НАБІР РЕАГЕНТІВ

ІНТЕРФЕРОН ГАММА (МИША) ELISA

Interferon gamma (Mouse) ELISA

Кат. № : ***EIA-5914*** *Дата випуску інструкції:* ***03-2019***
Кількість : ***96*** *Версія* ***1.0***

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

1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Інтерферон гамма (миша) є імуноферментним аналізом для кількісного визначення IFN gamma миші.

Набір ІФА Інтерферон гамма (миша) призначений тільки для досліджень. Не для діагностичних або терапевтичних процедур.

2 ВСТУП

IFN гамма, також називається інтерфероном II типу, є гомодимерним гікопротеїном, що містить приблизно від 21 до 24 kD субодиниць.

На відміну від IFN-альфа та IFN-бета синтезу, які можуть відбуватися в будь-якій клітині, продукція IFN гамма є функцією Т-клітин і NK-клітин. Всі індуктори IFN-гамма активують Т-клітини або в поліклональному (мітогени або антитіла), або в клонально-обмеженому, антиген-специфічному способі.

IFN гамма утворюється під час інфікування Т-клітинами цитотоксичного / супресорного фенотипу (CD8) і підтипом Т-клітин-хелперів, Th1 клітин. Th1 клітини секретують IL-2, IL-3, TNF-бета і IFN-гамма, тоді як Th2-клітини в основному продукують IL-3, IL-4, IL-5 і IL-10, але мало або зовсім не продукує IFN-гамма. IFN гамма переважно інгібує проліферацію Th2, але не Th1 клітини, що вказує на те, що присутність IFN гамма під час імунної відповіді призведе до переважної проліферації клітин Th1.

Тип II IFN або IFN гамма є лімфокіном, який не виявляє молекулярної гомології з IFN типу I, але поділяє деякі важливі біологічні дії. Зокрема, IFN гамма індукує антивірусний стан і є антипроліферативним. Крім того, IFN гамма має кілька властивостей, пов'язаних з імунорегуляцією.

1. IFN гамма є потенційним активатором мононуклеарних фагоцитів, напр. ІФН гамма стимулює експресію Mac-1, збільшує ендоцитоз і фагоцитоз моноцитами; і активує макрофаги для знищення ракових клітин шляхом вивільнення реактивних кисневих інтермедіатів і TNF-альфа (9).
2. ІФН-гамма індукує або збільшує експресію антигенів MHC на макрофагах, Т і В клітинах і деяких лініях ракових клітин.
3. На Т і В-клітинах IFN гамма сприяє диференціації. Він розширює проліферацію активованих В-клітин і може діяти синергічно з IL-2 збільшує синтез імуноглобуліну легкого ланцюга. IFN гама є одним з природних факторів В-клітинної диференціації.
4. І нарешті, IFN гамма активує нейтрофіли, NK-клітини і судинні ендотеліальні клітини.

Роль IFN гамма як маркера захворювання була продемонстрована для ряду різних патологічних ситуацій.

Для оновлення літератури зверніться до drg@drg-diagnostics.de.

3 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Анти-мишаче антитіло гамма-покриття IFN адсорбується на мікролунках.

Мишачий IFN гамма, присутній у зразку або стандарт зв'язується з антитілами, адсорбованими до мікролунок. Біотин, кон'югований анти-мишачим IFN гамма антитілом, доданий і зв'язується з мишачим IFN гамма захопленим першим антитілом.

Після інкубації незв'язані кон'югавані біотином анти-мишачі IFN гамма-антитіла видаляються під час етапу промивання. Стрептавідин-HRP додають і він зв'язується з біотин-кон'югованим анти-мишачим IFN гамма-антитілом.

Після інкубації незв'язаний Стрептавідин-HRP видаляють під час етапу промивання, і розчин субстрату, реактивний з HRP, додають в лунки.

Кольоровий продукт утворюється пропорційно до кількості мишачого IFN гамма, присутнього в зразку або стандарті. Реакцію припиняють додаванням кислоти і вимірюють абсорбцію при 450 нм. Стандартну криву готують з 7 стандартних розведень мишачого IFN гамма і визначають концентрацію зразка мишачого IFN гамма.

4 РЕАГЕНТИ, ЯКІ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

Реагенти для 96 тестів:

1 Алюмінієва упаковка з **планшетом Microwell, покритим** моноклональним антитілом до мишачого IFN гамма
1 Флакон (70 мкл) **біотин-кон'югуване** анти-мишаче IFN гамма моноклональне антитіло
1 Флакон (150 мкл) **Стрептавідин-HRP**
2 Флакони з ліофілізованим мишачим IFN гамма **Стандартом,** 2 нг/мл після розведення
1 Флакон (12 мл) **з Розчинником для зразків**
(Будь ласка, зверніть увагу: у деяких випадках розріджувач зразка містить нерозчинний осад, який жодним чином не заважає виконанню тесту. Використовуйте згідно протоколу.)
1 Флакон (5 мл) 20х **концентрат буферу для аналізу** (PBS з 1 % Tween 20, 10% BSA)
1 Пляшка (50 мл) **концентрат промивного буферу 20х (PBS з 1% Tween 20)**
1 Флакон (15 мл) **Розчин субстрату** (тетраметил-бензидин)
1 Флакон (15 мл) **Стоп розчин** (1М фосфорної кислоти)
4 **Клейкі плівки**

5 ІНСТРУКЦІЇ ЩОДО ЗБЕРІГАННЯ – ІФА НАБІР

Зберігати реагенти набору при температурі 2°C – 8 °C. Відразу після використання реагенти, які залишилися слід повернути в холодне зберігання (від 2 ° C до 8 ° C). Термін дії набору і реагентів вказаний на етикетках.

Закінчення терміну придатності компонентів набору може бути гарантоване лише в тому випадку, якщо компоненти зберігаються належним чином, і якщо в разі повторного використання одного компонента цей реагент не забруднений першою обробкою.

6 ІНСТРУКЦІЇ ЩОДО ЗАБОРУ ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКА

Супернатант клітинної культури і сироватку тестували за допомогою цього аналізу. Для тестування можуть бути придатні інші рідини організму. Видаляють сироватку зі згустку як можна швидше після згортання.

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

Зразки потрібно аліквотувати та зберігати замороженими при температурі -20°C, щоб уникнути втрати біоактивного мишачого IFN гамма. Якщо зразки потрібно запускати протягом 24 годин, вони можуть зберігатися при температурі від 2 ° C до 8 ° C (для стабільності зразка див. 13.5).

Уникайте повторних циклів замороження-розмороження. Перед тестуванням, заморожені зразки потрібно повільно довести до кімнатної температури та обережно перемішати.

7 НЕОБХІДНИЙ МАТЕРІАЛ, ЯКИЙ НЕ ПОСТАЧАЄТЬСЯ

- 5 мл та 10 мл градюйовані піпетки
- від 5 мкл до 1000 мкл регульованих одноканальних мікропіпеток з одноразовими наконечниками
- від 50 мкл до 300 мкл регульовані багатоканальні мікропіпетки з одноразовими наконечниками
- багатоканальний мікропіпетний резервуар
- склянки, фляги, балони, необхідні для приготування реагентів
- пристрій для доставки промивного розчину (багатоканальна промивна пляшка або автоматична промивна система)
- рідер стрипів мікропланшета, здатний читати при 450 нм (620 нм необов'язкова референтна довжина хвилі)
- кришталево-дистильована або деіонізована вода
- статистичний калькулятор з програмою виконання регресійного аналізу

8 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ЩОДО ВИКОРИСТАННЯ

- Всі хімікати повинні розглядатися як потенційно небезпечні. Крім того, рекомендується, щоб цей продукт використовувався тільки особами, які пройшли навчання у лабораторних умовах та використовували його відповідно до принципів доброї лабораторної практики. Використовуйте відповідний захисний одяг, такий як лабораторний комбінезон, захисні окуляри та рукавички. Необхідно дбати про те, щоб уникнути попадання в очі або на шкіру. У разі контакту зі шкірою або очима промийте негайно водою. Дивіться матеріали специфікації паспорта безпеки та/або положення щодо безпеки для конкретних рекомендацій.

Перекладач Романюк Н. П.

- Реагенти призначені тільки для дослідження, але не для діагностичних або терапевтичних процедур.
- Не змішуйте та не замінюйте реагенти на ті, що з інших лотів або інших джерел.
- Не використовуйте реагенти набору після закінчення терміну придатності вказаного на етикетці.
- Не піддавайте реагенти впливу сильного світла під час зберігання або інкубації.
- Не піпетуйте ротом.
- Не їжте і не куріть у місцях, де реагенти набору або зразки обробляються.
- Уникайте контакту шкіри або слизових оболонок з реагентами або зразками набору.
- Резинові або одноразові латексні рукавички слід носити під час роботи з реагентами або зразками.
- Уникайте контакту розчину субстрату з окисниками та металами.
- Уникайте розбризкування або утворення аерозолів.
- Для того, щоб уникнути мікробного забруднення або перехресного забруднення реагентів або зразків, які можуть призвести до недійсності тесту, використовуйте одноразові наконечники піпеток та/або піпетки.
- Використовуйте чисті, спеціальні лотки для кон'югату та реагентів субстрату.
- Вплив на кислоти інактивує кон'югат.
- Для підготовки реагентів слід використовувати кришталево-дистильовану або деіонізовану воду.
- Перед застосуванням розчин субстрату повинен бути кімнатної температури.
- Знезаражувати та утилізовувати зразки як потенційно забруднені матеріали, оскільки вони можуть містити інфекційні агенти. Переважним способом дезактивації є автоклавування протягом мінімум 1 години при 121.5 ° С.
- Рідкі відходи, які не містять кислоти і нейтралізовані відходи, можуть змішуватися з гіпохлоритом натрію в об'ємі, таким чином, щоб кінцева суміш містила 1,0% гіпохлориту натрію. Для ефективного знезараження потрібно 30 хвилин. Рідкі відходи, що містять кислоту, повинні бути нейтралізовані перед додаванням гіпохлориту натрію.

9 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Концентрати буферу повинні бути кімнатної температури та розведені перед початком процедурою тестування. Якщо кристали утворюються у **Буферних Концентратах,** нагрійте їх обережно поки вони повністю не розчиняться.

9.1. Промивний буфер (1х)

Злийте увесь вміст (50 мл) **Концентрату промивного буферу** (20х) у чистий градуйований циліндр 1000 мл. Доведіть до кінцевого об'єму 1000 мл з кришталево-дистильованою або деіонізованою водою.
Обережно перемішайте, щоб уникнути спінювання.
Перемістіть до чистої пляшки та зберігайте при температурі 2°С -25°С. Будь ласка, зверніть увагу, що Промивний буфер (1х) стабільний протя8гом 30 днів.

Промивний буфер (1х) також може бути приготовлений відповідно до наступної таблиці:

К-сть стрипів	Концентрат промивного буферу (20х) (мл)	Дистильована вода (мл)
1 – 6	25	475
1 - 12	50	950

9.2 Буфер для аналізу (1х)

Злити увесь вміст (5 мл) **Концентрованого буферу для аналізу (20х)** у чистий 100 мл градуйований циліндр. Доведіть до кіцевого об'єму 100 мл з дистильованою водою. Обережно перемішайте , щоб уникнути спінювання. Зберігайте при температурі 2°С - 8°С. Будь ласка, зверніть увагу, що буфер для аналізу (1х) стабільний протягом 30 днів.

Буфер для аналізу (1х) також може бути приготовлений відповідно до наступної таблиці:

К-сть стрипів	Концентрат буферу для аналізу (20х) (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

9.3 Кон'югат біотину

Будь ласка, зверніть увагу, що біотин-кон'югат потрібно використати протягом 30 хвилин після розведення.
Розведіть 1:100 концентрованого розчину **Біотин-кон'югату** з буфером для аналізу (1х) у чистій пластиковій пробірці за потребою відповідно до наступної таблиці:

К-сть стрипів	Біотин-кон'югат (мл)	Буфер для аналізу (1х) (мл)
1 - 6	0.03	2.97
1 -12	0.06	5.94

9.4 Стрептавідин - HRP

Зверніть увагу, що Стрептавідин-HRP потрібно використати протягом 30 хвилин після розведення.
Розведіть 1:100 концентрованого розчину **Стрептавідин-HRP** з буфером для аналізу (1х) у чистій пластиковій пробірці за потребою відповідно до наступної таблиці:

К-сть стрипів	Стрептавідин- HRP(мл)	Буфер для аналізу (1х) (мл)
1 - 6	0.06	5.94
1 -12	0.12	11.88

9.5 Мишачий IFN гамма стандарт

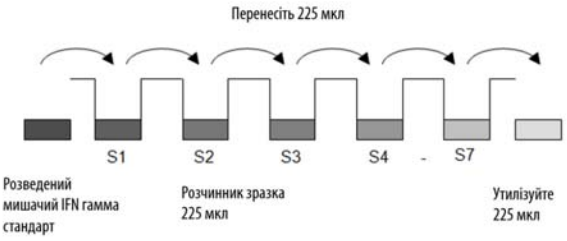
Відновіть **мишачий IFN гамма стандарт** додавши дистильовану воду.
Обсяг відновлення вказаний на етикетці флакону стандарту. Покрутіть або злегка перемішайте, щоб забезпечити повну і однорідну солюбілізацію (концентрація відновленого стандарту = 2 нг/мл).
Дозвольте стандарту відновитися протягом 10-30 хвилин. Добре перемішайте перед виготовленням розведень.
Після використання залишки стандарту не можна зберігати, тому потрібно утилізувати.
Стандартні розведення можуть бути приготовлені безпосередньо на мікропланшеті (див. 10.с) або як альтернатива, в пробірках (див. 9.5.1).

9.5.1 Зовнішнє розведення стандарту

Помітьте 7 пробірок, одну для кожного стандарту.
S1, S2, S3, S3, S4, S5, S6, S7
Потім підготуйте 1:2 серійні розведення для стандартної кривої наступним чином:
Піпетуйте 225 мкл розчинника зразка у кожну пробірку.
Піпетуйте 225 мкл відновленого стандарту (концентрація = 2 нг/мл) у першу пробірку, яка позначена S1, та перемішайте (концентрацію стандарту 1 = 1 нг/мл).
Піпетуйте 225 мкл цього розведення у другу пробірку, яка позначена S2, та ретельно перемішайте до наступного перенесення.
Повторіть серійні розведення ще 5 разів, створюючи таким чином точки на стандартній кривій (див. Малюнок 1).

Розчинник зразка служить як бланк.

Малюнок 1



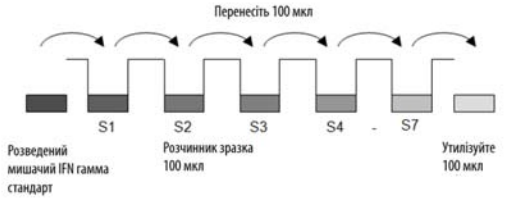
10 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

a) Визначте кількість стрипів мікропланшету необхідних для тестування потрібного числа зразків плюс відповідну кількість лунок для прогону бланків та стандартів. Кожен зразок, стандарт, бланк та вибірковий контрольний зразок повинен аналізуватися в двох примірниках. Видаліть надлишкові стрипи з тримача та зберігайте в пакеті з фольги разом з осушувачем, при температурі 2°С - 8°С щільно запакованими.
b) Промийте стріпи мікропланшету двічі приблизно з 400 мкл **Промивного** буферу на лунку з повною аспірацією вмісту мікролунок між промиваннями. Залишіть промивний буфер в лунках приблизно на **10 – 15 секунд** перед аспірацією.
Будьте обережні, щоб не подряпати поверхню мікролунок.

Після останнього етапу промивання, спорожніть лунки та постукайте стріпами мікропланшету об абсорбуючу підкладку або паперовий рушник, щоб видалити залишки промивного буферу. Використовуйте стріпи мікропланшету негайно після промивання. Як альтернатива, стріпи мікропланшету можна розмістити догори дном на вологопоглинаючому папері не довше ніж на 15 хвилин. **Не дозволяйте лункам висихати.**

c) **Стандартне розведення на мікропланшеті** (як альтернатива, стандартне розведення можна підготувати у пробірках – див. 9.5.1):
Додайте 100 мкл розчинника зразка у двох примірниках до усіх **стандартних лунок.** Піпетуйте 100 мкл підготовленого **стандарту** (див. Підготовка Стандарту 9.5, концентрація = 2000.0 пг/мл), у двох примірниках, у лунку A1 та A2 (див. Таблицю 1). Змішайте вміст лунок A1 та A2 шляхом повторної аспірації та видалення (концентрація стандарту 1 S1 = 1000.0 пг/мл), та перенесіть 100 мкл у лунки B1 та B2, відповідно (див. Малюнок 2). Будьте обережні, щоб не подряпати внутрішню поверхню мікролунок. Продовжуйте цю процедуру 6 разів, створюючи два рядки стандартних розчинів мишачого IFN гамма, що коливаються від 1000.0 до 15.6 пг/мл. Видаліть 100 мкл вмісту з останніх мікролунок (G1, G2), які використовуються.

Малюнок 2



У випадку **зовнішнього розведення стандарту** (див. 9.5.1), піпетуйте 100 мкл цих стандартних розведень (S1 – S7) у стандартні лунки відповідно до Таблиці 1.

Таблиця 1

Таблиця відображає приклад розташування бланків, стандартів та прикладів у стріпах мікролунок:

	1	2	3	4
A	Стандарт 1(1000.0пг/мл)	Стандарт 1(1000.0пг/мл)	Зразок 1	Зразок 1
B	Стандарт 2 (500.0 пг/мл)	Стандарт 2 (500.0 пг/мл)	Зразок 2	Зразок 2
C	Стандарт 3 (250.0 пг/мл)	Стандарт 3 (250.0 пг/мл)	Зразок 3	Зразок 3
D	Стандарт 4 (125.0 пг/мл)	Стандарт 4 (125.0 пг/мл)	Зразок 4	Зразок 4
E	Стандарт 5 (62.5 пг/мл)	Стандарт 5 (62.5 пг/мл)	Зразок 5	Зразок 5
F	Стандарт 6 (31.3 пг/мл)	Стандарт 6 (31.3 пг/мл)	Зразок 6	Зразок 6
G	Стандарт 7 (15.6пг/мл)	Стандарт 7 (15.6пг/мл)	Зразок 7	Зразок 7
H	Бланк (порожня)	Бланк (порожня)	Зразок 8	Зразок 8

d) Додайте 100 мкл **Розчинника зразка** у двох примірниках до порожніх лунок.
e) Додайте 50 мкл **Розчинника зразка** у **лунки зразка.**
f) Додайте 50 мкл кожного **зразка** у двох примірниках у **лунки зразка.**
g) Підготуйте **Біотин-кон'югат** (див. Підготовка Біотин-кон'югату 9.3).
h) Додайте 50 мкл **Біотин-кон'югату** до усіх лунок.
i) Накрийте клейкою плівкою та інкубуйте при кімнатній температурі (18 °C до 25°C) протягом 2 годин, на шейкері мікропланшету встановленому при 400 об/хв.
j) Підготуйте **Стрептавідин-HRP** (див. Підготовка Стрептавідину-HRP 9.4).
k) Зніміть клейку плівку та порожні лунки. **Промийте** стріпи мікропланшету 3 рази відповідно до пункту b) протоколу випробувань. Перейдіть негайно до наступного етапу.
l) Додайте 100 мкл розведеного **Стрептавідину-HRP** у всі лунки, включаючи порожні лунки.
m) Накрийте клейкою плівкою та інкубуйте при кімнатній температурі (18°C до 25°C) протягом 1 години, на шейкері мікропланшетів встановлених при 400 об/хв.
n) Зніміть клейку плівку та порожні лунки. **Промийте** стріпи мікропланшету 3 рази відповідно до пункту b) протоколу випробувань. Перейдіть негайно до наступного етапу.
o) Піпетуйте 100 мкл **Розчину ТМБ субстрату** до усіх лунок.
p) Інкубуйте стріпи мікропланшетів при кімнатній температурі (18°C - 25°C) протягом 10 хвилин. Уникайте прямого впливу інтенсивного світла.

Розвиток кольору на планшеті слід контролювати і реакція субстрату припиняється (див. Наступний пункт цього протоколу) до того, як позитивні лунки більше не будуть належним чином записуватися.
Визначення ідеального періоду часу для розвитку кольору повинно проводитися індивідуально для кожного аналізу.
Рекомендується додати стоп розчин, коли найвищий стандарт має темно-синій колір. Як альтернатива, зразок кольору може контролюватися рідером ELISA при 620 нм. Реакція субстрату повинна бути зупинена, якщо Стандарт 1 досягнув ОЩ 0.9 - 0.95.

q) Зупиніть ферментну реакцію швидку піпетуючи 100 мкл **Стоп Розчину** у кожну лунку. Важливо, щоб стоп розчин розподілявся швидко та рівномірно по лунках мікропланшету до повного інактивування ферменту. Результати слід зчитати негайно після додавання Стоп розчину або протягом години, якщо стріпи мікропланшета зберігаються при 2°C - 8°C у темряві.
r) Зчитайте абсорбцію кожної мікролунки на спектрометрі, використовуючи 450 нм в якості довжини первинної хвилі (необов'язково 620 нм, в якості референтної довжини хвилі; 610 нм до 650 нм є прийнятні). Налаштуйте (0) бланк рідера мікропланшетів відповідно до інструкцій виробника, використовуючи порожні лунки. визначіть абсорбцію зразків і стандартів.

Примітка: У разі інкубації без струшування отримані O.D. значення можуть бути нижчими, ніж вказано. Проте результати все ще дійсні.

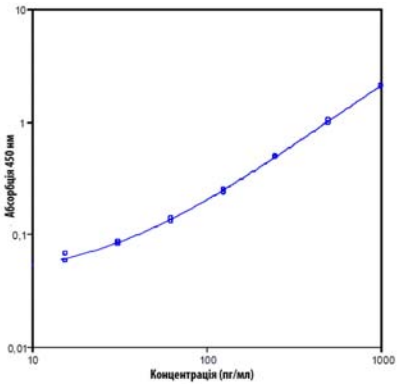
11 ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

- Обчисліть середні значення абсорбції для кожного набору дублікатів стандартів та зразків. Дублікати повинні бути в межах 20 % середнього значення.
- Створіть стандартну криву, шляхом нанесення середньої абсорбції для кожної концентрації на ординату проти концентрації мишачого IFN гамма на абсцисі. Намалюйте кращу криву через точки графіку (рекомендується 5-параметрова крива).
- Для визначення концентрації циркулюючого мишачого IFN гамма для кожного зразка, спочатку знайдіть значення середньої абсорбції на ординаті та витягніть горизонтальну лінію до стандартної кривої. В точці перетину проведіть вертикальну лінію до абсциси та зчитайте відповідну концентрацію мишачого IFN гамма.
- **Якщо дотримувалися інструкцій цього протоколу, зразки були розведені 1:2 (50 мкл зразка + 50 мкл розчинника зразка), а концентрацію прочитану зі стандартної кривої потрібно помножити на коефіцієнт розведення (x2).**
- **Обчислення зразків, концентрації яких перевищують стандарт 1, може призвести до некоректних, низьких рівнів мишачого IFN гамма. Такі зразки потребують додаткового внутрішнього попереднього розведення відповідно до очікуваних значень мишачого IFN гамма з Розчинником зразка для точного кількісного рівня фактичного мишачого IFN гамма.**
- Передбачається, що кожне тестування встановлює контрольний зразок відомої концентрації мишачого IFN гамма та виконує цей додатковий контроль з аналізом. Якщо отримані значення не входять в очікуваний діапазон контролю, результати аналізу можуть бути недійсними.
- Репрезентативна стандартна крива показана на Мал. 3. Ця крива не може бути використана для отримання результатів тестування. Кожна лабораторія повинна підготувати стандартну криву для кожної групи аналізованих стрипів мікропланшету.

Малюнок 3

Репрезентаційна стандартна крива для Інтерферону гамма (мишачий) ELISA. Мишачий IFN гамма розбавляли послідовними 2-кратними стадіями у Розчиннику зразка. Не використовуйте цю стандартну криву для отримання результатів аналізу. Стандартна крива повинна бути запущена для кожної групи аналізованих мікролункових стрипів.

Перекладач Романюк Н. П.



Таблиця 2

Типові дані, що використовують Інтерферон гамма (Мишачий) ELISA
Довжина хвилі вимірювання: 450 нм, Референтна довжина хвилі: 620 нм

Стандарт	Конц. мишачого IFN гамма (пг/мл)	ОЩ при 450 нм	Середня О.Щ. при 450 нм	КВ (%)
1	1000.0 1000.0	2.076 2.055	2.066	0.7
2	500.0 500.0	1.027 0.968	0.998	4.2
3	250.0 250.0	0.487 0.493	0.490	0.9
4	125.0 125.0	0.246 0.236	0.241	2.9
5	62.5 62.5	0.129 0.138	0.134	4.8
6	31.3 31.3	0.082 0.085	0.084	2.5
7	15.6 15.6	0.067 0.058	0.063	10.2
Бланк		0.035 0.026	0.031	

Значення ОЩ стандартної кривої можуть змінюватися залежно від умов проведення аналізу (напр. оператор, техніка піпетування, техніка промивання або температурні ефекти). Більше того, термін придатності набору може впливати на ферментативну активність і, таким чином, на інтенсивність кольору. Виміряні значення досі дійсні.

12 ОБМЕЖЕННЯ

- Оскільки точні умови можуть змінюватися від аналізу до аналізу, стандартну криву потрібно встановити для кожного запуску.
- Бактеріальне або грибкове забруднення екрану зразків або реагентів, або перехресне забруднення між реагентами можуть призвести до неправильних результатів.
- Одноразові наконечники для піпеток, колби або скляна посуда, багаторазовий скляний посуд необхідно прополоскати та ретельно промити з усіма миючими засобами перед використанням.
- Неправильне чи недостатнє промивання на будь–якому етапі процедури до хибно-позитивних результатів або хибно-негативних результатів. Повністю спорожніть лунки перед внесенням свіжого промивного розчину, наповніть промивним буфером як зазначено для кожного циклу промивання та не дозволяйте лункам бути непокритими або сухими протягом тривалого періоду часу.

13 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1 Чутливість

Межа виявлення мишачого IFN гамма визначена як концентрація аналіту, що виникає в результаті абсорбції значно вищої ніж, розведення середнього (середнє плюс 2 стандартних відхилення) було визначено як 5.3 пг/мл (середнє 6 незалежних тестувань).

13.2 Відтворюваність

13.2.1. В аналізі

Відтворюваність в аналізі оцінювали у 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повторами 8 зразків сироватки, які містили різні концентрації мишачого IFN гамма. 2 стандартні криві запускалися на кожному планшеті. Розрахований загальний коефіцієнт внутрішньо аналітичної варіації становив < 5%.

13.2.2 Між аналізами

Відтворюваність між аналізами в межах однієї лабораторії оцінювали у 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повторами 8 зразків сироватки, які містили різні концентрації мишачого IFN гамма. 2 стандартні криві запускали на кожному планшеті. Розрахований загальний коефіцієнт внутрішньо аналітичної варіації становив < 10%.

13.3 Ступінь вилучення

Ступінь вилучення оцінювали за рахунок збільшення 4 рівнів мишачого IFN гамма в об'єднану мишачу сироватку. Відновлення визначені у 2 незалежних експериментах з 4 повторами кожен.
У цих експериментах в якості порожніх використовували непідсилену сироватку.
Загальне середнє відновлення становило 76%.

13.4 Паралелізм розведення

4 зразки сироватки з різними рівнями мишачого IFN гамма аналізували при 2 розрядних розведеннях з 4 повторами кожен.
Загальне середнє відновлення становило 107%.

13.5 Стабільність зразка

13.5.1 Стабільність заморожування-розморожування

Аліквоти контрольних зразків сироватки зберігали при -20°C та розморожували 5 разів та визначали рівні мишачого IFN гамма. Не було значної втрати мишачого IFN гамма імунореактивності визначеного шляхом заморожування і розморожування.

13.5.2 Стабільність зберігання

Аліквоти контрольних зразків сироватки зберігали при температурі -20 °C, 2°C - 8°C, кімнатна температура (КТ) і при 37°C, та рівень мишачого IFN гамма визначали через 24 години. Не було значної втрати імунореактивності мишачого IFN гамма визначеного під час зберігання за вищевказаних умов.

13.6 Специфічність

Вплив циркулюючих факторів імунної системи оцінювали додаючи ці білки до фізіологічно значущих концентрацій у позитивну сироватку мишачого IFN гамма. Не виявлено перехресної реактивності.

13.7 Очікувані значення

Не знайдено виявлених рівнів мишачого IFN гамма.
Підвищений рівень мишачого IFN гамма залежить від типу імунологічного розладу.

14 РЕЗЮМЕ ПІДГОТОВКИ РЕАГЕНТІВ

14.1 Промивний буфер (1x)

Додайте **20x Концентрат промивного буферу** (50 мл) до 950 мл дистильованої води.

К-сть стрипів	Концентрат промивного буферу (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	25	475
1 -12	50	950

14.2 Буфер аналізу (1x)

Додайте **концентрат буфера аналізу 20 x** (5 мл) до 95 мл дистильованої води.

К-сть стрипів	Концентрат буферу аналізу (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	2.5	47.5
1 -12	5.0	95.0

14.3 Біотин-кон'югат

Зробіть 1:100 розведення біотин-кон'югату у буфері аналізу (1x):

К-сть стрипів	Біотин-кон'югат (мл)	Буфер аналізу (1x) (мл)
1 - 6	0.03	2.97
1 -12	0.06	5.94

14.4 Стрептавідин-HRP

Зробіть 1:100 розведення **Стрептавідин-HRP** у буфері аналізу (1x):

К-сть стрипів	Стрептавідин-HRP (мл)	Буфер аналізу (1x) (мл)
1 - 6	0.06	5.94
1 -12	0.12	11.88

14.5 Мишачий IFN гамма стандарт

Відновіть ліофілізований **мишачий IFN гамма стандарт** дистильованою водою. Об'єм розчину вказаний на етикетці флакону стандарту.)

15 РЕЗЮМЕ ПРОТОКОЛУ АНАЛІЗУ

1. Визначте необхідну кількість стрипів мікропланшету.
2. Промийте стрипи мікропланшету двічі з промивним буфером.
3. Стандартне розведення на мікропланшеті:
   Додайте 100 мкл розчинника зразка, у двох примірниках, до усіх стандартних лунок. Піпетуйте 100 мкл приготовленого стандарту у перші лунки та створіть стандартні розведення переносячи 100 мкл з лунки до лунки. Утилізуйте 100 мкл з останніх лунок.

   Альтернативно зовнішнє стандартне розведення у пробірках (див. 9.5.1):
   Піпетуйте 100 мкл цих стандартних розведень у стрипи мікропланшету.
4. Додайте 100 мкл розчинника зразка, у двох примірниках, у порожні лунки.
5. Додайте 50 мкл розчинника зразка у лунки для зразка.
6. Додайте 50 мкл зразка у двох примірниках, до визначених лунок зразка.
7. Приготуйте Біотин-кон'югат.
8. Додайте 50 мкл біотин-кон'югату до усіх лунок.
9. Накрийте стрипи мікропланшету та інкубуйте 2 години при кімнатній температурі (18 °C - 25°C).
10. Підготуйте Стрептавідин –HRP.
11. Опорожніть та промийте стрипи мікропланшета тричі з промивним буфером.
12. Додайте 100 мкл розведеного стрептавідину-HRP до усіх лунок.
13. Накрийте стрипи мікропланшету та інкубуйте 1 годину при кімнатній температурі (18°C до 25°C).
14. Опорожніть та промийте стрипи мікропланшета тричі з промивним буфером.
15. Додайте 100 мкл ТМБ Субстрату розчину до усіх лунок.
16. Інкубуйте стрипи мікропланшета приблизно протягом 10 хвилин при кімнатній температурі (18°C до 25°C).
17. Додайте 100 мкл стоп розчину до усіх лунок.
18. Налаштуйте мікропланшетний рідер на 0 та виміряйте інтенсивність кольору при 450 нм.

Примітка: якщо дотримуватися інструкцій в цьому протоколі, зразки розбавляють 1 :2 (50 мкл зразка + 50 мкл розчинника для зразка), а концентрацію зчитану зі стандартної кривої потрібно помножити на коефіцієнт розведення (x 2).

СИМВОЛИ, ЯКІ ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ

Символ	
CE	Європейської відповідності
	Прочитайте інструкцію щодо використання*
IVD	Пристрій для діагностики *in vitro*
REF	№ в каталозі *
LOT	№ партії*
Σ	Достатньо для <n> тестів*
	Обмеження температури*
	Використати до *
	Виробник*
	Увага*
RUO	Тільки для дослідження
Distributed by	поширюється
Content	Вміст
Volume/No.	Об'єм/ №

ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drg@drg-diagnostics.de

УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua