

# НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ IP-10 ЛЮДИНИ

## BMS284INST, Human IP-10

Каталог. № : **BMS284INST**  
Кількість : **128**  
Виробник : **Bender MedSystems  
GmbH, (Австрія)**

Методика від **24-09-2012**  
Версія **21**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпасти.

### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Даний набір human IP-10 Instant ELISA призначений для кількісного визначення рівня IP-10 людини в супернатантах клітинних культур, людській сироватці, плазмі, сечі, синовіальній рідині, амніотичній рідині або інших рідинах організму.

**Набір призначений тільки для дослідницьких цілей і не повинен використовуватися в діагностичних процедурах.**

### 2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

### 3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Моноклональні анти-IP-10 антитіла адсорбовані в лунках мікропланшетів.

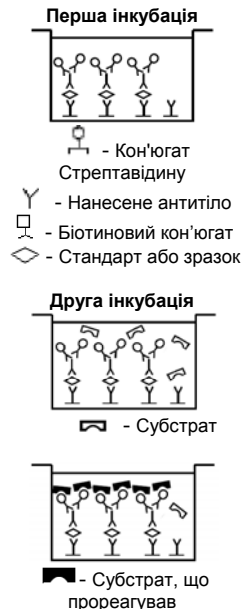
Людські IP-10, присутні у зразку або стандартні, зв'язуються з антитілами, адсорбованими в мікролунках; біотин-кон'юговані моноклональні анти-людські IP-10 антитіла зв'язуються з людськими IP-10, захопленими першим антитілом. Стрептавідин-HRP зв'язується з біотином зв'язаних анти-людських IP-10.

Після інкубації і промивання з лунок видаляються не зв'язані анти-IP-10 антитіла і Стрептавідин-HRP, і в лунки додається субстратний розчин, який взаємодіє з HRP.

Забарвлений продукт утворюється пропорційно до кількості розчинного людського IP-10, присутнього у зразку. Реакція зупиняється додаванням кислоти. Інтенсивність забарвлення вимірюється на довжині хвилі 450 нм. Концентрація IP-10 в зразках визначається за стандартною кривою, побудованої з 7 приготованих розведень стандарту IP-10.

### 4. РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ В НАБОРІ

Реагент	Кількість
96-лунковий мікропланшет з нанесеними Моноклональними антитілами (миші) до людського IP-10, Біотиновий Кон'югат (анти-IP-10 моноклональний антитіла), Розчинник Зразка, і Стрептавідин-HRP, ліофілізований	1 алюмінієвий пакет
Стандартна крива людського IP-10 (кольорова)	2 алюмінієвих пакети
Концентрат Промивного Буфера 20x, 25 мл (Фосфатно-сольовий буфер з 1% Tween 20)	1 флакон
Субстратний Розчин (ТМВ), 15 мл	1 флакон
Розчинник для зразків, 12 мл Використовувати, коли необхідно зовнішнє попереднє розведення зразків	1 флакон
Стоп-розчин (1М фосфорна кислота), 15 мл	1 флакон
Плівки для заклеювання стрипів	2



### 5. ЗБЕРІГАННЯ РЕАГЕНТІВ

Зберігайте мікропланшет і Стандартні криві або весь набір при -20 °C. Можна витягнути мікропланшет і Стандартні криві і зберігати їх окремо при -20 °C, а решту набору зберігати при 2-8 °C. Терміни придатності реагентів і набору зазначені на етикетках.

Тільки при відповідному зберіганні і виключенні контамінації під час попереднього використання набору гарантується якісна робота реагентів.

### 6. ЗАБІР ЗРАЗКІВ

Супернатанти клітинних культур і людська сироватка були протестовані з цим аналізом. Інші біологічні зразки можуть бути придатні для використання в аналізі.

Відокремити сироватку від згустку або еритроцитів якомога швидше після згортання і відділення.

Зверніть увагу на можливий **Хук-ефект** у зв'язку з високим концентраціями зразків (див. розділ 11).

Зразки, що містять видимий осад, необхідно очистити перед використанням в аналізі. Не використовуйте сильно гемолізовані або ліпемічні зразки.

Зразки мають зберігатись замороженими при -20 °C, щоб уникнути втрати біоактивного людського IP-10. Якщо зразки будуть аналізуватися протягом 24 годин, вони можуть зберігатись при 2-8 °C (дані стабільності зразків див. розділ 13).

Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Перед аналізом заморожені сироватки або плазми повинні бути доведені до кімнатної температури повільно і обережно перемішані.

### 7. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Градуировані піпетки на 5 і 10 мл
- Калібровані піпетки одноканальні змінного об'єму з одноразовими наконечниками на 5 - 1000 мкл
- Багатоканальні піпетки змінного об'єму з одноразовими наконечниками на 50 - 300 мкл
- Ванночка для реагентів для використання з багатоканальною піпеткою
- Калібровані склянки, колби, циліндри, необхідні для приготування реактивів
- Ручний або автоматичний промивний пристрій.
- Мікропланшетний рідер з фільтром на 450 нм і, при можливості, фільтром порівняння на 620 нм.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Міліметровий папір або програмне забезпечення для обробки результатів (лінійна регресія).

### 8. ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПРИ ВИКОРИСТАННІ

1. Набір призначений тільки для дослідницьких цілей і не повинен використовуватися в діагностичних або терапевтичних процедурах.
2. Не змішуйте різні лоти і реагенти з різних лотів.
3. Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном зберігання.
4. Уникайте впливу на реагенти сильного джерела світла під час зберігання і інкубації.
5. Не піпетувати ротом.
6. Не можна їсти або курити в місці, де зберігаються реагенти та зразки, або в місці, де проводиться аналіз.
7. Уникайте контакту реагентів зі шкірою та слизовими.
8. При ручному методі аналізу користуйтеся гумовими або латексними рукавичками для захисту рук.
9. Уникайте контакту субстратного розчину з металами і окислювачами.
10. Уникайте розбризкування та утворення аерозолів.
11. Щоб уникнути мікробного забруднення або забруднення реактивами та отримання в результаті недостовірних результатів, користуйтеся одноразовими наконечниками.
12. Використовуйте чистий, спеціально виділений посуд для кон'югатів і субстратного розчину.
13. Для приготування реактивів використовуйте дистильовану або деіонізовану воду.
14. Субстратний розчин повинен мати кімнатну температуру перед використанням.
15. Знезаражувати після роботи зразки, так як вони можуть бути інфіковані, переважно автоклавуванням не менше 1 години при 121.5 °C.
16. Рідкі відходи, що не містять кислоту, і нейтралізовані, необхідно змішати з розчином гіпохлориту натрію таким чином, щоб вийшов в підсумку 1% розчин гіпохлориту. Залиште отриману суміш на 30 хвилин для ефективного знезараження. Рідкі відходи, що містять кислоту, необхідно нейтралізувати до знезараження розчином гіпохлориту натрію.

## 9. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

Концентрат буфера повинен бути доведений до кімнатної температури і розбавлений перед початком процедури. Якщо кристали утворилися в буферному концентраті, злегка розігрійте його до повного розчинення.

### 9.1 Концентрат буфера для промивок

Розведіть 25 мл концентрату Буфера для Промивок дистильованою водою в мірному циліндрі до кінцевого об'єму 500 мл. Перемішайте, уникаючи спінювання.

Перенесіть Буфер для Промивок в чисту скляну ємність. Зберігайте буфер для промивок при 2-25 °С. Буфер для Промивок стабільний 30 днів.

## 10. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

- Використовуйте планшет негайно після того, як його дістали з температурного середовища -20 °С!
- Не чекайте, поки гранули повністю розчиняться перед внесенням зразків - реакція зв'язування в стандартних смужках починається негайно після додавання води!
- Не намагайтеся розчинити гранули піпетуванням вгору/вниз в лунках - якісь частини опадів можуть налипнути на наконечник, викликаючи високу варіабельність результатів.
- Виконуйте крок промивки, використовуючи не менше 400 мкл буфера для промивок, як задано в керівництві, або заповнюйте лунки повністю - в іншому випадку залишки осаду, налипли на краю лунки, НЕ будуть видалені і з'являться причиною високої варіабельності результатів.
- Залиште буфер для промивок в лунках на кілька секунд (замочування) перед аспірацією.
- Видаліть покриття стандартних смужок акуратно, так, щоб усі ліофілізовані гранули залишилися в лунках.

- Визначте за кількістю зразків необхідну для проведення аналізу кількість 8-лункових смужок, плюс одна 8-лункова смужка для бланків і стандартів (кольорова). Кожен зразок, стандарт, бланк та контроль (опційно) необхідно аналізувати в дублях. Невикористані смужки вийміть з тримача і відразу приберіть в пакет з осушувачем, щільно закрийте і зберігайте при -20 °С. Помістіть смужку, що містить калібрувальну криву, в позиції A1/A2 - H1/H2 (див. Таблицю 1).
- Додайте дистильовану воду в усі лунки для стандартів і бланка (від A1, A2 до H1, H2).
- Додайте 140 мкл дистильованої води у всі лунки із зразками.

Таблиця 1: Приклад розташування зразків, бланка і стандартів на планшеті для розведень:

	1	2	3	4
A	Ст #1 (200.0 пг/мл)	Ст #1 (200.0 пг/мл)	3 1	3 1
B	Ст #2 (100.0 пг/мл)	Ст #2 (100.0 пг/мл)	3 2	3 2
C	Ст #3 (50.0 пг/мл)	Ст #3 (50.0 пг/мл)	3 3	3 3
D	Ст #4 (25.0пг/мл)	Ст #4 (25.0пг/мл)	3 4	3 4
E	Ст #5 (12.5 пг/мл)	Ст #5 (12.5 пг/мл)	3 5	3 5
F	Ст #6 (6.3 пг/мл)	Ст #6 (6.3 пг/мл)	3 6	3 6
G	Ст #7 (3.1 пг/мл)	Ст #7 (3.1 пг/мл)	3 7	3 7
H	Бланк	Бланк	3 8	3 8

Ст – Стандарт, 3 - Зразок

- Додайте по 10 мкл **Зразків**, в дублях, у відповідні лунки, призначені для зразків, і перемішайте.
- Закрийте планшет **Плівкою** і інкубуйте 3 години при кімнатній температурі (18-25 °С), якщо можливо, використовуючи орбітальний шейкер, встановлений на 400 об/хв.
- Зніміть **Плівку** і повністю видаліть вміст лунок. Промийте лунки 3 рази, використовуючи по 400 мкл Буфера для Промивок, повністю видаляючи рідину між промивками. Уникайте подряпин на поверхні лунок.  
Струсіть планшет на фільтрувальний папір після останньої промивки. Використовуйте смужки негайно після струшування або максимум через 15 хвилин за умови, що смужки укладені на вологий фільтрувальний папір в перевернутому вигляді. Не дозволяйте лункам висихати!
- Внесіть по 100 мкл **Субстратного Розчину ТМБ** в усі лунки, включаючи «Бланк».
- Інкубуйте при кімнатній температурі близько 10 хвилин, уникайте попадання прямого сонячного світла.

За розвитком забарвлення необхідно спостерігати і субстратна реакція повинна бути зупинена (див. пункт і. Протоколу) до того, як значення оптичної щільності в позитивних лунках перевищать межу визначення приладу. Рекомендується зупиняти реакцію додаванням стоп-розчину тоді, коли найвищий стандарт забарвиться в темно-блакитний колір. Альтернативно, розвиток фарбування можна спостерігати за допомогою ІФА аналізатора при довжині хвилі 620 нм. Субстратна реакція повинна бути зупинена як тільки буде досягнута ОЩ 0.9 - 0.95.

- Додайте по 100 мкл **Стоп-Розчину** в усі лунки, включаючи «Бланк», щоб повністю інактивувати фермент в лунках. Важливо вносити стоп-розчин швидко і з тією ж швидкістю, що і субстратний розчин. Оптичну щільність зчитати негайно після внесення стоп-розчину або протягом 1 години за умови, що смужки перебували весь цей час при температурі 2-8 °С в темноті.
- Визначте оптичну щільність кожної лунки при 450 нм проти «Бланка», бажано використовувати довжину хвилі порівняння 620 нм (допустима довжина хвилі порівняння в діапазоні 610-650 нм). Обнулите мікропланшетний рідер так, як це описано в інструкції виробника, з використанням лунки «Бланк». Абсорбцію визначаєте як в невідомих зразках, так і в стандартах IP-10.

**Зауваження:** якщо інкубація проводилася без струшування, значення можуть бути нижче, ніж у прикладі, наведеному нижче. Тим не менше, ці результати також вважаються достовірними.

## 11. РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

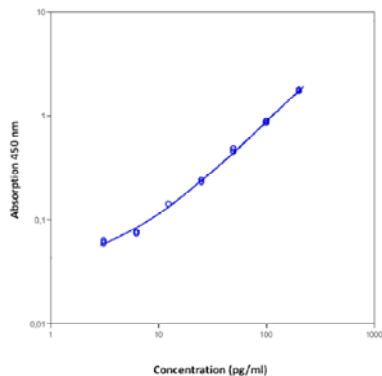
- Розрахуйте результати. Для цього розрахуйте середнє значення щільності для кожного стандарту і зразка. Відхилення від середнього не повинно бути більше 20%.
- Використовуючи графічний папір, відзначте точки значень щільності стандартів на вертикальну вісь Y, а відповідні концентрації IP-10 на горизонтальну вісь X. Проведіть оптимальну криву по точкам.
- Для визначення концентрації IP-10 в зразках спочатку знайдіть відповідне середнє значення абсорбції на осі ординат, потім проведіть перпендикулярну осі пряму лінію (горизонтально) до перетину зі стандартною кривою. З точки перетину проведіть вертикальну лінію до перетину з абсцисою і рахуйте відповідне значення концентрації IP-10.
- \*У ході аналізу зразки були розведені в 10 разів, отже концентрації, отримані з калібрувальної кривої, повинні бути помножені на коефіцієнт розведення (x10).
- Розрахунок зразків з концентрацією що перевищує стандарт 1, може привести до неправильних результатів з низьким рівнем людського IP-10 (можливий Хук-Ефект). Такі зразки вимагають подальшого зовнішнього попереднього розведення відповідно до очікуваних рівнів людського IP-10 з Розчинником зразка для того, щоб точно кількісно визначити фактичний рівень IP-10 людини.
- Кожна лабораторія повинна встановити свій контрольний зразок з відомою концентрацією IP-10 і включати його в кожну постановку. Якщо отримані для контролю значення не укладаються в діапазон очікуваних значень для даного контролю, результати аналізу можуть бути недостовірні.
- Приклад стандартної кривої показаний на Малюнку 4. Не використовуйте цю стандартну криву для розрахунку ваших зразків. Стандартна крива повинна бути включена в кожну постановку.

\* NB: Існує загальний коефіцієнт розведення для стандартів і зразків, який повинен бути врахований при розрахунках. Частка зразків в кінцевому обсязі становить по 100 мкл на лунку. Для лунок із зразками ці 100 мкл складаються з 90 мкл буфера для розведення зразків, плюс 10 мкл зразка. Це розведення в 10 разів.

Решта 50 мкл, що в сумі дають 150 мкл, враховується як 50 мкл кон'югату, у всіх ланках.

90 мкл розчинника зразка та 50 мкл кон'югату в результаті дають 140 мкл розведення, з додаванням 10 мкл зразка (90 мкл + 10 мкл = розведення 1:10)

Малюнок 4. Приклад стандартної кривої для IP-10 ELISA. Була приготовлена серія послідовних дворазових покровових розведень IP-10 робочим буфером. Кожен символ позначає середнє значення з трьох паралельних титрувань. Не використовуйте цю стандартну криву для розрахунку ваших зразків. Стандартна крива повинна бути включена в кожну постановку.



Таблиця 2: Типові результати, отримані з використанням даного набору. Вимірювання на 450 нм. Довжина хвилі порівняння 620 нм.

Стандарт	Концентрація IP-10 пг/мл	О.П. (450 нм)	О.П. середнє	C.V. (%)
1	200.00	1.712 1.773	1.743	1.8
2	10.00	0.854 0.870	0.862	0.9
3	50.0	0.483 0.451	0.467	3.4
4	25.0	0.238 0.229	0.234	1.9
5	12.5	0.140 0.141	0.141	0.4
6	6.3	0.075 0.073	0.074	1.4
7	3.1	0.059 0.062	0.061	2.5
Бланк	0.0	0.036 0.031	0.034	7.5

Значення ОП стандартної кривої можуть змінюватися відповідно до умов проведення тесту. Більш того, термін придатності набору може впливати на інтенсивність кольору. Отримані значення все ж дійсні.

## 12. ОБМЕЖЕННЯ МЕТОДУ

- Так як умови можуть змінюватися від аналізу до аналізу, стандартна крива повинна бути включена в кожну серію аналізу.
- Бактерійне або грибокве забруднення зразків або реактивів, або перехресне забруднення реактивів можуть призвести до недостовірних результатів.
- Переважаючим є використання одноразових наконечників, флаконів, скляного посуду; скляний посуд багаторазового використання повинен бути ретельно вимитий і сліди детергента повинні бути повністю видалені перед використанням.
- Неповна промивка на будь-якому етапі негативно впливає на точність результатів і може привести як до хибно позитивних, так і до хибно негативних результатів. Повністю видаляйте Промивний буфер з лунок між циклами промивки. Наповнюйте лунки буфером для промивки як це зазначено для кожного циклу промивки. Не дозволяйте лункам висихати або залишатися незакритими довгий період часу.
- Використання радіоімунотерапії значно збільшило число пацієнтів з людськими анти-мишачими IgG антитілами (НАМА). НАМА можуть впливати на тести, в яких використовуються мишачі моноклональні антитіла, які призводять до хибно позитивних і хибно негативних результатів. Зразки сироватки, що містять антитіла до мишачого імуноглобуліну, можуть аналізуватися, якщо імуноглобуліни миші (сироватка, асцитична рідина або моноклональні антитіла нерелевантної специфічності) додаються в зразок.

## 13. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

### 13.1 Чутливість

Мінімально визначувана концентрація IP-10, визначена як концентрація аналіту, що дає ОП значно вище ніж буфер для

розведення (середнє плюс 2 стандартних відхилення), склала 1 пг/мл (середнє 6 незалежних визначень).

### 13.2 Відтворюваність

#### 13.2.1 Відтворюваність всередині однієї серії

Відтворюваність всередині однієї серії визначалася в 3 незалежних серіях аналізу. У кожній серії аналізу було виконано 6 визначень кожного з 6 зразків сироватки, що містять різні концентрації IP-10. У кожен планшет були включені по дві стандартні криві. Отримані дані наведені в таблиці нижче. Коефіцієнт варіації склав в середньому 6.7%.

Таблиця 3

Позитивний зразок	Аналіз	Концентрація IP-10, пг/мл	Коеф. Варіації (%)
1	1	1309	5.0
	2	1363	5.0
	3	1499	4.0
2	1	496	6.0
	2	558	8.0
	3	685	1.0
3	1	380	5.0
	2	441	8.0
	3	481	10.0
4	1	462	8.0
	2	519	4.0
	3	581	7.0
5	1	601	8.0
	2	639	6.0
	3	716	10.0
6	1	707	9.0
	2	830	8.0
	3	1063	8.0

#### 13.2.2 Відтворюваність між серіями

Відтворюваність між серіями визначалася в одній лабораторії в 3-х незалежних серіях аналізу, з різними лаборантами. У кожній серії аналізу було виконано 6 визначень кожного з 6 зразків сироватки, що містять різні концентрації IP-10. У кожен планшет були включені по дві стандартні криві. Отримані дані наведені в таблиці нижче. Коефіцієнт варіації був розрахований з 18 визначень кожного зразка і склав у середньому 10.4%.

Таблиця 4

Зразок	Концентрація IP-10, пг/мл	Коеф. Варіації (%)
1	1390	6.0
2	580	13.0
3	434	10.0
4	521	9.0
5	652	7.0
6	867	17.0

### 13.3 Відновлення

Відновлення оцінювали насиченням 4 рівнями людського IP-10 в нормальну сироватку людини. Відновлення були визначено в 3 незалежних експериментах з 6 повторами кожен. Ненасичена сироватка була використана в якості бланка в цих експериментах. Загальне середнє відновлення склало 115%.

### 13.4 Лінійність розведення

4 зразка з різними рівнями IP-10 були проаналізовані в чотирьох дворазових серійних розведеннях по 4 повтори кожен. Діапазон значень склав 92% - 120%, в середньому 107%.

### 13.5 Стабільність зразків

#### 13.5.1 Стабільність при заморожуванні/відтаванні

Аліквоти зразків сироватки зберігали при температурі -20 °C, і відтавали до 5 разів, після чого визначали рівні IP-10. Не спостерігалось значних втрат імунореактивності IP-10 при повторних циклах заморожування/відтавання.

#### 13.5.2 Стабільність при зберіганні

Аліквоти зразків зберігалися при температурі -20 °C, 2-8 °C, кімнатній температурі (RT) і при 37 °C протягом 24 годин, після чого визначали рівні IP-10. Не спостерігалось значних втрат імунореактивності IP-10 при зберіганні при вищевказаних умовах.

### 13.6 Специфічність

Щоб визначити специфічність даного тесту декілька білків були протестовані на перехресну реактивність. перехресної реактивності не спостерігалось.

### 13.7 Очікувані значення

Панель з 16 сироваток від випадково вибраних здорових донорів (чоловіки і жінки) тестувалась на IP-10 людини. Виявлені рівні людського IP-10 коливалася в межах менше 43 і 409 пг/мл із середнім рівнем 145 пг/мл і стандартним відхиленням  $\pm 101$  пг/мл. Вимірні нормальні рівні можуть змінюватися залежно від зразків, які використовуються.



#### **ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР**

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)