



ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЫШИНОГО IL-2

Кат. № : BMS601 / BMS601TEN
Количество тестов : 96, 10 x 96
Производитель : Bender MedSystems GmbH, (Австрия)

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

Методика от 12-07-2012
Версия 22

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор Mouse IL-2 ELISA предназначен для количественного определения мышинового интерлейкина-2 методом твердофазного иммуноферментного анализа. Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.

2. ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин-2 (IL-2) играет важную роль в активации и пролиферации лимфоцитов, премированных антигенами. IL-2 играет ключевую роль в росте большинства Т-клеток, NK-клеток и В-клеток во время определенных фаз их иммунного ответа. Экспрессия гена IL-2 регулируется на транскрипционном уровне несколькими путями активации. Антигенспецифическая пролиферация Т-хэлперов и следующая за этим стимуляция цитотоксических Т-лимфоцитов сильно зависит от уровня экспрессии IL-2, секреции и связывания с рецепторами IL-2, индуцированных аутокринным образом на поверхности Т-клеток.

Кроме своей наиболее важной роли связующего звена для антигенспецифической пролиферации Т-лимфоцитов, IL-2 стимулирует экспрессию интерферона- γ и антигенов главного комплекса гистосовместимости, стимулирует пролиферацию и дифференциацию активированных В-клеток, увеличивает активность NK - клеток и снижает образование колонии гранулоцитов - макрофагов.

Изменения в способности Т-клеток синтезировать IL-2 наблюдались в физиологических и патологических состояниях.

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

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Антитела, специфичные к мышиному IL-2, сорбированы в лунках микропланшета.

Мышиный IL-2, присутствующий в образцах или стандартах, связывается с антителами в лунках планшета. Добавляемый конъюгат биотина с антителами к IL-2 связывает IL-2, захваченный первыми антителами.

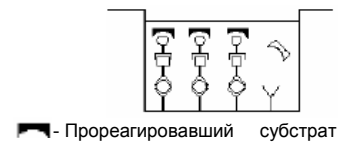
После инкубации и промывки из ячеек удаляется несвязавшийся биотиновый конъюгат, и в ячейки добавляется конъюгат стрептавидин-HRP, связывающийся с биотином, конъюгированным с антителами к мышиному IL-2.



После второй инкубации и промывки из ячеек удаляется несвязавшийся стрептавидиновый конъюгат, и в ячейки добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора.



Реакция останавливается добавлением кислого стоп-раствора. Интенсивность окраски, измеренная при длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации IL-2, присутствующего в образцах. Концентрация IL-2 в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта.



4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты в наборе Мышиный IL-2 ELISA BMS601 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к мышиному IL-2	1 планшет
Биотиновый конъюгат анти-мышинового моноклонального антитела к IL-2 (100 мкл)	1 флакон
Стрептавидин-HRP (150 мкл)	1 флакон
Стандарт IL-2, 2 нг/мл, лиофилизированный	2 флакона
Растворитель для образцов 12 мл	1 флакон
Концентрат Рабочего буфера 5 мл	1 флакон
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 5 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
Красный краситель, 0,4 мл	1 флакон
Плётки для заклеивания стрипов	4

4.2 Реагенты в наборе Мышиный IL-2 ELISA BMS601TEN (10x96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к мышиному IL-2	10 планшетов
Биотиновый конъюгат анти-мышинового моноклонального антитела к IL-2 (100 мкл)	10 флаконов
Стрептавидин-HRP (150 мкл)	10 флаконов
Стандарт IL-2, 2 нг/мл, лиофилизированный	10 флаконов
Растворитель для образцов 12 мл	10 флаконов
Концентрат Рабочего буфера 5 мл	2 флакона
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 5 мл	4 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
Красный краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Плётки для заклеивания стрипов	20

5. ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ – НАБОР ИФА

Храните компоненты набора при температуре 2-8°C. Сразу после использования верните реагенты в холодильник. Храните до даты, указанной на упаковке реагентов.

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.

Стандарт должен быть использован сразу же после разведения и не может быть оставлен на хранение.

6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Культура клеток супернатанта и сыворотка были протестированы с помощью этого анализа. Другие биологические образцы могут быть пригодны для использования в анализе. Отделить сыворотку от сгустка или клеток, как можно скорее после свертывания и разделения.

Обратить внимание на возможный "Хук-эффект", связанный с высокой концентрацией образца (См. 11).

Образцы, содержащие видимый осадок, необходимо очистить перед использованием в анализе. Не используйте сильно гемолизированные или липемические образцы.

Образцы должны быть аликвотированы и должны храниться в замороженном виде при -20 °С, чтобы избежать потери биологически активного Мышиного IL-2. Если образцы будут тестироваться в течение 24 часов, они могут храниться при температуре от 2 до 8 °С (стабильность образца указана в разделе 13.5).

Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания. Перед анализом замороженные образцы должны быть доведены до комнатной температуры медленно и осторожно перемешаны.

7. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Калиброванные пипетки на 5 мл и 10 мл
- Калиброванные пипетки одноканальные переменного объема с одноразовыми наконечниками на 5 – 1000 мкл
- Многоканальные пипетки с одноразовыми наконечниками на 50 – 300 мкл
- Ванночка для реагентов для использования с многоканальной пипеткой
- Калиброванные стаканы и цилиндры, необходимые для приготовления реактивов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, по возможности, фильтром сравнения ≥ 620 нм
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Статистический калькулятор с программным обеспечением 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 кислоту, 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 кислоту, 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 х)

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 х) 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 х)

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 х) 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 Биотиновый Конъюгат

Заметьте, что Конъюгат биотина должен быть использован в течение 30 минут после разведения.

Разбавьте Концентрат Биотинового Конъюгата Рабочим буфером в соотношении 1:100 в чистой пластиковой посуде.

Биотиновый конъюгат может быть приготовлен в необходимом количестве согласно приведенной ниже таблице.

Кол-во стрипов	Биотиновый конъюгат (мл)	Рабочий буфер(1х) (мл)
1-6	0.03	2.97
1-12	0.06	5.94

9.4 Стрептавидин-HRP

Заметьте, что Стрептавидин-HRP должен быть использован в течение 30 минут после разведения.

Провести разбавление 1:200 с рабочим буфером (1 х) как указано в таблице:

Кол-во стрипов	HRP-конъюгат (мл)	Рабочий буфер(1х) (мл)
1-6	0.03	5.97
1-12	0.06	11.94

9.5 Стандарт Мышиного IL-2

Растворите стандарт дистиллированной водой (точный объем стандартного раствора, который должен получиться в результате растворения, указан на этикетке флакона). Оставьте Стандарт на 10-30 минут. Аккуратно перемешайте (концентрация стандарта = 2000 пг/мл).

После использования оставшийся стандарт не может быть оставлен на хранение и должен быть уничтожен.

Разбавленные Стандарты могут быть приготовлены прямо на планшете (См. пункт 10с) или в пробирках (9.5.1).

9.5.1 Внешнее разведение Стандарта

Пометить 7 пробирок, одну для каждой точки стандарта. S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7.

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

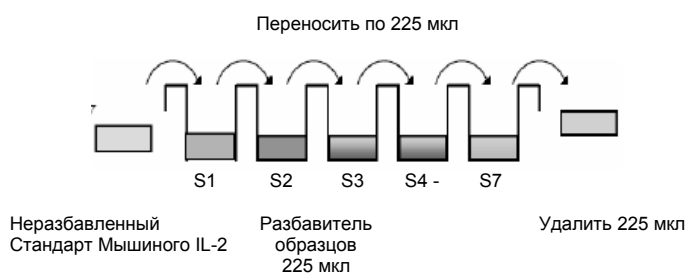
Пипетировать 225 мкл Разбавителя Образцов в каждую пробирку.

Пипетировать 225 мкл восстановленного стандарта (концентрация стандарта = 2000 пг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1 = 1000 пг/мл).

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

Повторить серийные разведения еще 5 раз, таким образом формируя точки стандартной кривой (См. рисунок ниже).

Разбавитель образцов служит в качестве бланка.



9.6 Добавление окрашивающих реагентов: голубого, зеленого и красного

Для исключения ошибок в пипетировании при работе с иммуноферментными наборами фирма Bender MedSystems теперь предлагает дополнительное средство для контроля пипетирования даже очень маленьких объемов реагентов – каждый реагент будет отличаться от других цветом.

Эта процедура **необязательна**, она не влияет на результаты анализа и предназначена для облегчения работы лаборанта, поэтому можно этот шаг инструкции пропустить (не выполнять).

Альтернативно, можно использовать основные растворы красителей (голубой, зелёный, красный), добавляя их к соответствующему реагенту согласно протоколу (смотри Таблицы ниже).

1. Разбавитель образцов: перед разбавлением образцов добавьте **голубой краситель** в соотношении 1:250 (См. Таблицу) в рабочий раствор **Разбавителя образцов** (1x) и выполняйте дальше исследование, следуя инструкции.

5 мл Разбавителя образцов	20 мкл Голубого красителя
12 мл Разбавителя образцов	48 мкл Голубого красителя
50 мл Разбавителя образцов	200 мкл Голубого красителя

2. Конъюгат биотина: перед разбавлением концентрата биотинового 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

3. Стрептавидин-NRP: перед разбавлением концентрата конъюгата стрептавидаина с пероксидазой хрена добавьте **красный краситель** в соотношении 1:250 (смотри таблицу) к Рабочему буферу, используемому для разбавления конъюгата, окрашенный стрептавидиновый конъюгат используйте согласно инструкции.

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

10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

a. 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.

b. 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 высохнуть!**

c. **Приготовление разведений стандарта в лунках микропланшета** (альтернативно разведения стандарта могут быть приготовлены в пробирках – см. 9.5.1):

Внесите по 100 мкл Разбавителя для образцов во все лунки, предназначенные для стандартов. Внесите 100 мкл приготовленного стандарта (см. раздел «Приготовление реагентов», п. 9.5, концентрация = 2000 пг/мл), в дублях, в лунки A1 и A2 (см. Таблицу 1). Перемешайте содержимое лунок A1 и A2 повторным пипетированием (концентрация стандарта 1, S1 = 1000 пг/мл), и перенесите по 100 мкл раствора из лунок A1 и A2 в лунки B1 и B2, соответственно (см. рис. 7). 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 Мышиного IL-2 в диапазоне 1000.0 – 15.6 пг/мл. Удалите по 100 мкл жидкости из последних использованных лунок (G1, G2).

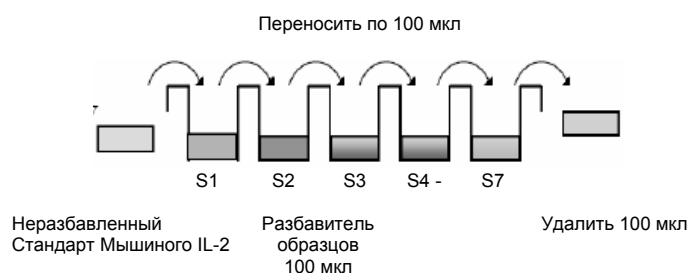


Рисунок 7. Приготовление серийных разведений Стандарта Мышиного IL-2

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 1.

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

	1	2	3	4
A	Ст #1 (1000 пг/мл)	Ст #1 (1000 пг/мл)	O 1	O 1
B	Ст #2 (500 пг/мл)	Ст #2 (500 пг/мл)	O 2	O 2
C	Ст #3 (250 пг/мл)	Ст #3 (250 пг/мл)	O 3	O 3
D	Ст #4 (125 пг/мл)	Ст #4 (125 пг/мл)	O 4	O 4
E	Ст #5 (62.5 пг/мл)	Ст #5 (62.5 пг/мл)	O 5	O 5
F	Ст #6 (31.3 пг/мл)	Ст #6 (31.3 пг/мл)	O 6	O 6
G	Ст #7 (15.6 пг/мл)	Ст #7 (15.6 пг/мл)	O 7	O 7
H	Бланк	Бланк	O 8	O 8

Ст – Стандарт, O – образец

- Внесите по 100 мкл **Разбавителя для образцов** в лунки «Бланк», в дублях.
- Внесите по 50 мкл **Разбавителя для образцов** в лунки, предназначенные для **образцов**.
- Добавьте 50 мкл **каждого образца** в дублях в лунки, предназначенные для **образцов**.
- Приготовьте **Биотиновый конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов» 9.3).
- Добавьте 50 мкл **Биотинового конъюгата** во все лунки.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, то на орбитальном шейкере, установленном на 400 об/мин.
- Приготовьте **Стрептавидин-NRP** (раздел «Приготовление реагентов» 9.4).
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием (сливом). Промойте лунки 3 раза как указано в шаге «b» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Добавьте по 100 мкл **Стрептавидин-NRP** во все лунки, включая бланк.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, то на орбитальном шейкере, установленном на 400 об/мин.
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием (сливом). Промойте лунки 3 раза как указано в шаге «b» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Внесите по 100 мкл **TMB субстрата** во все лунки.
- 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.

- q. 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.
- г. 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 Мышиного IL-2.

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 Мышиного IL-2 на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации Мышиного IL-2 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 Мышиного IL-2 в соответствующей пробе.
- Для образцов, которые были разведены согласно данной инструкции в соотношении 1:2 перед исследованием, концентрация, полученная исходя из стандартной кривой, должна быть умножена на фактор разведения, (x2).
- Расчет концентрации в образцах, где О.П. превышает ОП Стандарта 1 может привести к неверным результатам, занижению уровня Мышиного IL-2. Такие образцы должны быть предварительно разведены в соответствии с ожидаемыми значениями Разбавителем образцов и проанализированы еще раз для получения более точного значения актуального уровня Мышиного IL-2.
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией Мышиного IL-2. Если значения контроля не укладываются в ожидаемый диапазон, результаты анализа могут быть недостоверны.
- Пример стандартной кривой показан на Рисунке 8. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

Рисунок. Пример стандартной кривой для Мышиного IL-2. Мышиный IL-2 был разбавлен в серии двукратных последовательных шагов титрования Разбавителем образцов. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

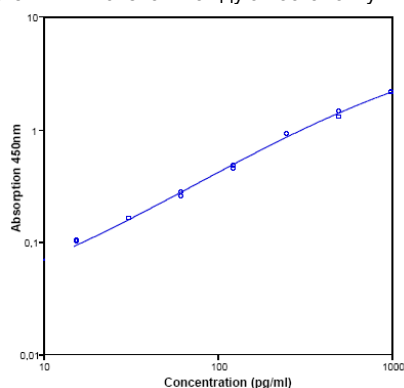


Таблица 2: Типичные результаты, полученные с использованием набора Мышиного IL-2:

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	Концентрация мышиного IL-2 (пг/мл)	ОП при 450 нм	Среднее значение ОП при 450 нм	Коэффициент вариаций (%)
1	1000.0	2,160 2,115	2,138	1,5
2	500,0	1,438 1,271	1,355	8,7
3	250,0	0,902 0,901	0,902	0,1
4	125,0	0,450 0,474	0,463	3,7
5	62,5	0,276 0,255	0,266	5,6
6	31,3	0,160 0,162	0,162	0,9
7	15,6	0,102 0,100	0,102	1,4
Бланк	0,0	0,030 0,035	0,033	10,9

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 высохнуть или оставаться незакрытыми долгий период времени.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

13.1. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИЗА

Предел чувствительности для Мышиного IL-2 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, 6 независимых постановок) и составляет 5.3 пг/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 Мышиного IL-2. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. Коэффициент вариации составил < 5 %.

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 Мышиного IL-2. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. Коэффициент вариации составил < 10 %.

13.3. ИЗВЛЕЧЕНИЕ

Извлечение оценивали, тестируя пулированные образцы, обогащенные 4 различными уровнями Мышиного IL-2. Извлечение определяли в 2 независимых экспериментах в 4 повторениях каждого образца. Извлечение составило в среднем 119%.

13.4. ЛИНЕЙНОСТЬ РАЗВЕДЕНИЯ

4 образца с разными уровнями Мышиного IL-2 были проанализированы в серии двукратных разведений в 4 репликах каждая. Извлечение составило в среднем 109 %.

13.5. СТАБИЛЬНОСТЬ ОБРАЗЦОВ**13.5.1 Стабильность при замораживании-оттаивании**

Аликвоты сыворотки (обогащенные) хранились при температуре – 20°C и размораживались до 5 раз, после чего определялись уровни Мышиного IL-2. Не наблюдалось значительной потери активности Мышиного IL-2 после каждого цикла повторного замораживания-оттаивания.

13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты сыворотки (обогащенные) хранились при температуре – 20°C, 2-8°C, комнатной температуре и при 37°C в течение 24 часов, после чего определялись уровни Мышиного IL-2. Наблюдалась значительная потеря иммунореактивности Мышиного IL-2 при хранении при 37 °C (50 %).

13.6 СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Влияние циркулирующих факторов иммунной системы было оценено путем добавления к образцам сывороток с известной концентрацией Мышиного IL-2 физиологически значимых количеств исследуемых факторов. Не была выявлена перекрестная реактивность.

13.7 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Панель образцов сывороток от случайно взятых мышей были протестированы на содержание Мышиного IL-2. Уровни Мышиного IL-2 обнаружены не были.

13.8 Калибровка

Данный метод прокалиброван с использованием высокоочищенного рекомбинантного мышиного IL-2, который, в свою очередь, был проанализирован в сравнении с Международным Стандартом NIBSC 93/566, и была показана их эквивалентность. NIBSC 93/566 исчисляется в Международных Единицах (МЕ), 1 МЕ соответствует 10 пг IL-2.

15. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)**15.1 Промывочный буфер (1 х)**

Добавить Концентрат Промывочного буфера 20х (50 мл) в 950 мл дистиллированной воды.

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

15.2 Рабочий буфер (1 х)

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

15.3 Биотиновый конъюгат

Количество стрипов	Концентрат Биотинового конъюгата, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

15.4 Стрептавидин-HRP

Количество стрипов	Концентрат HRP-конъюгата, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,03	5,97
1-12	0,06	11,94

15.5 Стандарт мышиного IL-2

Развести лиофилизированный мышиного IL-2 с дистиллированной водой. (Объемы разведения указаны на этикетке флакона со стандартом).

16. ПРОТОКОЛ ТЕСТА (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

1. Определиться с необходимым количеством микролуночных полосок.
2. Промыть ячейки планшета дважды **Промывочным буфером**
3. Разбавление стандартов на планшете: Добавьте по 100 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для Стандартов (в дублях). Пипетировать 100 мкл приготовленного 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.
4. Внесите по 100 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки «Бланк», в дублях.
5. Добавить 50 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для **образцов**.

6. Внесите по 50 мкл **образца** в соответствующие ячейки, в дублях.
7. Приготовьте Биотиновый Конъюгат.
8. Добавьте 50 мкл Биотинового конъюгата во все лунки.
9. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18 – 25°C).
10. Приготовьте **HRP- конъюгат**.
11. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 3 раза **Промывочным буфером**.
12. Добавьте по **100 мкл HRP- конъюгата** во все ячейки.
13. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18 – 25°C).
14. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 3 раза **Промывочным буфером**.
15. Внесите по 100 мкл **ТМВ субстрата** во все ячейки.
16. Инкубируйте при комнатной температуре примерно 10 минут.
17. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки.
18. Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм.

Замечание: Для образцов, разведенных согласно инструкции 1:2 (50 мкл образца + 50 мкл буфера для разведения образцов), концентрацию, полученную из калибровочной кривой, необходимо умножить на соответствующий коэффициент разведения (x2).

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «**ДИАМЕБ**»
Ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua