

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО sCD44std

BMS 209/2, BMS 209/2TEN, Human sCD44std

Каталог. №: **BMS209/2/BMS209/2TEN**
Количество: **96, 10x96**
Производитель: **Bender MedSystems
GmbH, (Австрия)**

Методика от **09-07-2012**
Версия **25**



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

Данный набор Человеческий sCD44std ELISA предназначен для количественного определения уровня человеческого sCD44std. Набор предназначен только для диагностики *in vitro*. Не использовать в терапевтических целях

2. ВВЕДЕНИЕ

CD44 (Pgp-1; Ly-24; ECMR III; F10-44-2; H-CAM; HUTCH-I; In(Lu)-подобный р80; hegmс антиген; рецептор гиалуриновой кислоты) – это полиморфный гликопротеин с м.м. от 85 кДа до 250 кДа. Это молекула, ассоциированная с клеточной мембраной, имеющая цитоплазматический хвост (опосредующий взаимодействие с цитоскелетом), короткий гидрофобный трансмембранный регион и NH2-концевой внеклеточный (связывающий гиалуриновую кислоту) домен.

Изоформы CD44 участвуют во множестве различных межклеточных взаимодействий, клеточно-матричном взаимодействии включая хоуминг лимфоцитов, активации Т и В иммунных ответов, метастазировании злокачественных опухолей, воспалительных процессах.

Известны 3 группы изоформ молекулы CD44:

1) основная группа с м.м. 80-90 кДа, также называемая стандартным CD44, обозначаемая CD44std, широко распространена во многих гематопозитических и негематопозитических клетках, включая все подклассы лейкоцитов, моноцитов, эритроцитов, многие типы эпителиальных клеток, элементы мезенхимы, такие как фибробласты, гладкомышечные клетки и глиальные клетки центральной нервной системы,

2) промежуточная группа с м.м. 110-160 кДа, слабо экспрессируемая на эпителиальных клетках, но высоко экспрессируемая при некоторых карциномах, и

3) группа, включающая очень большие изоформы белка, с м.м. 250 кДа, модифицированные ковалентно связанная с хондроитин сульфатом.

Эти большие изоформы CD44 появляются в результате альтернативного сплайсинга одного или более «вариантов» экзонов (v2-v10) во внеклеточной части константной части молекулы с массой 90 кДа. По сравнению со стандартным CD44, экспрессия всех более крупных изоформ в большей степени ограничена только несколькими типами нормальных клеток или на поверхности определенных опухолевых клеток. Некоторые варианты сплайсинга CD44 играют важную роль в метастазировании опухолей. Данный метод sCD44std ELISA определяет все циркулирующие u1080 изоформы CD44, содержащие стандартную белковую последовательность (черная зона).



Белок CD44: - стандартная последовательность белка (черная зона)
- вариабельные экзоны (блоки с номерами v2 - v10)

Определение sCD44var(v5) даст более детальное понимание различных патологических модификаций при канцерогенезе и других заболеваниях

- **опухоли мозга:** CD44 усиленно экспрессируется при глиомах и слабо экспрессируется при менигиомах, медуллобластомах и в нормальных мозговых тканях (11).

- **колоректальная карцинома:** у человека при злокачественных колоректальных неоплазиях: различные изоформы белка CD44 обнаруживаются при всех инвазивных формах рака при образовании метастазов. Изоформы экспрессируются уже на ранней стадии колоректального рака и в прогрессирующей опухоли (5).

- **рак желудка:** опухоли пациентов, страдающих аденокарциномой желудка, экспрессируют варианты CD44. Аденокарцинома кишечника строго позитивна по CD44 v5 и v6, тогда как диффузная аденокарцинома в большей степени экспрессирует экзон v5.

- **рак легких, рак молочной железы:** в опухолевых тканях наблюдается сильная сверхпродукция больших молекул, являющихся результатом альтернативного сплайсинга во всех образцах, тогда как в контрольных образцах обычно определяется только стандартный белок и крайне редко выявляются минимальные количества одной или двух небольших изоформ.

- **лимфома:** при гастроинтестинальной лимфоме сверхэкспрессия CD44 коррелирует с неблагоприятным прогнозом и более десиминированным типом заболевания. Гиперэкспрессия CD44 также обнаружена при некоторых агрессивных не-Ходжкинских лимфомах, при лимфомах Ходжкина, очаговой, диффузной лимфомах (2).

- **рак миндалин, кожи:** варианты экспрессии изоформ CD44 могут наблюдаться на плазматических мембранах плоских клеток кожи и эндотелия миндалин, экспрессия сильно снижена при злокачественных опухолях плоского эпителия.

- **ВИЧ:** CD44 практически полностью отсутствует на поверхности ВИЧ-инфицированных клеток.

- **воспалительные заболевания:** экспрессия CD44 снижена в синовиальной жидкости у большей части пациентов.

Список литературы доступен на интернет-странице производителя: www.bendermedsystems.com

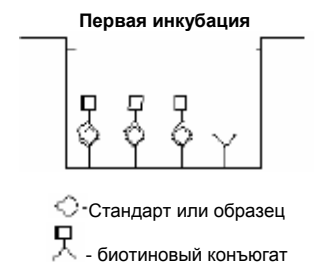
3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Антитела к человеческому sCD44std адсорбированы в лунках микропланшета.



Y - моноклональные антитела

Человеческий sCD44std, присутствующий в образцах, стандартах и контролях, внесенных в лунки планшета, связывается с антителами, адсорбированными в лунках. Антитела к sCD44std, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP-конъюгат), связывают молекулы человеческого sCD44std, захваченные первыми антителами.



○ - Стандарт или образец

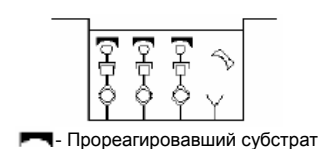
□ - биотиновый конъюгат

После инкубации при промывке из лунок удаляются не связавшийся HRP-конъюгат анти-sCD44std антител, и в лунки добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора. Реакция останавливается добавлением кислоты.



□ - Стрептавидин-HRP

Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации человеческого sCD44std, присутствующего в образцах. Концентрация человеческого sCD44std в образцах определяется по калибровочной кривой, построенной по 6 приготовленным разведениям стандарта человеческого sCD44std.



□ - Прореагировавший субстрат

4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты в наборе Человеческий sCD44std ELISA BMS209/2 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому sCD44std	1 планшет
HRP-Конъюгат анти-sCD44std моноклональных антител	2 флакона
Стандарт sCD44std, 8 нг/мл, 230 мкл	2 флакона
Разбавитель образцов, 60 мл	1 флакон
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20и 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 (1М фосфорная кислота), 15 мл	1 флакон
Голубой краситель, 0,4 мл	1 флакон
Зелёный краситель, 0,4 мл	1 флакон
Плётки для заклеивания стрипов	2

4.1 Реагенты в наборе Человеческий sCD44std ELISA BMS209/2 TEN (10 x 96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому sCD44std	10 планшетов
HRP-Конъюгат анти-sCD44std моноклональных антител	10 флаконов
Стандарт sCD44std, 8 нг/мл, 230 мкл	10 флаконов
Разбавитель образцов, 60 мл	10 флаконов
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20и 10 % BSA), 5 мл	2 флакона
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	3 флакона
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	10 флаконов
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл	10 флаконов
Голубой краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Зелёный краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Плётки для заклеивания стрипов	10

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.

Стабильность набора компонентов может быть гарантирована только при надлежащем хранении, и, в случае повторного использования одного компонента, если этот компонент не был загрязнен при первом использовании.

6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Для анализа могут использоваться супернатант клеточных культур, человеческая сыворотка, плазма или моча. Отделите сыворотку от сгустка эритроцитов как можно скорее после свёртывания крови. Образцы, содержащие видимый преципитат, необходимо отделить от него до анализа. Не используйте сильно гемолизированные или липемические образцы.

Если анализ будет выполнен в ближайшие 24 часа, образцы могут храниться при 2-8 °С. Для хранения образцов более 24 часов следует использовать температуру -20 °С и ниже.

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

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 °С
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 °С. 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 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 Разбавителя образцов, 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.

Разбавить HRP-Конъюгат перед использованием добавлением 490 мкл Рабочего буфера (1x) в пробирку с HRP-Конъюгатом. Тщательно перемешать.

Провести дальнейшее разбавление 1:40 с рабочим буфером (1 x).

Второе разбавление (1:40) можно проводить как указано в таблице:

Кол-во стрипов	Предварительно разведенный HRP-конъюгат (мл)	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0.075	2.925
1-12	0.150	5.850

9.4 Стандарт человеческого sCD44std

Растворите лиофилизированный стандарт **Рабочим буфером** (точный объем стандартного раствора, который должен получиться в результате растворения, указан на этикетке флакона). Оставьте Стандарт на 10-30 минут. Аккуратно перемешайте. (концентрация стандарта = 100 нг/мл).

Разбавленные Стандарты могут быть приготовлены прямо на планшете (См. пункт 10d) или в пробирках.

9.4.1 Внешнее разведение Стандарта

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

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

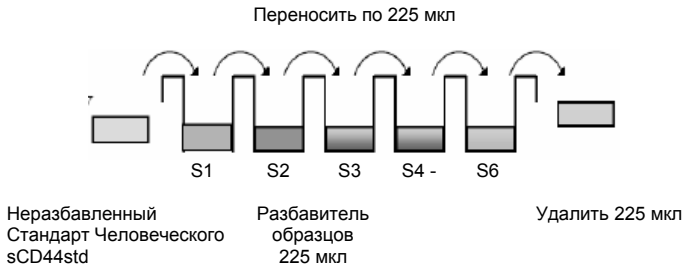
Пипетировать 225 мкл Разбавителя Образцов в каждую пробирку.

Пипетировать 225 мкл восстановленного стандарта (концентрация стандарта = 8 нг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1 = 4 нг/мл).

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

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

Разбавитель образцов служит в качестве бланка.



Неиспользованные стрипы сразу уберите в пакет с осушителем, запечатайте пакет и храните его при 2-8°C.

- c. Промойте лунки 2 раза, используя по 400 мкл **буфера для промывок**, на одну лунку на один цикл промывки, полностью удаляя жидкость между промывками. Оставьте буфер в лунках на **10 – 15 секунд** перед удалением («замачивание»). Избегайте царапин на поверхности лунок. После окончания промывки переверните микропланшет и постучите им по чистой фильтровальной бумаге. Используйте стрипы немедленно после окончания промывки или не позднее чем через 15 минут при условии, что стрипы уложены на фильтровальную бумагу в перевернутом виде. **Не позволяйте лункам высыхать!**

- d. **Приготовление разведенных стандарта в лунках микропланшета** (альтернативно разведения стандарта могут быть приготовлены в пробирках – см. 9.4.1):

Внесите по 100 мкл рабочего буфера во все лунки, предназначенные для стандартов. Внесите 100 мкл неразведенного стандарта (см. раздел «Приготовление реагентов», п. 9.4, концентрация = 8 нг/мл), в дублях, в лунки A1 и A2 (см. Таблицу 1). Перемешайте содержимое лунок A1 и A2 повторным пипетированием (концентрация стандарта 1, S1 = 4.00 нг/мл), и перенесите по 100 мкл раствора из лунки A1 и A2 в лунки B1 и B2, соответственно (см. рис. 6). Во время этих манипуляций постарайтесь не поцарапать внутреннюю поверхность лунок. Повторите перенос и разведение стандартов еще 4 раза, получите в итоге 2 ряда разведенных Стандарта человеческого sCD44std в диапазоне 4.00 - 0.13 нг/мл. Удалите по 100 мкл жидкости из последних использованных лунок (F1, F2).

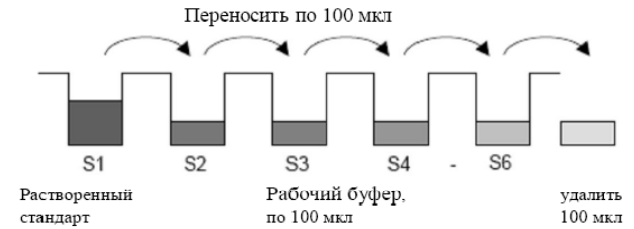


Рисунок 6. Приготовление серийных разведений Стандарта sCD44std

Если разведение стандарта было выполнено в пробирках (см.п.9.4.1), внесите по 100 мкл разведений из пробирок S1 – S6 в лунки микропланшета, предназначенные для стандартов, согласно таблице 1.

Таблица 1: Пример расположения образцов, бланка и стандартов на планшете

	1	2	3	4
A	Ст #1 (4.0 нг/мл)	Ст #1 (4.0 нг/мл)	O2	O2
B	Ст #2 (2.0 нг/мл)	Ст #2 (2.0 нг/мл)	O3	O3
C	Ст #3 (1.0 нг/мл)	Ст #3 (1.0 нг/мл)	O4	O4
D	Ст #4 (0.5 нг/мл)	Ст #4 (0.5 нг/мл)	O5	O5
E	Ст #5 (0.25 нг/мл)	Ст #5 (0.25 нг/мл)	O6	O6
F	Ст #6 (0.13 нг/мл)	Ст #6 (0.13 нг/мл)	O7	O7
G	Бланк	Бланк	O8	O8
H	O1	O1	O9	O9

Ст – Стандарт, O – образец

9.6 Добавление окрашивающих реагентов: голубого, зеленого

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.), 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. **Конъюгат-HRP:** перед разбавлением концентрата HRP-конъюгата 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

10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

- a. Перед началом анализа выполните предварительное разведение образцов сыворотки, плазмы и мочи. Разведите эти образцы в 60 раз буфером для разведения образцов, согласно приведенной схеме: 10 мкл образца + 590 мкл буфера для разведения образцов.
- b. Достаньте требуемое для проведения анализа число 8-луночных стрипов. Поместите требуемое количество стрипов в держатель (к необходимому числу лунок для Образцов добавьте лунки для Бланка и Стандартов). Все Стандарты, Бланк и Образцы необходимо анализировать в дублях.

- e. Внесите по 100 мкл **буфера для разведения образцов** в лунки «Бланк».
- f. Внесите по 80 мкл **буфера для разведения образцов** в лунки, предназначенные для образцов.
- g. Внесите по 20 мкл образцов в лунки, предназначенные для образцов.
- h. Приготовьте **HRP-конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов» 9.3).
- i. Добавьте по 50 мкл готового раствора **HRP-конъюгата** во все лунки.
- j. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 3 часа при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, то на орбитальном шейкере, установленном на 400 об/мин.
- k. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием (сливом). Промойте лунки 3

раза как указано в шаге «с» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.

- l. Внесите по 100 мкл **ТМВ субстрата** во все лунки.
- m. Инкубируйте при комнатной температуре (18° to 25°C) в течение приблизительно 10 минут. Избегайте воздействия солнечного света. За развитием окраски необходимо наблюдать и субстратная реакция должна быть остановлена (см. следующий пункт протокола) до того, как значение оптической плотности в положительных лунках превысят предел определения прибора. Рекомендуется останавливать реакцию добавлением стоп-раствора тогда, когда самый высокий стандарт окрасится в темно-голубой цвет. Альтернативно, развитие окрашивания можно наблюдать с помощью ИФА анализатора при длине волны 620 нм. Субстратная реакция должна быть остановлена как только ОП S1 достигнет 0.9 – 0.95.
- n. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все лунки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в лунках. 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.
- o. Определите оптическую плотность во всех лунках при 450 нм против «Бланка», желательнее использовать длину волны сравнения 620 нм (допустима длина волны сравнения в диапазоне 610-650 нм). Бланкируйте микропланшетный ридер так, как это описано в инструкции производителя, с использованием лунок «бланк». Абсорбцию определяйте как в тестируемых образцах, так и в стандартах человеческого sCD44std.

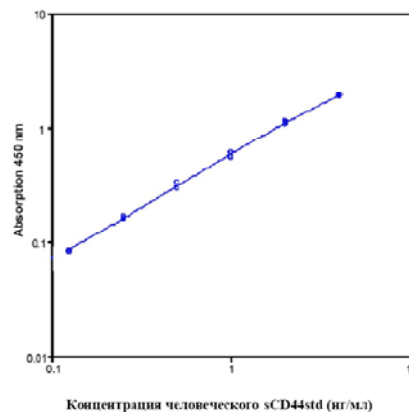
Замечание: если инкубация проводилась без встряхивания, значения могут быть ниже, чем в примере, приведённом ниже. Тем не менее, эти результаты также считаются достоверными.

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 sCD44std на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации sCD44std 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 sCD44std в соответствующей пробе.
- Для образцов, разведенных согласно инструкции в 300 раз (предварительное разведение в 60 раз, и разведение в лунке в 5 раз: 20 мкл образца + 80 мкл буфера для разведения образцов), концентрацию, полученную из калибровочной кривой, необходимо умножить на соответствующий коэффициент разведения (300).
- **Замечание:** расчёт концентрации в предварительно разведенных в 60 раз образцах, ОП которых выше ОП самого высокого стандарта S1 может быть некорректен – результаты будут занижаться. Для подобных образцов необходимо выполнить повторный анализ с использованием большего предварительного разведения буфером для разведения образцов, для получения результата, отражающего точную концентрацию человеческого sCD44std.
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией человеческой sCD44std. Если значения контроля не укладываются в ожидаемый диапазон, результаты анализа могут быть недостоверны.
- Пример калибровочной кривой показан на Рисунке 7. Не используйте эту калибровочную кривую для расчёта ваших образцов. Калибровочная кривая должна быть включена в каждую постановку.

Рисунок. Пример стандартной кривой для sCD44std. sCD44std 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.



Типичные результаты, полученные с использованием набора human sCD44std ELISA:

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	Концентрация человеческого sCD44std, нг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	4.00	1.901	1.876	1.9
		1.851		
2	2.00	1.080	1.095	1.9
		1.109		
3	1.00	0.608	0.581	6.7
		0.553		
4	0.50	0.330	0.312	8.4
		0.293		
5	0.25	0.160	0.164	3.4
		0.168		
6	0.13	0.081	0.083	2.6
		0.084		
Бланк	4.00	0.008	0.008	6.7
		0.007		

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 МЕТОДА

- 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.
- Предпочтительно использование одноразовых наконечников, флаконов, многоразовая стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта и следы детергента должны быть полностью удалены перед использованием.
- Неполная промывка на любом этапе негативно влияет на точность результатов и может привести как к ложноположительным, так и к ложноотрицательным результатам. Полностью удаляйте Промывочный буфер из ячеек между циклами промывки. Наполняйте лунки буфером для промывок как это указано, для каждого цикла промывки. Не позволяйте ячейкам высыхать или оставаться незакрытыми долгий период времени.
- Использование радиоиммунотерапии значительно увеличило число пациентов с человеческими антимышиными IgG (НАМА). НАМА могут влиять на результаты анализа, использующего мышиные моноклональные антитела, приводя к ложно положительным или 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 буферу для разведения образцов.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

13.1. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИЗА

Предел чувствительности для human sCD44std ELISA определялся как концентрация аналита, для которой О.П., получаемая в результате анализа, значительно выше, чем О.П. среды,

используемой для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения, бнезависимых постановок) и составляет 0.02 нг/мл.

13.2. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

13.2.1 Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась в 3 независимых сериях анализа. В каждый серии анализа было выполнено 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации человеческого sCD44std. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения человеческого sCD44std и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 4.8%.

Таблица 3. Средние концентрации человеческого sCD44std и коэффициент вариации для каждого образца

Образец	эксперимент	Средняя концентрация человеческого sCD44std (Ед/мл)	Коэффициент вариации (%)
1	1	292	4.4
	2	343	3.8
2	1	332	5.9
	2	361	1.4
3	1	295	2.4
	2	291	8.3
4	1	318	9.6
	2	345	3.7
5	1	177	3.7
	2	173	1.1
6	1	437	4.1
	2	427	4.1
7	1	370	8.1
	2	370	3.3
8	1	297	11.3
	2	278	1.2

13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определялась в одной лаборатории в 3-х независимых сериях анализа. В каждый серии анализа было выполнено 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации человеческого sCD44std. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения человеческого sCD44std и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации был рассчитан из 18 определений каждого образца и составил в среднем 4.1 %.

Образец	Средняя концентрация человеческого sCD44std (нг/мл)	Коэффициент вариации (%)
1	318	11.3
2	297	6.9
3	293	1.1
4	332	5.8
5	175	1.4
6	432	1.5
7	370	0.1
8	288	4.5

13.3. ИЗВЛЕЧЕНИЕ

Извлечение оценивали тестируя пулированные образцы человеческой сыворотки, обогащенные 4 различными уровнями человеческого sCD44std. Извлечение определяли в трёх независимых экспериментах в 6 повторах каждого образца. Количество эндогенного человеческого sCD44std в не обогащенной сыворотке вычитали из двух значений обогащения. Извлечение лежало в диапазоне 76% - 101% составило в среднем 89%.

13.4 ЛИНЕЙНОСТЬ РАЗВЕДЕНИЯ

4 образца сыворотки с разными уровнями человеческого sCD44std были проанализированы в серии двукратных разведений в 4 репликах каждая. Ниже в таблице (таблица 5) приведены результаты. Извлечение составило 91% - 99% или в среднем 94%.

Образец	Разведение	Ожидаемая концентрация человеческого sCD44std (нг/мл)	Наблюдаемая концентрация человеческого sCD44std (нг/мл)	Извлечение от ожидаемого (%)
1	1:300	--	347	--
	1:600	173	160	92

2	1:1200	87	80	92
	1:2400	43	42	96
	1:300	--	402	--
	1:600	201	186	92
3	1:1200	100	94	94
	1:2400	50	46	91
	1:300	--	292	--
	1:600	146	145	99
4	1:1200	73	72	99
	1:2400	37	34	92
	1:300	--	368	--
	1:600	184	173	94
	1:1200	92	89	96
	1:2400	46	43	94

13.5. СТАБИЛЬНОСТЬ ОБРАЗЦОВ

13.5.1 Стабильность при замораживании-оттаивании

Аликвоты сыворотки хранились при температуре -20°C и размораживались до 5 раз, после чего определялись уровни человеческого sCD44std. Не наблюдалось значительной потери активности человеческого sCD44std после каждого цикла повторного замораживания-оттаивания.

13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты сыворотки (обогащенные и не обогащенные) хранились при температуре -20°C, 2-8°C, комнатной температуре и при 37°C в течение 24 часов, после чего определялись уровни человеческого sCD44std. Не наблюдалось значительной потери иммунореактивности человеческого sCD44std при хранении при всех перечисленных условиях.

13.6. Сравнение образцов сыворотки и плазмы

Образцы сыворотки и ЭДТА, цитратной и гепариновой плазмы были взяты одновременно у 22 пациентов и протестированы данным методом. Все перечисленные матрицы образцов могут быть использованы для анализа данным методом определения sCD44std, хотя показано, что значения, получаемые в образцах цитратной и ЭДТА плазмы несколько ниже, чем значения, полученные для образцов сыворотки. Рекомендуется соблюдать единый протокол подготовки образцов для анализа.

13.7. Специфичность

Влияние циркулирующих факторов иммунной системы было оценено путем добавления к образцам сывороток с известной концентрацией sCD44std физиологически значимых количеств исследуемых факторов. Не была выявлена перекрестная реактивность с исследованными факторами, в том числе TNF-a, TNF-b, TNF-R, IFN-a2c, IFNg, IL-8, Annexin, sELAM-1, sL-selectin, sICAM-1 и HER-2.

13.8. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

22 образца сывороток и плазмы практически здоровых людей (мужчин и женщин) были протестированы на содержание человеческого sCD44std. Полученные уровни человеческого sCD44std лежали в диапазоне от 251 до 925 нг/мл, и в среднем составили 443 нг/мл, со стандартным отклонением 125 нг/мл. Уровень человеческого sCD44std может варьировать в зависимости от изучаемой популяции и иммунологической патологии.

14. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

14.1 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

14.2 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

14.3. Конъюгат-HRP

Количество стрипов	Концентрат HRP-конъюгата, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,075	2,925
1-12	0,150	5/850

16. ПРОТОКОЛ ТЕСТА (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

- Предварительно развести образцы сыворотки, плазмы и мочи с Разбавителем для образцов 1:60.
- Определиться с необходимым количеством микролуночных полосок.
- Промыть ячейки планшета дважды Промывочным буфером

4. Разбавление стандартов на планшете: Добавьте по 100 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для Стандартов (в дублях). Пипетировать 100 мкл неразбавленного стандарта в первые лунки и приготовить разведенные стандарты перемещением 100 мкл из лунки в лунку. Удалить 100 мкл из последних лунок.
Альтернативное разведение стандарта в пробирках: пипетировать 100 мкл этих разведений стандарта в лунки.
5. Внесите по 100 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки «Бланк», в дублях.
6. Внесите по 80 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для образцов.
7. Внесите по 20 мкл **предварительно разбавленного образца** в соответствующие ячейки, в дублях
8. Приготовьте **HRP- конъюгат**.
9. Добавьте по **50 мкл HRP- конъюгата** во все ячейки.
10. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 3 часа при комнатной температуре (18 – 25°C).
11. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 3 раза **Промывочным буфером**.
12. Внесите по 100 мкл **ТМВ субстрата** во все ячейки.
13. Инкубируйте при комнатной температуре примерно 10 минут.
14. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки.
15. Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм.

Замечание: Для образцов, разведенных согласно инструкции в 300 раз (предварительное разведение в 60 раз, и разведение в лунке в 5 раз: 20 мкл образца + 80 мкл буфера для разведения образцов), концентрацию, полученную из калибровочной кривой, необходимо умножить на соответствующий коэффициент разведения (300).



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