочисленные протоколы экстракции могут быть использованы. Следующий протокол представляется в качестве примера подходящей процедуры экстракции, но не должен быть обязательным методом выбора. Пользователи могут экспериментировать с процедурами экстракции, с которыми они знакомы лучше.

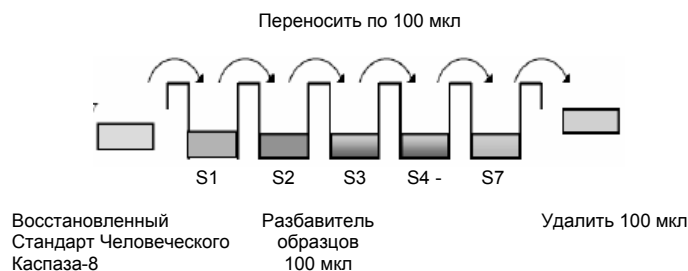
Для клеток суспензии: гранулировать путем центрифугирования, удалить супернатант и приступить к добавлению лизирующего буфера.

Для прикрепленных клеток: Отделить супернатант от клеток, промыть клетки один раз с PBS, собрать клетки путем соскоба и легкого центрифугирования, аспирировать PBS, оставляя нетронутыми гранулы клеток (в этот момент гранулы клеток могут быть заморожены при -80 °С и лизированы позднее) и перейти к Добавлению Лизирующего буфера.

Добавление Лизирующего буфера: Ресуспендировать гранулы в Лизирующем буфере (1x) (мы рекомендуем концентрацию 5 x10 клеток/мл), инкубировать 60 минут при комнатной температуре при осторожном встряхивании, переместить экстракты в микроцентрифужные пробирки и центрифугировать при 1000xg в течение 15 минут. Аликвотировать очищенный лизат для очистки микроцентрифужных пробирок и продолжать процедуру тестирования (Альтернативно лизаты можно хранить при -80 °С и анализировать позже).

- b. Образцы, содержащие более 20.00 нг/мл человеческого Каспазы-8, должны быть разбавлены разбавителем образцов (поставляется с набором), так что концентрация человеческого гена каспазы-8 находится в пределах диапазона, охватываемого по стандартной кривой.
- c. 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.
- d. 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!**
- e. Разведение стандарта на планшете (альтернативно разбавление стандарта может быть приготовлено в пробирках): Добавить 100 мкл Разбавителя для образцов в дублях ко всем

стандартам. Приготовьте стандартные разведения добавлением по 100 мкл разбавленного **Стандарта** (раздел «Приготовление реагентов» 9.6) 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 Каспаза-8** в диапазоне от 10.00 до 0.16 нг/мл. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).



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 (10.00 нг/мл)	Ст #1 (10.00 нг/мл)	О 1	О 1
B	Ст #2 (5.00 нг/мл)	Ст #2 (5.00 нг/мл)	О 2	О 2
C	Ст #3 (2.50 нг/мл)	Ст #3 (2.50 нг/мл)	О 3	О 3
D	Ст #4 (1.25 нг/мл)	Ст #4 (1.25 нг/мл)	О 4	О 4
E	Ст #5 (0.63 нг/мл)	Ст #5 (0.63 нг/мл)	О 5	О 5
F	Ст #6 (0.31 нг/мл)	Ст #6 (0.31 нг/мл)	О 6	О 6
G	Ст #7 (0.16 нг/мл)	Ст #7 (0.16 нг/мл)	О 7	О 7
H	Бланк	Бланк	О 8	О 8

Ст – Стандарт, О – образец

- f. Внесите по 100 мкл **Разбавителя образцов** в дубликаты в ячейки «Бланк».
- g. Внесите по 50 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для образцов.
- h. Внесите по 50 мкл каждого **образца** в дублях в соответствующие ячейки.
- i. Приготовьте **Антитело обнаружения** (раздел 9.4).
- j. Добавьте по 50 мкл **Антитела обнаружения** во все лунки.
- k. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- l. Приготовьте **Anti-Кролик-IgG-HRP** (раздел 9.5).
- m. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 3 раза как указано в шаге «с» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- n. Внесите по 100 мкл разбавленного **Anti-Кролик-IgG-HRP** во все ячейки, включая бланк.
- o. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- p. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 3 раза как указано в шаге «с» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- q. Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора ТМБ** во все ячейки.
- g. Инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течение примерно 10 минут.

Развитие цвета на планшете должно быть проверено и субстратная реакция остановлена (см. следующий пункт этого протокола) до того, как положительные лунки больше не обнаруживаются. Определение идеального периода времени для проявления цвета должно быть сделано индивидуально для каждого анализа.

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.

- s. 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.
- t. Определите оптическую плотность всех ячеек при 450 нм против «Бланка», желательно 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.

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 Каспаза-8. на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации Каспаза-8 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 Каспаза-8 в соответствующей пробе.
- **В ходе анализа, согласно данной инструкции, образцы были разведены 1:2, следовательно, концентрации, полученные из калибровочной кривой, должны быть умножены на коэффициент разведения (x2).**
- **Замечание: расчёт образцов с оптической плотностью выше 2.0 может быть некорректен – результаты будут занижаться. Такие образцы необходимо дополнительно развести буфером для разведения и протестировать еще раз, для получения результата, отражающего точную концентрацию Каспазы-8.**
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией Каспаза-8. Если значения контроля не укладываются в ожидаемый диапазон, результаты анализа могут быть недостоверны.
- 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 Каспаза-8. Каспаза-8 был разбавлен в серии двукратных последовательных шагов титрования Разбавителем образцов. Здесь представлены средние значения из трех параллельных титрований.

Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

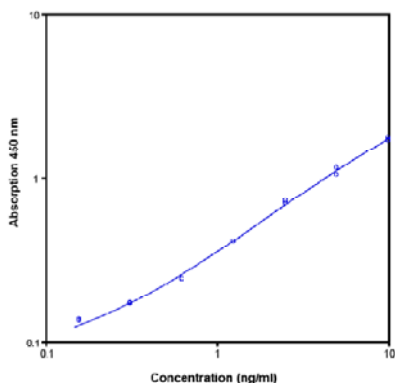


Таблица: Типичные результаты, полученные с использованием данного набора.

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	Каспаза-8, нг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	10.00	1.776 1.700	1.738	3.1
2	5.00	1.139 1.033	1.086	6.9
3	2.50	0.714 0.695	0.705	1.9
4	1.25	0.405 0.404	0.405	0.3
5	0.63	0.239 0.241	0.240	0.6
6	0.31	0.169 0.170	0.170	0.4
7	0.16	0.134 0.137	0.136	1.6
Бланк	0.00	0.097 0.090	0.094	5.3

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 высыхать 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 мышинным иммуноглобулинам, могут быть проанализированы в случае, когда мышинные иммуноглобулины (сыворотка, асцитная жидкость или моноклональные антитела другой специфичности) добавляются к Разбавителю образцов.

13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация Каспаза-8, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 0.10 нг/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 Каспаза-8. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения Каспаза-8 и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 6.7 %.

Таблица 3: Среднее значение концентрации и коэффициент вариации для каждого образца

Положительный образец	Эксперимент	Концентрация Каспазы-8, нг/мл	Кoeff. Вариации (%)
1	1	5.93	7
	2	6.22	9
	3	5.75	8
2	1	4.49	10
	2	4.21	10
	3	4.91	8
3	1	3.15	4
	2	3.51	8
	3	3.90	5
4	1	2.94	6
	2	3.17	6
	3	3.18	4
5	1	8.00	2
	2	7.68	4
	3	8.80	4
6	1	3.63	6
	2	3.58	4

	3	4.40	6
7	1	1.87	5
	2	1.77	9
	3	2.17	7
8	1	0.93	8
	2	0.91	10
	3	1.12	9

13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями в одной лаборатории определялась в 3-х независимых сериях анализа тремя разными лаборантами. В каждый серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации Каспазы-8. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения Каспазы-8 и коэффициент вариации для каждого образца, рассчитанный из 18 определений каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 8.5 %.

Таблица 4: Среднее значение концентрации и коэффициент вариации каждого образца

Образец	Среднее значение концентрации Каспазы-8, нг/мл	Коефф. Вариации (%)
1	5.97	4.0
2	4.54	7.8
3	3.52	10.7
4	3.10	4.4
5	8.16	7.1
6	3.87	11.9
7	1.94	10.7
8	0.99	11.5

13.3 Извлечение

Восстановление оценивали путем пулирования 4 уровней человеческой каспазы-8 в различные клеточные лизаты. Восстановление определялись в 3 независимых экспериментах с 4 повторами каждый.

Среднее общее восстановление составило 89.5 %.

13.4. Линейность

Образцы с различными уровнями Каспазы-8 были проанализированы в двукратных разведениях, по 4 повтора каждого. В таблице приведены значения извлечения (% от ожидаемого значения). Показано, что извлечение в среднем составило 100 %, в диапазоне от 85 % до 111 %.

Таблица 5

Образец	Разведение	Концентрация Каспазы-8, нг/мл		
		Ожидаемое значение	Наблюдаемое значение	% извлечения
1	1:2	--	5.96	--
	1:4	2.98	3.27	110
	1:8	1.63	1.73	106
	1:16	0.86	0.87	101
2	1:2	--	9.42	--
	1:4	4.71	4.19	89
	1:8	2.10	2.02	97
	1:16	1.01	1.05	104
3	1:2	--	2.94	--
	1:4	1.47	1.63	111
	1:8	0.81	0.84	104
	1:16	0.42	0.44	104
4	1:2	--	5.02	--
	1:4	2.51	2.12	85
	1:8	1.06	0.99	94
	1:16	0.50	0.46	93

13.5 Стабильность образцов

13.5.1 Стабильность при замораживании-размораживании

Аликвоты образцов хранились при температуре -20°C и размораживались 5 раз, после чего определялись уровни Каспазы-8. Не наблюдалась значительная потеря иммунореактивности Каспазы-8.

13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты образцов хранились при температуре -20°C , $2-8^{\circ}\text{C}$, комнатной температуре и при 37°C в течение 72 часов, после чего определялись уровни Каспазы-8. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности Каспазы-8.

13.6 Специфичность

Анализ обнаруживает как натуральный, так и рекомбинантный ген человеческой каспазы-8. Интерференция циркулирующих факторов иммунной системы оценивалась путем пулирования этих белков в физиологически значимых концентрациях в каспазу-8 положительной сыворотки.

Перекрестной реактивности не было обнаружено.

13.7 Ожидаемые значения

Панель из 40 образцов сыворотки от случайно выбранных доноров (мужчин и женщин) был испытан на человеческую каспазу-8. Обнаруженные уровни человеческой каспазы-8 были в диапазоне между н/о (не обнаруживается) и 1.2 нг/мл.

14. ЛИТЕРАТУРА (См. в оригинале инструкции).

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 Лизирующий буфер

Добавить Концентрата Лизирующего буфера 10x (15 мл) к 135 мл дистиллированной воды.

15.4 Антитела обнаружения

Провести 1:100 разбавление концентрированного раствора Антител обнаружения Рабочим буфером (1x):

Кол-во стрипов	Антитела обнаружения (мл)	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0.03	2.97
1-12	0.06	5.94

9.5 Anti-Кролик-IgG-HRP

Провести 1:2000 разбавление концентрированного раствора Anti-Кролик-IgG-HRP с Рабочим буфером (1x):

Кол-во стрипов	Anti-Кролик-IgG-HRP (мл)	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0.003	6.000
1-12	0.006	12.000

9.6 Стандарт человеческого гена Каспазы-8

Растворите Стандарт Каспазы-8 в дистиллированной воде. Необходимый объем для растворения указан на этикетке флакона, содержащего стандарт.

16. ПРОТОКОЛ ТЕСТА (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ) (См. оригинал инструкции).



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com