

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО E-СЕЛЕКТИНА

BMS205/BMS205TEN, Human E-selectin

Каталог. №: **BMS205/BMS205TEN**

Методика от **10-11-2014**

Количество: **96, 10x96**

Версия **25**

Производитель: **Bender MedSystems
GmbH, (Австрия)**



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 Human E-selectin ELISA предназначен для количественного определения человеческого E-Селектина. **Набор предназначен только для исследовательских целей. Не для диагностических или терапевтических процедур.**

2. ВВЕДЕНИЕ

Молекула-1 эндотелиально-лейкоцитарной адгезии (ELAM-1, E-селектин) принадлежит семейству молекул адгезии. Вместе с LECAM-1 (L-селектин) и GMP-140 (P-селектин) E-селектин опосредует начальное взаимодействие лейкоцитов и тромбоцитов с эндотелиальными клетками.

Молекулярная структура: Экстрацеллюлярная часть всех селектинов состоит из аминоктерминального лектина с-типа, специфично связывающего углеводные лиганды. Далее следует EGF-подобный домен и 6 коротких последовательных повтора. За трансмембранной частью молекулы расположен короткий цитоплазматический хвост. Селектины приводят к образованию первых, ещё непрочных контактов неактивированных полиморфнонуклеарных клеток с эндотелием в местах воспаления. Потенциальный лиганд E-селектина содержит сиалил-LewisX олигосахарид. Другие подходящие лиганды для лектинового домена E-селектина – сиалированные и фукозилированные лактозаминогликаны. Вместе с GMP-140 E-селектин экспрессируется на цитокин-активированных эндотелиальных клетках и участвует в адгезии ещё неактивированных лейкоцитов к эндотелию. Это начальное связывание необходима предпосылка для активации иммунных клеток различными воспалительными медиаторами. В отличие от GMP-140, E-селектин максимально экспрессируется через 2-4 часа после клеточной активации. В следующие 24-48 часов E-селектин сбрасывается с цитоплазматической мембраны и попадает в циркулирующую кровь и лимфу. Циркулирующая форма или растворимый E-селектин (sE-селектин) служит хемотаксическим сигналом для нейтрофилов и дополнительно активирует 2-интегрины - sE-селектин усиливает способность к миграции клеток, несущих эти интегрины.

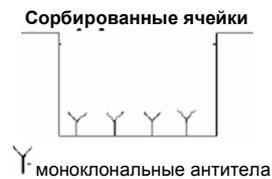
Изучение растворимого E-селектина могло бы обеспечить более детальное понимание различных патологических вариантов течения болезней:

- Аллергические реакции: временный приток нейтрофилов в респираторный трактат в результате воспалительного ответа в основном опосредуется E-селектином. Показана функциональная роль этой молекулы в развитии острого воспаления дыхательных путей in vivo (5). К тому же именно E-селектину принадлежит особенно важная роль в развитии ранней стадии аллергического контактного дерматита.
- Глазные болезни: присутствие E-селектина на ретиальном сосудистом эндотелии предполагает его важную функцию в патогенезе заболеваний глаза, обусловленных иммунологическими нарушениями.
- Септический шок: показано, что E-селектин вовлечен в патогенез полиорганной недостаточности при септическом шоке.
- Внутрисосудистая инфекция и воспаление: Уровни sE-селектина у пациентов в начале заболевания гигантоклеточным артериитом или узелковым полиартериитом значительно выше по сравнению с контролем.

- Воспалительные заболевания кишечника: экспрессия E-селектина на эндотелии толстого кишечника связана с воспалением.
- Трансплантация: найдено, что экспрессия E-селектина на эндотелиальных клетках повышена при реакции отторжения «трансплантат—против—хозяина».

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Антитела, специфичные к E-селектину, сорбированы в ячейках планшета.



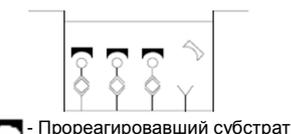
◆ - Стандарт или образец
■ - биотиновый конъюгат

E-селектин, присутствующий в неизвестных образцах, стандартах и контрольных образцах, вносится в ячейки планшета и связывается с антителами, сорбированными в ячейках. Вслед за этим добавляется конъюгат моноκлональных антител с пероксидазой хрена, который связывает молекулы sE-селектина, захваченные первыми антителами.



▣ - Субстрат

После инкубации и промывки из ячеек удаляется не связавшийся биотиновый конъюгат и HRP-стрептавидин, и в ячейки добавляется субстратный раствор, реагирующий с HRP.



▣ - Прореагировавший субстрат

Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации E-селектина, присутствующего в образцах. Концентрация E-селектина в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 6 приготовленным разведениям стандарта.

4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты в наборе Человеческий E-селектин ELISA BMS205 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноκлональными антителами к человеческому E-селектину	1 планшет
HRP-Конъюгат моноκлональных антител анти-E-селектина человека, 150 мкл	1 флакон
Стандарт, лиофилизированный, 100 нг/мл	2 флакона
Контроль высокий, лиофилизированный	1 флакон
Контроль низкий, лиофилизированный	1 флакон
Растворитель для 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
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	1 флакон
Стоп-раствор (1M фосфорная кислота), 15 мл	1 флакон
Плётки для заклеивания стрипов	2

4.2 Реагенты в наборе Человеческий E-селектин ELISA BMS205TEN (10 x 96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноκлональными антителами к человеческому E-селектину	10 планшетов
HRP-Конъюгат моноκлональных антител анти-E-селектина человека, 150 мкл	10 флаконов
Стандарт, лиофилизированный, 100 нг/мл	10 флаконов
Контроль высокий, лиофилизированный	10 флаконов
Контроль низкий, лиофилизированный	10 флаконов
Растворитель для образцов, 12 мл	8 флаконов
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	3 бутылки
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	10 флаконов
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл	1 флакон
Плѐнки для заклеивания стрипов	10

5. ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ – НАБОР ИФА

Храните компоненты набора при температуре 2-8 °С. Лиофилизированные контроли храните при -20 °С. 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 культур клеток, человеческая сыворотка и плазма (ЭДТК, цитратная, гепариновая) плазма могут быть использованы для анализа данным методом. Другие биологические образцы также могут быть использованы. Отделите сыворотку или плазму от сгустка или эритроцитов как можно быстрее.

Образцы, содержащие видимый преципитат, необходимо центрифугировать для отделения преципитата до анализа. Не используйте сильно гемолизированные или липемичные образцы.

Если образцы не будут протестированы в день сбора, то их необходимо заморозить и хранить при температуре -20 °С или ниже, чтобы предотвратить потерю биоактивности Е-селектина. Если анализ будет выполнен в ближайшие 24 часа, образцы могут храниться при 2-8 °С.

Избегайте повторных циклов замораживания-размораживания образцов. До начала анализа медленно разморозьте образцы и осторожно перемешайте.

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
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов (линейная регрессия)

8. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

- 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.
- Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.
- Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.
- Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
- Избегайте облучения реагентов сильным источником света во время хранения и инкубации.
- Не пипетируйте ртом.
- Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ.
- Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми.
- При ручном методе анализа пользуйтесь латексными перчатками для защиты рук.
- Избегайте контакта субстратного раствора с металлами и окислителями.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей.
- Чтобы избежать микробного загрязнения или загрязнения реактивами и получения в результате недостоверных результатов, пользуйтесь одноразовыми наконечниками.
- Используйте чистую, специально выделенную посуду для конъюгатов и субстратного раствора.
- Загрязнение кислотой инактивирует конъюгат.
- Для приготовления реактивов используйте дистиллированную или деионизированную воду.
- Субстратный раствор должен иметь комнатную температуру перед использованием

- Обеззараживайте после работы образцы, так как они могут быть инфицированы, предпочтительно автоклавированием не менее 1 часа при 121.5 °С.
- 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 приведите 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 Промывочного Буфера (20X), 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 Промывочного Буфера (20X), 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.

Приготовьте необходимое количество биотинового конъюгата, разведя биотиновый конъюгат 1:100 рабочим буфером (1x) в чистой пластиковой посуде, согласно таблице:

Количество используемых стрипов	Биотиновый Конъюгат, мл	Рабочий Буфер (1X) (мл)
1-6	0.03	2.97
1-12	0.06	5.94

9.4 Стандарт человеческого Е-селектина

Растворите **Стандарт человеческого Е-селектина** в дистиллированной воде. Необходимый объем для растворения указан на этикетке флакона, содержащего стандарт. Осторожно перемешивайте до полного растворения. Конечная концентрация полученного раствора составит 100 нг/мл.

Оставьте стандарт для восстановления в течение 10-30 минут. Все хорошо перемешать до проведения разведений.

После использования оставшийся стандарт не может храниться и должен быть выброшен.

Разведения стандарта могут производиться непосредственно на планшете (см. пункт 10с) или альтернативно в пробирках (см. Пункт 9.4.1)

9.4.1 Внешнее разведение Стандарта

Пометить 6 пробирок, одну для каждой точки стандарта. S1, S2, S3, S4, S5, S6.

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

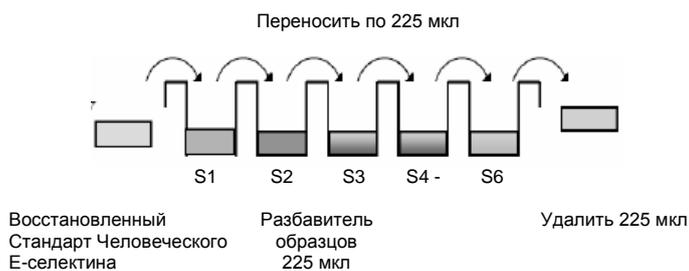
Пипетировать 225 мкл Разбавителя Образцов в каждую пробирку.

Пипетировать 225 мкл восстановленного стандарта (концентрация стандарта = 200 нг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1 = 50 нг/мл).

Пипетировать 225 мкл этого раствора во вторую пробирку, помеченную S2, и тщательно перемешать перед следующим перемещением.

Повторить серийные разведения еще 4 раза, таким образом формируя точки стандартной кривой (См. рисунок ниже).

Разбавитель образцов служит в качестве бланка.

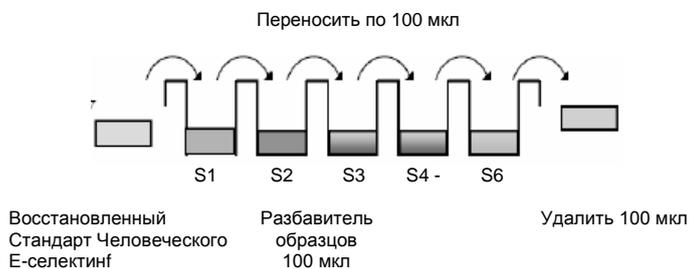


9.5 Контроли

Развести добавлением 200 мкл дистиллированной воды к лиофилизированным **контролям** (10-30 минут). Покрутить или аккуратно перемешать, чтобы обеспечить полное растворение и однородность. Дальше обращаться с контролями, как и с образцами в анализе. Для диапазона контролей см. сертификат анализа или этикетку. Хранить восстановленные контроли в аликвотах при -20 °С. Избегайте циклов повторного замораживания и оттаивания.

10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

- 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.
- Промойте ячейки 2 раза 400 мкл **Промывочного Буфера**, полностью удаляя жидкость между промывками. Оставить 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!**
- 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» 9.4) 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 4 раза, получив в итоге 2 ряда разведений **Стандарта Е-селектина** в диапазоне от 50.0 до 1.6 нг/мл. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (F1, F2).



При **внешнем разведении стандарта** пипетировать 100 мкл этих разведений стандартов (S1-S6) в лунки для стандартов согласно таблице 1.

Таблица 1: Схема расположения образцов, бланка и стандартов на планшете.

	1	2	3	4
A	Ст #1 (50.0 нг/мл)	Ст #1 (50.0 нг/мл)	O 2	O 2
B	Ст #2 (25.0 нг/мл)	Ст #2 (25.0 нг/мл)	O 3	O 3
C	Ст #3 (12.5 нг/мл)	Ст #3 (12.5 нг/мл)	O 4	O 4

D	Ст #4 (6.3 нг/мл)	Ст #4 (6.3 нг/мл)	O 5	O 5
E	Ст #5 (3.1 нг/мл)	Ст #5 (3.1 нг/мл)	O 6	O 6
F	Ст #6 (1.6 нг/мл)	Ст #6 (1.6 нг/мл)	O 7	O 7
G	Бланк	Бланк	O 8	O 8
H	Образец 1	Образец 1	O 9	O 9

Ст – Стандарт, O – образец

- Внесите по 100 мкл **Разбавителя образцов** в дубликаты в ячейки «Бланк».
- Внесите по 80 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для образцов.
- Внесите по 20 мкл каждого **образца** в дублях в соответствующие ячейки.
- Приготовьте **HRP-конъюгат** (раздел «Приготовление Стрептавидин-HRP»).
- Добавьте по 50 мкл **HRP-конъюгата** во все ячейки.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25 °С), если возможно, используйте орбитальный шейкер, установленный на 400 об/мин.
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек. **Промойте** ячейки 5 раз как указано в шаге «б.» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Внесите 100 мкл **Раствора Субстрата ТМВ** во все лунки.
- Инкубируйте стрипы при комнатной температуре (18 ° до 25 ° С) в течение примерно 10 минут. Избегайте прямого контакта с интенсивным светом.

Развитие цвета на планшете необходимо мониторить и реакцию субстрата остановить (см. следующий пункт этого протокола), до того как положительные лунки больше не мониторяются должным образом. Определение идеального периода времени для развития окраски должно быть сделано индивидуально для каждого анализа.

Рекомендуется добавить стоп раствор, когда самый высокий стандарт приобрел темно-синий окрас. Альтернативно развитие цвета можно контролировать с помощью ридера при 620 нм. Реакция субстрата должна быть остановлена, как только Стандарт 1 достиг OD 0.9 – 0.95.

- Остановить ферментную реакцию быстрым добавлением 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки. 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 °С в темноте.
- Определите оптическую плотность всех ячеек при 450 нм против «Бланка», желательнее 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 Е-СЕЛЕКТИН. на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации Е-СЕЛЕКТИН. 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 Е-СЕЛЕКТИН. в соответствующей пробе.
- В ходе анализа, согласно данной инструкции, образцы были разведены 1:5, следовательно концентрации, полученные из калибровочной кривой, должны быть умножены на коэффициент разведения (x5).**
- Замечание: расчёт образцов с оптической плотностью выше Стандарта 1 может быть некорректен – результаты будут занижаться. Такие образцы необходимо**

дополнительно развести буфером для разведения и протестировать еще раз, для получения результата, отражающего точную концентрацию Е-селектина.

- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией Е-селектина. 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 Е-селектина. Е-селектин 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.

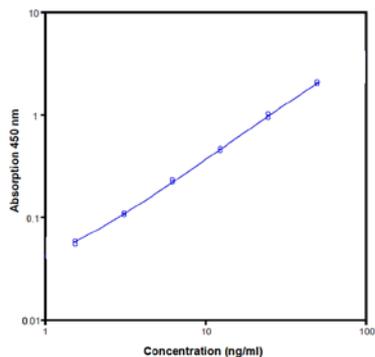


Таблица. Типичные результаты, полученные с использованием данного набора.

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	Е-селектин, нг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	50.0	2.045 1.936	1.991	3.9
2	25.0	1.018 0.919	0.969	7.3
3	12.5	0.471 0.441	0.456	4.7
4	6.3	0.230 0.213	0.222	5.6
5	3.1	0.109 0.103	0.106	4.3
6	1.6	0.058 0.054	0.056	6.0
Бланк	0.0	0.008 0.008	0.008	0

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.
- Стеклопосуда должна быть тщательно вымыта.
- Неполная промывка негативно влияет на точность результатов. Полностью удалите Промывочный буфер из ячеек между циклами промывки. Не позволяйте ячейкам высохнуть 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 мышиным иммуноглобулинам, могут быть проанализированы в случае, когда мышиные иммуноглобулины (сыворотка, асцитная жидкость или моноклональные антитела другой специфичности) добавляются к Разбавителю образцов.

13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация Е-селектина, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 0.3 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 Е-селектина. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения Е-селектина и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 5.4 %.

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

Sample	Experiment	Mean Human E-selectin Concentration (ng/ml)	Coefficient of Variation (%)
1	1	32.3	5.1
	2	33.7	4.6
	3	38.3	5.6
2	1	35.8	3.6
	2	35.4	6.1
	3	38.7	5.8
3	1	37.1	3.6
	2	36.2	7.2
	3	39.8	3.0
4	1	30.3	4.9
	2	28.0	2.2
	3	30.0	2.7
5	1	34.4	3.3
	2	40.1	3.4
	3	35.7	4.7
6	1	12.3	8.5
	2	12.1	7.7
	3	12.3	4.7
7	1	23.7	4.7
	2	22.2	8.7
	3	24.5	6.9
8	1	19.6	8.0
	2	17.2	6.1
	3	22.9	7.6

13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями в одной лаборатории определялась в 3-х независимых сериях анализа тремя разными лаборантами. В каждой серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации Е-селектина. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения Е-селектина и коэффициент вариации для каждого образца, рассчитанный из 18 определений каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 6.0 %.

Таблица 4: Среднее значение концентрации и коэффициент вариации каждого образца

Образец	Среднее значение концентрации, нг/мл	Коэффициент вариации, %
1	34.8	9.1
2	36.6	4.9
3	37.7	4.9
4	29.4	4.3
5	36.7	8.1
6	12.3	0.9
7	23.5	5.1
8	19.9	14.4

13.3 Восстановление

Восстановление после насыщения оценивали насыщением 3 уровней человеческого Е-селектина в сыворотку крови. Восстановление было определено в 3 независимых экспериментах с 4 повторами каждый. Восстановление колебалось от 71% до 95% с общим средним восстановлением 86%.

13.4. Линейность

4 образца человеческой сыворотки, с различными уровнями Е-селектина, были проанализированы в сериях двукратных разведений, по 4 повтора каждого. В таблице приведены значения извлечения (% от ожидаемого значения). Показано, что извлечение в среднем составило 95%, в диапазоне от 89% до 106%.

Таблица 5

Sample	Dilution	Expected Human E-selectin Concentration (ng/ml)	Observed Human E-selectin Concentration (ng/ml)	Recovery of Expected Human E-selectin Concentration (%)
1	1:5	--	52.8	--
	1:10	26.4	25.3	96
	1:20	12.6	11.6	92
	1:40	5.8	6.1	105
2	1:5	--	36.5	--
	1:10	18.2	18.5	102
	1:20	9.3	8.3	89
	1:40	4.1	3.7	89
3	1:5	--	51.1	--
	1:10	25.5	23.4	92
	1:20	11.7	10.6	91
	1:40	5.3	5.0	94
4	1:5	--	48.9	--
	1:10	24.5	22.6	92
	1:20	11.3	10.3	92
	1:40	5.2	5.5	106

13.5 Стабильность образцов

13.5.1 Стабильность при замораживании-размораживании

Аликвоты сыворотки (без добавленного Е-селектина и с добавлением Е-селектина) хранились при температуре -20°C и размораживались 5 раз, после чего определялись уровни Е-селектина. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности Е-селектина.

13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты сыворотки (без добавленного Е-селектина и с добавлением Е-селектина) хранились при температуре -20°C , $2-8^{\circ}\text{C}$, комнатной температуре и при 37°C в течение 24 часов, после чего определялись уровни Е-селектина. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности Е-селектина.

13.6 Сравнение сыворотки и плазмы

У нескольких индивидуумов сравнивались концентрации Е-селектина в сыворотке и плазме, стабилизированной ЭДТА, цитратом и гепарином. Существенных различий в уровнях Е-селектина в определяемых образцах не наблюдалось, следовательно, все эти образцы пригодны для анализа. Однако настоятельно рекомендуется использовать однородные образцы для унификации исследований.

13.7 Специфичность

Анализ обнаруживает как естественный так и рекомбинантный человеческий Е-селектин.

Интерференцию циркулирующих факторов иммунной системы оценивали насыщением этими белками в физиологически значимых концентрациях положительной сыворотки человеческого Е-селектина.

Не было обнаружено перекрестной реактивности, а именно не с IL-8, ICAM-1, TNF-R, TNF бета, CD8, IL-2R, IL-6, L-селектином и P-селектином.

13.8 Ожидаемые значения

Панель из 40 образцов плазмы случайно выбранных практически здоровых людей (мужчин и женщин) была протестирована на содержание Е-селектина.

См. таблицу 6.

Sample Matrix	Number of Samples Evaluated	Range (ng/ml)	Mean (ng/ml)	Standard Deviation (ng/ml)
Serum	40	21.0 - 186.0	66.5	34.8
Plasma (EDTA)	40	7.4 - 137.8	31.7	26.9
Plasma (Citrate)	40	17.5 - 88.1	50.5	20.7
Plasma (Heparin)	40	18.1 - 105.3	67.2	27.8



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