



ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЫШИНОГО IL-12

Кат. № : BMS616/BMS616TEN
Количество тестов : 96, 10x96
Производитель : Bender MedSystems GmbH, (Австрия)

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

Методика от 12-07-2012
Версия 21

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данный набор предназначен для количественного определения мышинового IL-12. Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.

2. ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин-12 – это плейотропный цитокин, прежнее название – фактор созревания цитотоксических лимфоцитов (CLMF) или фактор, стимулирующий натуральные киллеры (NKSF), который в первую очередь синтезируется стимулированными макрофагами. Был идентифицирован как фактор, продуцируемый линией В-клеток. Между тем, показано, что IL-12 является провоспалительным цитокином, синтезируемым фагоцитами, В-клетками и другими антиген-презентирующими клетками, которые модулируют адаптивный иммунный ответ преимущественно стимулируя продукцию Т-хелперов I типа.

IL-12 влияет на разнообразные биологические эффекты, проявляющиеся в человеческих Т-клетках и натуральных киллерах. Кроме стимуляции развития Th1-клеток и способности активизировать цитолитическую активность он опосредует некоторые из физиологических эффектов, действуя в качестве сильно индуктора синтеза интерферона гамма (IFN γ) и других цитокинов в периферической крови Т- и NK-клетками. IFN γ , в свою очередь, усиливает способность фагоцитов продуцировать IL-12 и другие провоспалительные цитокины. Таким образом, IL-12 стимулирует действие IFN γ по принципу положительной обратной связи, которая представляется важным усиливающим механизмом в воспалительном ответе на инфекции.

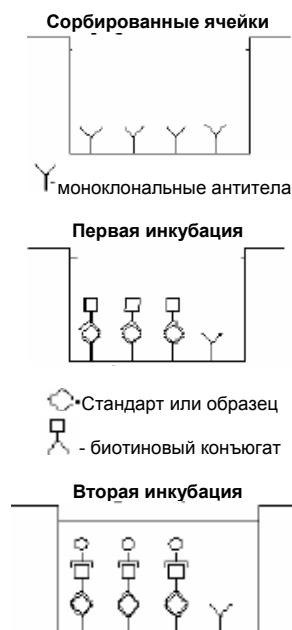
Его роль (в направлении развития Th1-типа иммунного ответа наивных Т-клеток) состоит в регуляции иммунного ответа и предполагает его потенциальное использование в терапии рака.

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Антитела, специфичные к IL-12, сорбированы в ячейках планшета.

Мышиный IL-12 в образце или стандарте связывается с антителами в ячейках планшета. Добавляемый конъюгат Биотин-моноклональные анти-IL-12 антитела связывают IL-12, захваченный первыми антителами.

После инкубации и промывки из ячеек удаляется не связавшийся биотинный конъюгат, и в ячейки добавляется конъюгат стрептавидин-пероксидаза, связывающий биотин,



конъюгированный с IL-12.

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

Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации IL-12, присутствующего в образцах. Концентрация IL-12 в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта.

4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты в наборе Мышиный IL-12 ELISA BMS616 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к мышиному IL-12	1 планшет
Биотинный Конъюгат моноклональных анти-мышинных IL-12 антител, 100 мкл	1 флакон
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 150 мкл	1 флакон
Стандарт, лиофилизированный, 4 нг/мл	2 флакона
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10% BSA), 5 мл	1 флакон
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	1 флакон
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	1 флакон
Стоп-раствор (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-12 ELISA BMS616 TEN (10 x 96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к мышиному IL-12	10 планшетов
Биотинный Конъюгат моноклональных анти-мышинных IL-12 антител, 100 мкл	10 флаконов
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 150 мкл	10 флаконов
Стандарт, лиофилизированный, 4 нг/мл	10 флаконов
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10% BSA), 5 мл	2 флакона
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	5 флаконов
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.

Только при соответствующем хранении и исключении контаминации во время предыдущего использования набора гарантируется качественная работа реагентов.

6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Супернатант культур клеток и сыворотка могут быть использованы для анализа данным методом. Другие биологические образцы также могут быть использованы. Отделите сыворотку от сгустка как можно быстрее.

Обратить внимание на возможный "хук-эффект" в связи с высокой концентрацией образцов (См. раздел 11).

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

Если образцы не будут протестированы в день сбора, то их необходимо аликвотировать, заморозить и хранить при температуре -20 °С или ниже, чтобы предотвратить потерю биоактивности IL-12. Если анализ будет выполнен в ближайшие 24 часа, образцы могут храниться при 2-8 °С.

Избегайте повторных циклов замораживания-размораживания образцов.

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 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 Конъюгат биотина

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

Приготовьте необходимое количество биотинового конъюгата, разведя биотиновый конъюгат в 100 раз рабочим буфером непосредственно перед использованием в чистой пластиковой посуде, согласно таблице:

Кол-во стрипов	Концентрат конъюгата, мл	Рабочий Буфер, 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.

Разбавьте концентрат Конъюгата **Рабочим буфером** в соотношении 1:100 в чистой посуде.

Кол-во стрипов	Стрептавидин-HRP (мл)	Рабочий буфер(1х) (мл)
1-6	0,06	5,94
1-12	0,12	11,88

9.5 Стандарт Мышиного IL-12

Растворите **Мышиный Стандарт IL-12** в дистиллированной воде. Необходимый объем для растворения указан на этикетке флакона, содержащего стандарт. Осторожно перемешивайте до полного растворения. Конечная концентрация полученного раствора составит 4 нг/мл. оставив стандарт на 10-30 минут.

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

Разведения стандарта могут производиться непосредственно на планшете (см. пункт 10с) или альтернативно в пробирках (см. Пункт 9.5.1)

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:

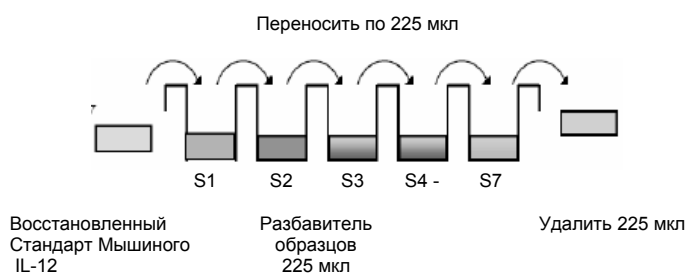
Пипетировать 225 мкл Разбавителя Образцов в каждую пробирку.

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

Рабочий буфер 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
12 мл Рабочего буфера (1 x)	120 мкл Зеленого красителя

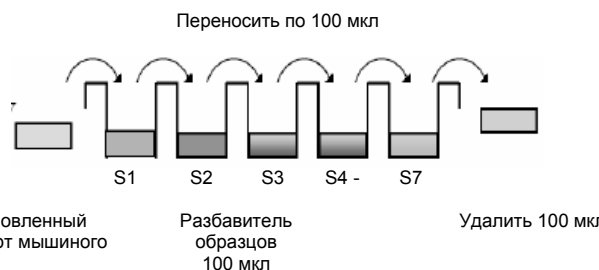
3. Конъюгат стрептавидина: перед разбавлением концентрата конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена добавьте **красный краситель** в соотношении 1:250 (смотри таблицу) к Рабочему буферу, используемому для разбавления конъюгата, окрашенный стрептавидиновый конъюгат используйте согласно инструкции.

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

10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

- a. Все реагенты и образцы перед началом анализа должны быть выдержаны при комнатной температуре. Жидкие реагенты тщательно перемешайте осторожным переворачиванием перед использованием, избегая образования пены. Достаньте требуемое для проведения анализа число 8-луночных стрипов. Поместите требуемое количество стрипов в держатель (к необходимому числу ячеек для Образцов добавьте ячейки для Бланка, Стандартов и Контроля). Все Стандарты, Бланк и Образцы необходимо анализировать в дублях. **Неиспользованные стрипы** сразу уберите в пакет с осушителем и храните плотно закрытым при 2-8°C.
- b. Промойте ячейки 2 раза 400 мкл **Промывочного Буфера**, полностью удаляя жидкость между промывками. Оставить на **10-15 секунд**. Избегайте царапин на поверхности ячеек. Стряхните планшет на фильтровальной бумаге после последней промывки. Используйте стрипы немедленно после стряхивания или максимум через 15 минут при условии, что стрипы уложены на влажную фильтровальную бумагу в перевернутом виде. **Не позволяйте ячейкам высыхать!**
- c. **Разведение стандарта на планшете** (альтернативно разведение стандарта может быть приготовлено в пробирках): Добавьте 100 мкл Разбавителя для образцов в дублях ко всем **стандартам**. Приготовьте стандартные разведения добавлением по 100 мкл разбавленного **Стандарта** (раздел «Приготовление реагентов» 9.5) в ячейки A1 и A2 в дублях (См. табл. 1). Перемешайте содержимое ячеек A1 и A2 и перенесите по 100 мкл раствора из ячеек A1 и A2 в ячейки B1 и B2 соответственно. Во время этих манипуляций постарайтесь не поцарапать внутреннюю поверхность ячеек. Повторите перенос и разведение стандартов 5 раз, получив в итоге 2 ряда

разведенный **Стандарта IL-12** в диапазоне от 2000.0 до 31.3 пг/мл. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).



При **внешнем разведении стандарта** пипетировать 100 мкл этих разведенных стандартов (S1-S2) в лунки для стандартов согласно таблице 1.

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

	1	2	3	4
A	Ст #1 (2000.0 пг/мл)	Ст #1 (2000.0 пг/мл)	O 1	O 1
B	Ст #2 (1000.0 пг/мл)	Ст #2 (1000.0 пг/мл)	O 2	O 2
C	Ст #3 (500.0 пг/мл)	Ст #3 (500.0 пг/мл)	O 3	O 3
D	Ст #4 (250.0 пг/мл)	Ст #4 (250.0 пг/мл)	O 4	O 4
E	Ст #5 (125.0 пг/мл)	Ст #5 (125.0 пг/мл)	O 5	O 5
F	Ст #6 (62.5 пг/мл)	Ст #6 (62.5 пг/мл)	O 6	O 6
G	Ст #7 (31.3 пг/мл)	Ст #7 (31.3 пг/мл)	O 7	O 7
H	Бланк	Бланк	O 8	O 8

Ст – Стандарт, O – образец

- d. Внесите по 100 мкл **Разбавителя образцов** в дубликаты в ячейки «Бланк».
- e. Внесите по 50 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для образцов.
- f. Внесите по 50 мкл каждого **образца** в дублях в соответствующие ячейки.
- g. Приготовьте **биотиновый конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов»).
- h. Добавьте по 50 мкл **биотинового конъюгата** во все ячейки.
- i. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- j. Приготовьте **стрептавидиновый конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов»).
- k. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 4 раза как указано в шаге «с.» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- l. Внесите по 100 мкл разбавленного стрептавидинового конъюгата во все ячейки, включая бланк.
- m. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- n. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 4 раза как указано в шаге «с.» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- o. Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора** ТМБ во все ячейки.
- p. Инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течение примерно 10 минут. Время инкубации с субстратным раствором определяется типом используемого микропланшетного ридера. Многие ридеры способны считать оптическую плотность только до 2,0 Ед оптической плотности.

Для подобных фотометров реакция должна быть остановлена до достижения наиболее ярко окрашенными ячейками предела измерения инструмента.

Рекомендуется добавление стоп раствора, когда наивысший стандарт достиг темно-синего цвета. Реакция должна быть

остановлена как только Стандарт 1 достиг значения ОП 0.9 – 0.95.

- q. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в ячейках. 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 всех ячеек при 450 нм против «Бланка», желательно использовать длину волны сравнения 620 нм (допустима длина волны сравнения в диапазоне 610-650 нм). Бланкируйте микропланшетный ридер согласно руководству производителя, используя ячейки «Бланк». Определите ОП как в ячейках, содержащих образцы, так и в ячейках, содержащих разведения стандарта IL-12.

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 IL-12 на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации IL-12 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 IL-12 в соответствующей пробе.
- В ходе анализа, согласно данной инструкции, образцы были разведены 1:2, следовательно концентрации, полученные из калибровочной кривой, должны быть умножены на коэффициент разведения (x2).**
- Замечание: расчёт образцов с оптической плотностью выше 2.0 может быть некорректен – результаты будут занижаться. Такие образцы необходимо дополнительно развести буфером для разведения и протестировать еще раз, для получения результата, отражающего точную концентрацию IL-12.**
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией IL-12. Если значения контроля не укладываются в ожидаемый диапазон, результаты анализа могут быть недостоверны.
- Пример стандартной кривой показан на Рисунке ниже. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

Рисунок. Пример стандартной кривой для IL-12. IL-12 был разбавлен в серии двукратных последовательных шагов титрования Разбавителем образцов. Здесь представлены средние значения из трех параллельных титрований.

Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

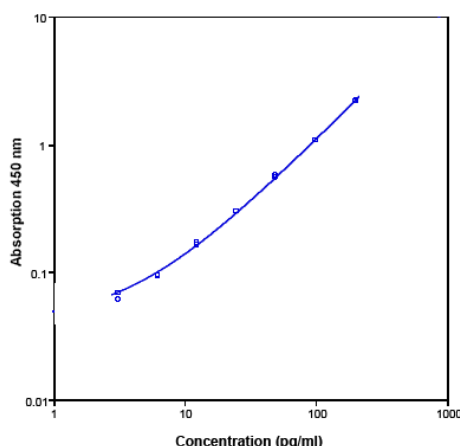


Таблица: Типичные результаты, полученные с использованием данного набора.

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	IL-12, пг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	2000.0	2.029 2.020	2.019	0.2
2	1000.0	1.242 1.287	1.259	1.8
3	500.0	0.787 0.748	0.762	2.5
4	250.0	0.462 0.480	0.466	1.9
5	125.0	0.281 0.292	0.281	1.9
6	62.5	0.158 0.173	0.160	4.5
7	31.3	0.108 0.109	0.109	0.5
Бланк	0	0.041 0.050	0.046	9.9

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

- Так как условия могут меняться от анализа к анализу, стандартная кривая должна быть включена в каждую серию анализа.
- Бактериальное или грибковое загрязнение образцов или реактивов может привести к недостоверным результатам.
- Используйте одноразовые наконечники.
- Стеклопосуда должна быть тщательно вымыта.
- Неполная промывка негативно влияет на точность результатов. Полностью удаляйте Промывочный буфер из ячеек между циклами промывки. Не позволяйте ячейкам высыхать между шагами анализа.
- Использование радиоиммунотерапии значительно увеличило число пациентов с человеческими антимышиными IgG (НАМА). НАМА могут интерферировать в анализе, использующем мышиные моноклональные антитела, приводя к ложно положительным и ложно отрицательным результатам. Образцы сыворотки, содержащие антитела к мышиным иммуноглобулинам, могут быть проанализированы в случае, когда мышиные иммуноглобулины (сыворотка, асцитная жидкость или моноклональные антитела другой специфичности) добавляются к Разбавителю образцов.

13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация мышиного IL-12, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 4.0 пг/мл (среднее 6 независимых определений).

13.2 Воспроизводимость

13.2.1 Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась в 3 независимых сериях анализа. В каждой серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 8 образцов сывороток, содержащих различные концентрации IL-12. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения IL-12 и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил < 5 %.

13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями в одной лаборатории определялась в 3-х независимых сериях анализа тремя разными лаборантами. В каждой серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации IL-12. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения IL-12 и коэффициент вариации для каждого образца, рассчитанный из 18 определений каждого образца. Коэффициент вариации составил < 10 %.

13.3 Извлечение

Извлечение оценивали тестируя 4 образца пулированной мышиной сыворотки, обогащенные 4 разными уровнями IL-12. Количество эндогенного IL-12 в не обогащенной сыворотке вычитали из значений, полученных для обогащенного образца. Извлечение составило в среднем 93 %.

13.4. Линейность

4 образца с различными уровнями мышино IL-12, были проанализированы в двукратных разведениях, по 4 повтора каждого. Показано, что извлечение в среднем составило 104 %.

13.5 Стабильность образцов

13.5.1 Стабильность при замораживании-размораживании

Аликвоты сыворотки (без добавленного IL-12 и с добавлением IL-12) хранились при температуре -20°C , и размораживались 5 раз, после чего определялись уровни IL-12. Не наблюдалось значительных потерь иммуореактивности IL-12 после повторного замораживания-размораживания

13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты сыворотки (без добавленного IL-12 и с добавлением IL-12) хранились при температуре -20°C , $2-8^{\circ}\text{C}$, комнатной температуре и при 37°C в течение 24 часов, после чего определялись уровни IL-12. Не наблюдалось значительных потерь иммуореактивности IL-12 при хранении при температуре -20°C , $2-8^{\circ}\text{C}$ и комнатной температуре. При температуре 37°C наблюдалось потеря иммуореактивности IL-12 около 50%, поэтому следует избегать высоких температур при работе с образцами.

13.6 Специфичность

Влияние циркулирующих факторов иммунной системы было оценено путем добавления к образцам с известной концентрацией IL-12 физиологически значимых количеств исследуемых факторов. Перекрестная реактивность не была выявлена ни для одного исследованного вещества.

13.7 Ожидаемые значения

Детектируемые уровни IL-12 не были обнаружены. Повышенные уровни IL-12 зависят от иммунологического заболевания.

14. ЛИТЕРАТУРА (См. в оригинале инструкции).

15. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

15.1 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

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 Конъюгат биотиновый (1 х)

Приготовить разведение 1:100 согласно таблице:

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

15.4 Конъюгат стрептавидиновый (1 х)

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

15.5 Стандарт

Растворите лиофилизированный стандарт Рабочим буфером (точный объем стандартного раствора, который должен получиться в результате растворения, указан на этикетке флакона).

16. ПРОТОКОЛ ТЕСТА (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

1. Промыть ячейки планшета дважды Промывочным буфером
2. Добавьте по 100 мкл Разбавителя образцов в ячейки, предназначенные для Стандартов (в дублях).
3. Приготовьте стандартные разведения на планшете: добавлением 100 мкл приготовленного Стандарта в ячейки A1 и

A2, создайте разведения стандарта переносом по 100 мкл из ячейки в ячейку. Удалите и выбросите 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).

Альтернативное разведение стандарта в пробирках: пипетировать 100 мкл этих разведений стандарта в лунки.

4. Внесите по 100 мкл Разбавителя образцов в ячейки «Бланк».
5. Внесите по 50 мкл Разбавителя образцов в ячейки, предназначенные для образцов.
6. Внесите по 50 мкл каждого образца в соответствующие ячейки.
7. Приготовьте биотиновый конъюгат.
8. Добавьте по 50 мкл разбавленного биотинового конъюгата, готового для использования, во все ячейки, включая Бланк.
9. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре ($18 - 25^{\circ}\text{C}$).
10. Приготовьте стрептавидиновый конъюгат.
11. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 4 раза Промывочным буфером.
12. Внесите по 100 мкл стрептавидинового конъюгата во все ячейки.
13. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре ($18 - 25^{\circ}\text{C}$).
14. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 4 раза Промывочным буфером.
15. Внесите по 100 мкл Субстратного раствора ТМВ во все ячейки, включая Бланк.
16. Инкубируйте при комнатной температуре примерно 10 минут.
17. Добавьте по 100 мкл стоп-раствора во все ячейки, включая Бланк.
18. Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм против «Бланка», желательнее использовать длину волны сравнения 610-650 нм.

Замечание: Для образцов, разбавленных согласно инструкции, умножьте результат, полученный по стандартной кривой на фактор разведения 2.

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