

# Human TGF-β1 Platinum ELISA TGF-β1 человека

Иммуноферментный набор

для количественного определения TGF-β человека

Кат. № BMS249/4 – 96 определений

Кат. № BMS249/4TEN - 960 определений

Замечание от ЗАО «БиоХимМак»

Уважаемые коллеги! Русская версия инструкции переведена с английского варианта. Обратите внимание на соответствие номера и даты версии английской инструкции, вложенной в набор, с русским переводом. Если версии на русском и английском языках не совпадают, обратитесь в ЗАО «БиоХимМак» за исправленным русским вариантом или используйте инструкцию на английском языке.

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор human TGF-β1 ELISA предназначен для количественного определения уровня TGF-β1 человека.

**Набор human TGF-β1 ELISA предназначен только для диагностики in vitro. Не использовать в терапевтических целях.**

## 2. ВВЕДЕНИЕ

Трансформирующий фактор роста-β (TGF-β) является плейотропным цитокином, который обладает широким спектром биологических и регулирующих эффектов на клеточном уровне и на уровне организма в целом. Он играет важную роль в регуляции целого ряда процессов: рост, развитие, дифференцировка и пролиферация клеток, синтез и деградация внеклеточного матрикса (ECM), регуляция взаимодействия мезенхимальных и эпителиальных клеток во время эмбриогенеза, регуляция функций клеток иммунной системы, процессов апоптоза, клеточного цикла, ангиогенеза, адгезии, миграции и хемотаксиса лейкоцитов. Он обладает свойствами, как подавляющими опухолевый рост, так и активирующими его. TGF-β строго регулируется на всех уровнях (например, обмен мРНК, латентная активация белкового синтеза или пост-трансляционные изменения).

TGF-β - первый обнаруженный белок из по меньшей мере 40 членов суперсемейства TGF-β структурно родственных цитокинов.

У млекопитающих были описаны три изоформы TGF-β (TGF-β 1-3). (Каждая изоформа кодируется уникальным геном на разных хромосомах. Все они связываются с одними и теми же рецепторами.) TGF-β синтезируются большинством типов клеток и тканей. Клетки иммунной системы, главным образом, экспрессируют TGF-β1.

Для проявления биологической активности первоначально секвестрированный, неактивный LTGF-β (латентная форма TGF-β) требует активации (расщепления и диссоциации его LAP (пептид, связанный с латентным состоянием)). LTGF-β также может быть связан с LTB (белок, связывающий латентную форму TGF-β) с образованием крупного латентного комплекса (LLC). TGF-β1 образует гомодимеры, и его субъединицы 12,5 кДа связаны с помощью дисульфидных мостиков.

Сигналы TGF-β передаются через TGF-β рецептор типа II и I, за счет фосфорилирования и конформационных изменений, а затем различными путями:

SMAD (- путь: в конечном итоге, связывание TGF-β приводит к фосфорилированию рецептор регулируемых SMADs (R-SMADs = SMAD 2, 3) и связыванию с общей SMAD (coSMAD = SMAD4). R-SMAD/coSMAD комплекс поступает в ядро клетки и

взаимодействует с рядом транскрипционных факторов, коактиваторов и корепрессоров.

TGF-β индуцирует зависимую от MAPK- и MAP/ERK киназ передачу сигнала (JNK/MAPK-, JNK/SPAK-, p38-, ERK1/2 - путь), а также сигнальные механизмы NF-κB. TGF-β опосредует остановку клеточного цикла за счет механизмов фосфоинозитидной киназы-3/Akt. Сигналы TGF-β строго регулируются, например, за счет взаимодействия с ингибиторными SMADs (I-SMADs = SMAD 6, 7) или связывания E3-убиквитиновыми лигазами Smurf1 и Smurf2 и/или корецепторами.

TGF-β1 является ключевым медиатором в патофизиологических механизмах восстановления тканей и фиброгенеза человека у человека: регулирует синтез и деградацию коллагена I типа и фиброз рубцов в органах и тканях.

TGF-β1 обладает важными иммунорегуляторными свойствами, частично неблагоприятного характера: TGF-β1 ингибирует пролиферацию В и Т-клеток, дифференцировку и синтез антител, а также созревание и активацию макрофагов. Он подавляет активность NK-клеток и клеток, активированных лимфокином, а также блокирует синтез цитокинов. TGF-β1 способствует дифференцировке Treg клеток, что сопровождается синтезом IL-10 / TGF-β1 и подавлением Th1 и Th2 клеток.

Недавно в исследованиях на мышах было показано, что TGF-β1 способствует развитию Th17 в присутствии ИЛ-6 или ИЛ-21. Возможно, TGF-β1 играет важную роль в развитии Th17 человека вместе с ИЛ-1β, ИЛ-21 и ИЛ-23. В этом контексте TGF-β1 участвует в индукции и регуляции провоспалительных и аллергических реакций.

Злокачественные новообразования: повышение уровня экспрессии TGF-β1 отмечено для большинства опухолей человека (например, рака молочной железы, простаты, почек, поджелудочной железы, яичников, шейки матки и желудка, а также меланомы, неходжкинской лимфомы и множественной миеломы), что коррелирует с неблагоприятным прогнозом.

TGF-β1 является как супрессором (особенно в ранней стадии канцерогенеза), так и активатором опухолевого роста (а именно, при прогрессировании опухоли, инвазии и метастазировании). Злокачественные клетки секретируют TGF-β1, подавляя противоопухолевый иммунный ответ и создавая иммунную толерантность. Мутации в сигнальном пути TGF-β1 (например, потеря рецепторов на поверхности клеток, снижение уровня экспрессии SMAD) приводят к тому, что клетки опухоли становятся невосприимчивыми к таким эффектам TGF-β1, как ингибирование роста и активация процессов апоптоза.

Аутоиммунные заболевания: TGF-β1 функционально связан с основными заболеваниями иммунной системы, такими как системная красная волчанка (СКВ). Предполагают, что при рассеянном склерозе (РС) низкий уровень экспрессии TGF-β1, связан с доброкачественным течением заболевания и малой инвалидностью. У пациентов с аутоиммунным гепатитом (АИГ) отмечается повышение уровня TGF-β1 в сыворотке крови. Предполагают, что патологическое ремоделирование соединительной ткани при системном склерозе (SSC) связано с активацией TGF-β1/SMAD пути. У мышей, перенос генов TGF-β1 в толстый кишечник приводит к фиброзированию ткани кишечника, это служит моделью болезни Крона на мышах (CD).

Печень: повышение уровня экспрессии TGF-β1 показано при фиброзировании ткани печени вследствие хронических заболеваний печени (хронический гепатит, алкогольный цирроз). Вирус гепатита С активирует транскрипцию TGF-β1 в ткани печени и повышает уровень TGF-β1 в циркуляции. Нарушение синтеза TGF-β1 и/или сигнальных путей предотвращает образование рубцов в экспериментально фиброзированной ткани печени. Процессы удаления излишков коллагена после прекращения заболевания печени регулируются TGF-β1.

Заболевания почек: гломерулонефрит и диабетическая нефропатия из-за чрезмерного накопления внеклеточного матрикса в мезангии клубочков почек связано с повышением уровня TGF-β1. Уровень TGF-β1 в моче у пациентов с данными заболеваниями повышен.

Диабет: уровни экспрессии и киназная активность компонентов сигнального пути TGF-β1 при заболеваниях поджелудочной железы

нарушены. Низкий уровень TGF-β1 у пациентов с сахарным диабетом I типа может увеличивать влияние отсутствия иммуносупрессии и способствовать прогрессированию заболевания.

**Сердечно-сосудистые заболевания:** TGF-β1 обладает антиатерогенными и атеропротективными свойствами, но при хронических заболеваниях он теряет свою защитную роль и обладает патологическими эффектами. В клинических образцах атеросклеротических бляшек отмечено увеличение концентрации TGF-β1. При дилатационной, ишемической и гипертрофической кардиомиопатии обнаружено повышение уровня TGF-β1. TGF-β1 способствует переходу эндотелиальных клеток в мезенхиму, что приводит к прогрессированию фиброзу ткани сердца, связанного с хроническими заболеваниями сердца. Снижение уровней TGF-β1 в сыворотке крови у пациентов с сепсисом и острым инсультом, может отражать изменения иммунологического воспалительного статуса у этих больных. Процессы ремоделирования после инфаркта миокарда регулируются TGF-β1. После ишемии, вызванной повреждением головного мозга, также отмечено повышение уровня экспрессии TGF-β1 в центральной нервной системе. Была обнаружена нейропротективная роль TGF-β1 при ишемии индуцированной гибели нейронов.

**Астма, Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), кистозный фиброз:** TGF-β1 играет важную роль в патогенезе хронических заболеваний дыхательных путей, особенно при ремоделировании дыхательных путей. Увеличение уровней TGF-β1 было показано у пациентов с тяжелой астмой или эозинофильным воспалением дыхательных путей, что коррелировало с выраженностью субэпителиального фиброза. В модели на мышах снижение TGF-β1 приводит к снижению перибронхиального фиброза, пролиферации гладкомышечных клеток дыхательных путей и выработки слизи. Было показано, что TGF-β1 индуцирует апоптоз в эпителиальных клетках дыхательных путей. Локальная активация TGF-β1, опосредованная интегрином, играет важную роль для развития отека легких при их остром повреждении.

**Другое:** При болезни Альцгеймера (AD) увеличение иммунореактивности TGF-β1 и повышение количества мРНК TGF-β1 коррелирует с отложением бета-амилоидного белка в кровеносных сосудах головного мозга. В ткани мозга больных аутизмом последовательно повышаются уровни провоспалительных хемокинов, в том числе, TGF-β1. У пациентов в острой стадии малярии отмечено снижение уровня TGF-β1 в сыворотке крови. При пародонтите выявлено увеличение уровня TGF-β1 в жидкости, полученной из десневой борозды. У пациентов с мышечной дистрофией Дюшенна отмечено повышение уровня экспрессии TGF-β1 и фиброз. Увеличение активации сигнальной системы TGF-β1 было показано в фибробластах при склеродермии. TGF-β1 является мощным стимулятором синтеза матрикса хондроцитов в сравнении с фиброзированной тканью и, следовательно, может играть важную роль в метаболизме костной ткани (остеоартрит).

Более подробная информация представлена на [www.ThermoFisher.com](http://www.ThermoFisher.com).

### 3. ПРИНЦИП МЕТОДА



Антитела к TGF-β1 человека адсорбированы в лунках микропланшета. TGF-β1 человека, присутствующий в образцах, стандартах и контролях, внесенных в лунки микропланшета, связывается с антителами, адсорбированными в лунках. Антитела к TGF-β1 человека, конъюгированные с биотином, связывают молекулы TGF-β1 человека, захваченные первыми антителами. После инкубации при промывке из лунок удаляются не связавшиеся биотинилированные антитела TGF-β1 человека. В лунки вносится конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (стрептавидин-HRP), который связывает биотин, конъюгированный со вторыми антителами к TGF-β1 человека. После инкубации и промывки из лунок удаляется не связавшийся ферментный конъюгат (стрептавидин-HRP), и в лунки добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора. Реакция останавливается добавлением кислоты. Интенсивность окрашивания, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации TGF-β1 человека, присутствующего в образцах. Концентрация TGF-β1 человека в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта TGF-β1 человека.

### 4. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Набор 96 тестов
96-луночный микропланшет, покрытый моноклональными антителами к TGF-β1 человека, в алюминиевом пакете.	1 планшет
Поликлональные антитела к TGF-β1 человека, конъюгированные с биотином, 120 мкл	1 флакон
Конъюгат стрептавидин-HRP, 150 мкл	1 флакон
Стандарт TGF-β1 человека, лиофилизированный, после разведения 4 нг/мл	2 флакона
Рабочий буфер, концентрат 20x, 5 мл (ФСБ с 1% Твин 20 и 10% БСА)	2 флакона
Буфер для промывок, концентрат 20x (ФСБ, 1% Твин-20), 50 мл	1 флакон
Субстратный раствор (тетраметилбензидин, ТМБ), 15 мл.	1 флакон
Стоп-раствор (1M фосфорная кислота), 15 мл.	1 флакон
Плэнки для заклеивания стрипов	6

Набор human TGF-β1 ELISA BMS232/2CE – 96 тестов  
Набор human TGF-β1 ELISA BMS232/2TENCE – 96 тестов X 10

### 5. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Храните компоненты набора при температуре 2-8°C, за исключением контролей. Храните лиофилизированные контроли при -20°C. Сразу после использования верните реагенты в холодильник (2-8°C) или в морозильник (-20°C), соответственно. Храните до даты, указанной на упаковке реагентов.

Только при соответствующем хранении и, если набор используется для нескольких постановок, исключении контаминации во время предыдущего использования, гарантируется качественная работа реагентов.

## 6. СБОР ОБРАЗЦОВ

Для анализа могут использоваться супернатант клеточных культур\*, сыворотка и плазма (ЭДТА, цитрат, гепарин). Другие биологические образцы также могут быть использованы для проведения анализа. Отделите сыворотку от сгустка эритроцитов после свертывания крови как можно быстрее.

Образцы, содержащие видимый преципитат, необходимо отделить от него до анализа. Не используйте сильно гемолизованные или липемичные образцы.

Во избежание потери биоактивности TGF- $\beta$ 1 человека образцы должны храниться замороженными при  $-20^{\circ}\text{C}$ , предварительно аликвотированными. Если образцы будут протестированы в течение 24 часов, они могут храниться при  $2^{\circ}$  -  $8^{\circ}\text{C}$  (информация по стабильности образцов представлена в соответствующем разделе).

**Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания образцов.** До начала анализа замороженную сыворотку необходимо медленно разморозить и нагреть до комнатной температуры, осторожно перемешивая.

\* Обратите внимание на то, что в бланке образцов супернатанта клеточных культур, содержащих компоненты сыворотки (например, ФТС), сигнал может быть повышен, из-за уровня латентного TGF- $\beta$ 1 сыворотке крови животных.

## 7. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- 1N NaOH и 1N HCl
- Градуированные пипетки на 5 - 10 мл
- Калиброванные пипетки одноканальные переменного объема с одноразовыми наконечниками на 5 – 1000 мкл
- Многоканальные пипетки 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 шейкер
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и фильтром сравнения 620 нм как наиболее оптимальным
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов (линейная регрессия)

## 8. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Со всеми реагентами необходимо обращаться как с потенциально опасными. Работать с данным набором рекомендуется только специально обученному лабораторному персоналу и только в соответствии с принципами хорошей лабораторной практики. Одевайте соответствующую лабораторную защитную одежду, такую как очки и перчатки. Соблюдайте меры предосторожности, чтобы избежать контакта с кожей или глазами. В случае попадания на кожу или глаза немедленно промойте большим количеством воды. Для более подробной специфической информации обращайтесь к листу данных по безопасности и/или документации по безопасности.
2. Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в диагностических или терапевтических процедурах.
3. Не смешивайте реагенты из разных лотов.
4. Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
5. Избегайте воздействия на реагенты сильного источника 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 работе с образцами и реагентами пользуйтесь резиновыми или латексными перчатками для защиты рук.
10. Избегайте контакта субстратного раствора с металлами и окислителями.
11. Избегайте разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей.

ThermoFisher, human TGF- $\beta$ 1 ELISA – BMS249

© Перевод на русский язык ЗАО «БиоХимМак», Москва,

e-mail: [elisa@biochemmack.ru](mailto:elisa@biochemmack.ru)

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. Контакт с 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  $121.5^{\circ}\text{C}$ .
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. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Перед проведением анализа концентраты буферов нагрейте до комнатной температуры и разведите. Если в концентратах буферов образовались кристаллы, аккуратно нагрейте их так, чтобы они полностью растворились.

### 9.1. Разведение Концентрата буфера для промывок

Разведите содержимое флакона (50 мл) концентрата буфера для промывок дистиллированной водой в мерном цилиндре до конечного объема 1000 мл. Перемешайте, избегая вспенивания.

Перенесите буфер для промывок в чистую стеклянную емкость. Храните буфер для промывок при  $2-25^{\circ}\text{C}$ . Буфер для промывок стабилен 30 дней. Буфер для промывок может быть приготовлен в нужном количестве, в соответствии с таблицей.

Таблица. Расход концентрата буфера для промывок.

Количество используемых стрипов	Концентрат буфера для промывок, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

### 9.2. Разведение рабочего буфера (1x)

Хорошо перемешайте концентрат рабочего буфера. Разбавьте 5,0 мл концентрата 95 мл дистиллированной воды в мерном цилиндре до конечного объема 100,0 мл. Перемешайте, избегая вспенивания. Храните рабочий буфер при  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Рабочий буфер стабилен 30 дней. Рабочий буфер может быть приготовлен в нужном количестве, в соответствии с таблицей.

Таблица. Расход концентрата рабочего разбавителя.

Количество используемых стрипов	Концентрат рабочего буфера, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

### 9.3. Приготовление биотинового конъюгата

**Внимание! Разведенный конъюгат должен быть использован в течение 30 минут после приготовления!**

Разведите биотиновый конъюгат 1:100 в Рабочем буфере в чистой пластиковой пробирке, в количестве, необходимом для текущей постановки, в соответствии с таблицей:

Таблица. Разведение биотинового конъюгата

Количество используемых стрипов	Концентрат Биотинового конъюгата, мл	Рабочий буфер, мл
1 -6	0.06	5.94
1 -12	0.12	11.88

### 9.4. Приготовление конъюгата стрептавидин-HRP

**Внимание! Разведенный конъюгат должен быть использован в течение 30 минут после приготовления!**

Разведите стрептавидиновый конъюгат 1:100 в Рабочем буфере в чистой пластиковой пробирке, в количестве, необходимом для текущей постановки, в соответствии с таблицей:

Таблица. Разведение стрептавидинового конъюгата

Количество используемых стрипов	Концентрат Стрептавидинового конъюгата, мл	Рабочий буфер, мл
1 -6	0.06	5.94
1 -12	0.12	11.88

### 9.5 Приготовление Стандарта TGF- $\beta$ 1 человека



Растворите Стандарт TGF-β1 человека, добавив дистиллированную воду. Точный объем указан на этикетке флакона.

Перемешайте осторожно для полного растворения. Концентрация TGF-β1 человека в полученном растворе составит 4 нг/мл. Оставьте раствор при комнатной температуре на 10-30 минут. Тщательно перемешайте перед дальнейшим разведением.

После растворения стандарт не хранится! Неиспользованный стандарт должен быть утилизирован после анализа.

**Разведения стандарта** могут быть приготовлены непосредственно в лунках микропланшета (см. 10.d) или, альтернативно, в пробирках (см. 9.9.1).

### 9.5.1 Приготовление разведений стандарта в пробирках

Напишите 7 пробирок, по одной для каждого стандарта: S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7.

Затем выполните серию двукратных разведений, для получения точек калибровочной кривой, следующим образом:

Внесите по 225 мкл рабочего разбавителя в каждую пробирку.

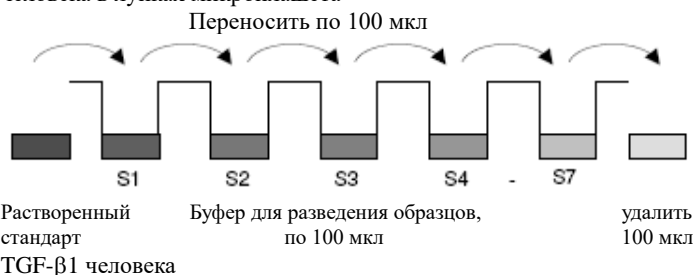
Внесите 225 мкл разведенного стандарта (концентрация = 4 нг/мл) в первую пробирку (S1) и тщательно перемешайте (концентрация стандарта 1 = 2 нг/мл).

Внесите 225 мкл разведения из первой пробирки (S1) во вторую пробирку (S2), и тщательно перемешайте перед следующим переносом (концентрация стандарта 2 = 1 нг/мл).

Повторите серийные разведения еще 5 раз, создав, таким образом, 7 точек калибровочной кривой (см. Рис. 7). Рабочий буфер служит бланком.

из лунок A1 и A2 в лунки B1 и B2, соответственно. Во время этих манипуляций постарайтесь не поцарапать внутреннюю поверхность лунок. Повторите перенос и разведение стандартов еще 5 раз, получив в итоге 2 ряда разведений стандарта TGF-β1 человека в диапазоне 2000-31.3 пг/мл. Удалите по 100 мкл жидкости из последних использованных лунок (G1, G2).

Рис. 3. Приготовление серийных разведений Стандарта TGF-β1 человека в лунках микропланшета



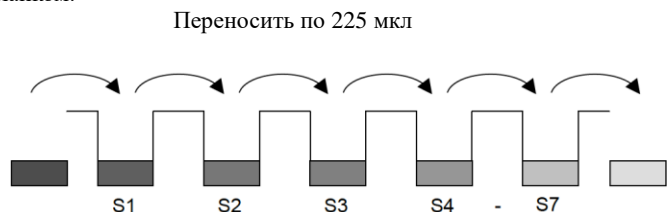
Если разведение стандарта было выполнено в пробирках (см. п.9.5.1), внесите по 100 мкл разведений из пробирок S1 - S7 в лунки микропланшета, предназначенные для стандартов, согласно таблице.

Таблица: Пример внесения образцов, бланка и стандартов в лунки микропланшета

	1	2	3	4
<b>A</b>	Ст #1 (2000 пг/мл)	Ст #1 (2000 пг/мл)	O1	O1
<b>B</b>	Ст #2 (1000 пг/мл)	Ст #2 (1000 пг/мл)	O2	O2
<b>C</b>	Ст #3 (500 пг/мл)	Ст #3 (500 пг/мл)	O3	O3
<b>D</b>	Ст #4 (250 пг/мл)	Ст #4 (250 пг/мл)	O4	O4
<b>E</b>	Ст #5 (125 пг/мл)	Ст #5 (125 пг/мл)	O5	O5
<b>F</b>	Ст #6 (63 пг/мл)	Ст #6 (63 пг/мл)	O6	O6
<b>G</b>	Ст #7 (31 пг/мл)	Ст #7 (31 пг/мл)	O7	O7
<b>H</b>	Бланк	Бланк	O8	O8

Ст – Стандарт, O – образец

- Внесите по 100 мкл Рабочего буфера в дублях в лунки, предназначенные для бланка.
- Внесите в лунки микропланшета для образцов по 60 мкл Рабочего буфера (1x).
- Внесите в соответствующие лунки микропланшета по 40 мкл предварительно разведенных образцов. (**необходимо вортиксировать образцы**)
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C) на микропланшетном шейкере при 400 грм (**инкубация на шейкере необходима для получения точных результатов**).
- Приготовьте **биотиновый конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов» 9.3).
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием (сливом). Промойте лунки 5 раз как указано в этапе «с» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему этапу.
- Внесите по 100 мкл готового раствора **биотинового конъюгата** во все лунки.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C) на микропланшетном шейкере при 400 грм (**инкубация на шейкере необходима для получения точных результатов**).
- Приготовьте **стрептавидин-HRP** (раздел «Приготовление реагентов» п. 9.4).
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием (сливом). Промойте лунки 5 раз как указано в этапе «с» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему этапу.
- Внесите по 100 мкл готового **стрептавидин-HRP** во все лунки, включая бланк.



Растворенный стандарт TGF-β1 человека

Рабочий буфер, по 225 мкл

удалить 225 мкл

## 10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

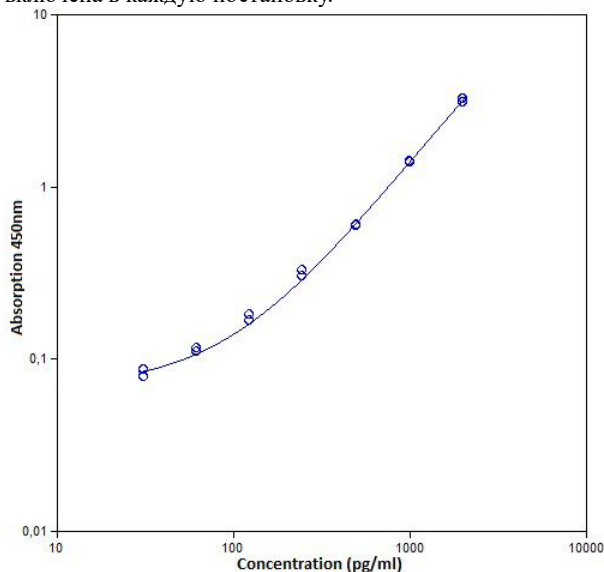
- Перед проведением анализа подготовьте образцы. Разведите образцы сыворотки, плазмы и супернатанта клеточных культур (x10) Рабочим буфером (1x) в соответствии со следующей схемой: 20 мкл образца + 180 мкл Рабочего буфера (1x). Добавьте 20 мкл 1 N раствора HCl в 200 мкл разведенного образца, перемешайте и инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре. Нейтрализуйте добавлением 20 мкл 1 N NaOH. Вортиксуйте!
- 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. **Неиспользованные стрипы** сразу уберите в пакет с осушителем, запечатайте пакет и храните его при 2-8°C.
- Промойте лунки 2 раза примерно 400 мкл Буфера для промывок, полностью удаляя жидкость между промывками. Сделайте паузу на 10 – 15 секунд перед удалением жидкости для «замачивания» лунок буфером. Избегайте царапин на поверхности лунок. 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 лункам высыхать!**
- Разведение стандартов в лунках микропланшета** (Стандарты могут быть разведены в пробирках, см. раздел 9.9.1). Внесите по 100 мкл **Рабочего буфера** во все лунки, предназначенные для стандартов, в дублях. Приготовьте стандартные разведения добавлением по 100 мкл растворенного **стандарта** TGF-β1 человека (см. раздел 9.5), в дублях, в лунки A1 и A2 (см. рисунок 2, таблицу 1, концентрация стандарта S1 – 4000 пг/мл). Перемешайте содержимое лунок A1 и A2 и перенесите по 100 мкл раствора

- p. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C) на микропланшетном шейкере при 400 rpm (**инкубация на шейкере необходима для получения точных результатов**).
- q. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием (сливом). Промойте лунки 5 раз как указано в этапе «с» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему этапу.
- г. Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора** ТМБ во все лунки, включая «Бланк».
- s. Инкубируйте при комнатной температуре (18° - 25°C) в темноте в течение приблизительно 30 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 значение ОП в стандарте 1 достигнет 0.9 – 0.95.
- t. Внесите 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 считайте немедленно после внесения стоп-реагента или в течение 1 часа при условии, что стрипы находились все это время при температуре 2-8°C в темноте.
- u. Определите оптическую плотность всех лунок при 450 нм против «Бланка», желательно 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 лунки «бланк». Абсорбцию определяйте как в тестируемых образцах, так и в стандартах TGF-β1 человека.

## 11. РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитайте результаты. Для этого рассчитайте среднее значение ОП для каждого стандарта и образца из значений дублей. Отклонение от среднего не должно быть больше 20%.
- Используя графическую бумагу, отметьте точки считанных значений ОП стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации TGF-β1 человека на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по среднему из двух точек.
- Для определения концентрации TGF-β1 человека в образцах сначала найдите соответствующее среднее значение абсорбции на оси ординат, затем проведите перпендикулярную оси прямую линию (горизонтально) до пересечения со стандартной кривой. Из точки пересечения проведите вертикальную линию до пересечения с абсциссой, затем считайте соответствующее значение концентрации TGF-β1 человека.
- Для образцов, разведенных согласно инструкции 1:30, (20 мкл образца + 180 мкл Рабочего буфера (1x) + 20 мкл 1N HCl + 20 мкл 1N NaOH и 40 мкл предварительно подготовленного образца + 60 мкл Рабочего буфера) концентрацию, полученную из калибровочной кривой, необходимо умножить на соответствующий коэффициент разведения (x30).
- Замечание: расчёт образцов с оптической плотностью выше стандарта 1 может быть некорректен – результаты определения TGF-β1 человека будут ложно заниженными. Для подобных образцов необходимо выполнить повторный анализ с использованием более высокого разведения Рабочим буфером (1x), для получения результата, отражающего точную концентрацию TGF-β1 человека.
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией TGF-β1 человека. Если значения контроля не укладываются в ожидаемый диапазон, результаты анализа могут быть недостоверны.

- Пример стандартной кривой показан на рисунке 3. Не используйте эту стандартную кривую для расчета концентраций аналита в тестируемых образцах. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.
- Рисунок 3. Пример стандартной кривой для данного метода human TGF-β1 ELISA. Данные представляют среднее значение ОП при серии двукратных разведений Рабочим буфером TGF-β1 человека. Не используйте эту стандартную кривую для расчета концентраций аналита в тестируемых образцах. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.



## Концентрация TGF-β1 человека

Типичные результаты, полученные с использованием human TGF-β1 ELISA:

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	Концентрация TGF-β1 человека, пг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	2000	3.227	3.148	2.5%
		3.068		
2	1000	1.373	1.387	1.0%
		1.402		
3	500	0.587	0.590	0.4%
		0.592		
4	250	0.300	0.313	4.1%
		0.326		
5	125	0.178	0.172	3.5%
		0.166		
6	63	0.109	0.112	2.0%
		0.114		
7	31	0.078	0.082	4.7%
		0.086		
Бланк	0	0.052	0.051	2.0%
		0.050		

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 точные условия могут меняться от анализа к анализу, стандартная кривая должна быть включена в каждую серию анализа.
- Бактериальное или грибковое загрязнение образцов или реактивов, или перекрестное загрязнение реактивов могут 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 удалите промывочный буфер из лунок между циклами промывки. Наполняйте лунки буфером для промывок как это указано, для каждого цикла промывки. Не позволяйте лункам высыхать или оставаться незакрытыми долгий период времени.
- Использование радиоиммунной терапии значительно увеличило число пациентов с человеческими антителами к IgG мыши (НАМА). Наличие НАМА может существенно влиять на результаты анализа, в котором используются моноклональные антитела мыши, приводя к получению как ложно положительных, так и ложно отрицательных результатов. Образцы сыворотки, содержащие антитела к иммуноглобулинам мыши, могут быть протестированы в случае, если иммуноглобулины мыши (сыворотка, асцитная жидкость или моноклональные антитела другой специфичности) добавляются в образец.

### 13. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

#### 13.1. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИЗА

Минимально определяемая концентрация TGF-β1 человека, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 8.6 пг/мл (среднее в 6 независимых экспериментах).

#### 13.2. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

##### 13.2.1 Воспроизводимость внутри одной 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 TGF-β1 человека. При тестировании каждого микропланшета строились 2 стандартные кривые. В таблице приведены средние значения TGF-β1 человека и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 3,2 %.

**Таблица.** Среднее значение концентрации TGF-β1 человека и коэффициент вариации для каждого образца.

Образец	Эксперимент	Средняя концентрация TGF-β1 человека (пг/мл)	Коэффициент вариации (%)
1	1	38237.8	3.6%
	2	39660.8	2.6%
	3	39216.3	0.8%
2	1	20394.0	1.4%
	2	21289.3	3.0%
	3	21513.2	2.5%
3	1	22408.0	2.1%
	2	23957.9	3.4%
	3	24232.4	1.8%
4	1	18901.8	1.7%
	2	19649.6	3.0%
	3	21305.9	8.3%
5	1	4428.0	2.9%
	2	4723.3	2.8%
	3	4670.0	7.1%
6	1	4764.2	3.2%
	2	5063.1	2.5%
	3	4703.2	4.6%
7	1	3357.8	2.2%
	2	3887.2	3.2%
	3	3212.4	5.5%
8	1	4159.7	2.5%
	2	4455.3	2.1%
	3	3924.2	4.5%

##### 13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость внутри между сериями определялась в 3 независимых сериях анализа. В каждый серии анализа было выполнено 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации TGF-β1 человека. При тестировании каждого микропланшета строились 2 стандартные

кривые. В таблице приведены средние значения TGF-β1 человека и коэффициент вариации для каждого образца при 18 определениях. Коэффициент вариации составил в среднем менее 5,8 %.

**Таблица.** Среднее значение концентрации TGF-β1 человека и коэффициент вариации для каждого образца.

Образец	Средняя концентрация TGF-β1 человека (пг/мл)	Коэффициент вариации (%)
1	39038.3	1.9 %
2	21065.5	2.8 %
3	23532.8	4.2 %
4	19952.4	6.2 %
5	4607.1	3.4 %
6	4843.5	4.0 %
7	3485.8	10.2 %
8	4179.7	6.4 %

#### 13.3. ИЗВЛЕЧЕНИЕ ПРИ ОБОГАЩЕНИИ

Извлечение определено при обогащении TGF-β1 человека в 3 разных концентрациях образцов сывороток, плазмы и супернатанта клеточных культур. Извлечение определено при проведении 4 измерений.

Количество эндогенного TGF-β1 человека в необогащенных образцах вычиталось из уровней в обогащенных образцах.

Результаты представлены в таблице 5 ниже.

Образец	Обогащение высокое, %		Обогащение среднее, %		Обогащение низкое, %	
	85	83 - 87	97	96 - 99	96	92 - 101
Сыворотка	85	83 - 87	97	96 - 99	96	92 - 101
Плазма (ЭДТА)	90	80 - 114	84	74 - 97	82	78 - 85
Плазма (цитрат)	108	96 - 122	92	88 - 95	92	88 - 96
Плазма (гепарин)	110	98 - 119	87	87 - 110	93	87 - 100
Супернатант клеточных культур	87	85 - 89	85	84 - 85	95	92 - 98

#### 13.4 ЛИНЕЙНОСТЬ ПРИ РАЗВЕДЕНИИ

Образцы сыворотки, плазмы и супернатанта культур с различными уровнями TGF-β1 человека были проанализированы в 4 повторных сериях двукратных разведений. Результаты представлены в таблице.

Образец	Разведение	Извлечение	Извлечение
		Среднее (%)	Диапазон (%)
Сыворотка	1:60	103	93 - 108
	1:120	112	81 - 128
	1:240	97	75 - 113
Плазма (ЭДТА)	1:60	119	114 - 128
	1:120	129	118 - 142
	1:240	138	127 - 150
Плазма (цитрат)	1:60	108	102 - 113
	1:120	119	110 - 128
	1:240	130	112 - 139
Плазма (гепарин)	1:60	121	112 - 134
	1:120	130	119 - 150
	1:240	126	120 - 131
Супернатант клеточных культур	1:60	95	-
	1:120	103	-
	1:240	118	-

#### 13.5. СТАБИЛЬНОСТЬ ОБРАЗЦОВ

##### 13.5.1 Стабильность при замораживании-оттаивании

Аликвоты сыворотки (обогащенной и необогащенной) хранились при температуре -20°C и размораживались до 5 раз, после чего определялись уровни TGF-β1 человека. Не наблюдалось значительной потери активности TGF-β1 человека.

##### 13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты сыворотки (обогащенной и необогащенной) хранились при температуре -20°C, 2-8°C и при комнатной температуре в течение 24 часов, после чего определялись уровни TGF-β1 человека. Не наблюдалось значительной потери иммунореактивности TGF-β1 человека при хранении при указанных условиях.

### 13.6. Специфичность

Метод позволяет определять как нативный, так и рекомбинантный TGF- $\beta$ 1 человека.

Была протестирована перекрестная реактивность за счет обогащения образцов, содержащих TGF- $\beta$ 1 человека, исследуемыми веществами в физиологически значимых концентрациях.

Перекрестную реактивность не наблюдали ни для одного из следующих тестируемых соединений: TGF- $\beta$ 2 и TGF- $\beta$ 3, и TNF- $\beta$ , IL-8, IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IFN- $\gamma$ , IL12p70, IL-5 и IL-10.

### 13.7 Ожидаемые значения

В панель случайным образом отобранных образцов здоровых доноров (мужчины и женщины) было определено содержание TGF- $\beta$ 1 человека.

Детектируемые уровни TGF- $\beta$ 1 человека представлены в таблице 7.

Образец	Количество образцов	Диапазон (пг/мл)	Среднее (пг/мл)	Стандартное Отклонение (пг/мл)
Сыворотка	16	5222 - 13731	6723	1978
Плазма (ЭДТА)	40	0 – 2644	729	389
Плазма (цитрат)	40	908 – 3378	1726	578
Плазма (гепарин)	40	0 – 377	46	96

## 14. СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

### 14.1 Буфер для промывок

Добавить Концентрат Буфера для промывок 20x (50 мл) в 950 мл дистиллированной воды.

Количество стрипов	Концентрат Промывочного буфера, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

### 14.2 Рабочий буфер

Добавить Концентрат Рабочего Буфера 20x (5 мл) в 95 мл дистиллированной воды.

Количество стрипов	Концентрат Рабочего буфера, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

### 14.3 Биотиновый Конъюгат

Разведите в 100 раз в соответствии с таблицей:

Количество стрипов	Концентрат Биотинового конъюгата, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,06	5,94
1-12	0,12	11,88

### 14.4 Стрептавидин-HRP

Разведите в 100 раз в соответствии с таблицей:

Количество стрипов	Концентрат Стрептавидин-HRP, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,06	5,94
1-12	0,12	11,88

### 14.5. Стандарт TGF- $\beta$ 1

Растворите стандарт TGF- $\beta$ 1 в дистиллированной воде. Необходимый для растворения объем указан на этикетке флакона со стандартом.

## 16. СХЕМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

- Предварительная подготовка: предварительное разведение 1:10 (20 мкл образца + 180 мкл буфера для анализа (1x)), внесите 20 мкл 1 N HCl (см. 7) к 200 мкл предварительно разведенного образца, перемешайте и инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре, внесите 20 мкл 1N NaOH (см. 7) (Вортексуйте!)
- Определите количество стрипов, необходимых для анализа.
- Промойте лунки планшета дважды **Промывочным буфером**
- Разведение стандарта в лунках микропланшета: Внесите 100 мкл рабочего буфера (1x) в дублях во все лунки для стандарта.

Внесите по 100 мкл готового стандарта в первые лунки и проведите разведение стандарта за счет переноса 100 мкл из лунки в лунку. Удалите 100 мкл из последних лунок.

Альтернативно разведение стандартов может быть приготовлено в пробирках (см. 9.5.1): Внесите по 100 мкл этих стандартных разведений в лунки микропланшета.

- Внесите по 100 мкл **Рабочего буфера** в лунки «Бланк».
- Внесите по 60 мкл **Рабочего буфера** во все лунки, предназначенные для Стандартов.
- Внесите по 40 мкл каждого **образца** в дублях в соответствующие лунки (абсолютно необходимо вортексировать образцы).
- Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C) (инкубация на шейкере необходима для получения точных результатов).
- Приготовьте **биотиновый конъюгат**.
- Полностью удалите содержимое лунок и промойте лунки 5 раз **Буфером для промывок**.
- Внесите по 100 мкл готового **биотинового конъюгата**, во все лунки, включая Бланк.
- Закройте микропланшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C) (инкубация на шейкере необходима для получения точных результатов).
- Приготовьте **Стрептавидин-HRP**
- Полностью удалите содержимое лунок и промойте лунки 5 раз **Буфером для промывок**.
- Внесите по 100 мкл **Стрептавидин-HRP** во все лунки.
- Закройте микропланшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C) (инкубация на шейкере необходима для получения точных результатов).
- Полностью удалите содержимое лунок и промойте лунки 5 раз **Буфером для промывок**.
- Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора TMB** во все лунки, включая Бланк.
- Инкубируйте при комнатной температуре (18–25°C) примерно 30 минут
- Внесите по 100 мкл **стоп-раствора** во все лунки, включая Бланк.
- Бланкируйте микропланшетный ридер и определите оптическую плотность всех лунок при длине волны 450 нм.

Для образцов, разведенных согласно инструкции 1:30, (20 мкл образца + 180 мкл Рабочего буфера (1x) + 20 мкл 1N HCl + 20 мкл 1N NaOH и 40 мкл предварительно подготовленного образца + 60 мкл Рабочего буфера) концентрацию, полученную из калибровочной кривой, необходимо умножить на соответствующий коэффициент разведения (x30).



## **Документация и техническая поддержка**

### **Получение технической поддержки**

Для получения последних сведений о сервисах и технической поддержке для всех филиалов посетите [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com). На веб-сайте вы можете:

- Получать номера телефонов и факсов по всему миру для обращения в Службы технической поддержки и продаж
- Найти ответы на часто задаваемые вопросы (FAQs)
- Отправить вопрос непосредственно в службу технической поддержки ([thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support))
- Найти пользовательские документы, SDS, векторные карты и последовательности, приложения, формулировки, справочники, сертификаты анализа, цитирование и другие документы по продукции.
- Получать информацию по обучению клиентов
- Загружать обновления программного обеспечения и исправления

### **Паспорта безопасности (SDS)**

Паспорта безопасности (SDS) доступны на сайте [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).

### **Ограниченная гарантия на продукцию**

Корпорация Life Technologies и/или ее аффилированное лицо (а) гарантируют качество продукции в соответствии с Общими положениями и условиями продаж Life Technologies, которые можно найти на веб-сайте Life Technologies: [www.thermofisher.com/us/en/home/Global/terms-and-conditions.html](http://www.thermofisher.com/us/en/home/Global/terms-and-conditions.html). Если у вас есть какие-либо вопросы, обратитесь в ЗАО «Биохиммак».

## ***Информация для заказа***

***Набор можно заказать в***

***ЗАО «Биохиммак»:***

***119192, г. Москва, Ломоносовский пр.,***

***д.29, стр.1***

***Тел. (495) 6472740,***

***E-mail: [elisa@biochemmack.ru](mailto:elisa@biochemmack.ru)***