

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IL15 ЛЮДИНИ

ELH-IL15, Human IL15 ELISA

Каталог. №: **ELH-IL15**

Методика від **12-03-2014**

Кількість : **96**

Виробник : **RayBiotech, Inc. (США)**



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

I. ВСТУП

(Див. оригінал інструкції).

Набір RayBio® Human IL-15 ELISA є імуоферментним аналізом для кількісного визначення людського IL-15 в сироватці, плазмі (забір плазми проводити з використанням ЕДТА або гепарину в якості антикоагулянту; цитратна плазма не рекомендується для використання в цьому аналізі), і супернатанті культури клітин. Цей аналіз використовує антитіло, специфічне для людського IL-15, нанесеного в 96 лунках планшета. Стандарти і зразки пікетуються в лунки, і IL-15, присутній у зразку, зв'язується з лунками іммобілізованим антитілом. Лунки промивають і додаються біотинильовані антитіла антилюдського IL-15. Після вимивання незв'язаного біотинильованого антитіла в лунки піпетується HRP-кон'югований стрептавідин. Лунки знову промивають, в лунки додається розчин субстрату TMB і відбувається фарбування в пропорції до кількості зв'язаних IL-15. Стоп-розчин змінює колір з синього на жовтий, і інтенсивність кольору вимірюється при 450 нм.

II. РЕАГЕНТИ

1. Мікропланшет IL-15 (елемент А): 96 лунок (12 стрипів x 8 лунок), покритих анти-людським IL-15.
2. Концентрат промивного буфера (20x) (елемент В): 25 мл 20x концентрованого розчину.
3. Стандарт білка (елемент С): 2 флакона людського IL-15. 1 флакона достатньо, щоб запустити кожен стандарт в дублях.
4. Антитіла виявлення IL-15 (елемент F): 2 флакона біотинильованого анти-людського IL-15 (кожен флакон є достатнім для аналізу половини мікропланшета).
5. Концентрат HRP-стрептавідин (елемент G): 200 мкл 200x концентрату HRP-кон'югованого стрептавідину.
6. Реагент TMB однокрокового субстрату (елемент H): 12 мл 3,3', 5,5' -тетраметилбензидину (ТМБ) в буферному розчині.
7. Стоп-розчин (елемент I): 8 мл 0.2 М сірчаної кислоти.
8. Розчинник для аналізів А (елемент D): 30 мл буфера для розведення, 0.09% азиду натрію в якості консерванту.
9. Розчинник для аналізів В (елемент Е): 15 мл концентрованого буфера 5X.

III. ЗБЕРІГАННЯ

Може зберігатися до 6 місяців при 2-8 °С від дати відвантаження. Відкриті мікропланшетні лунки або реагенти можуть зберігатися протягом 1 місяця при 2-8 °С. Повернути невикористані лунки в пакет з осушувачем, запечатати уздовж усього краю.

Примітка: набір може бути використаний протягом одного року, якщо він зберігався при -20 °С. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.

IV. НЕОБХІДНІ ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ

1. Мікропланшетний рідер, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм.
2. Точні піпетки об'ємом від 2 мкл до 1 мл.
3. Регульовані піпетки об'ємом 1-25 мл для приготування реагентів.
4. 100 мл і 1 л градуйовані циліндри.
5. Фільтрувальний папір.
6. Дистильована або деіонізована вода.
7. Логарифмічний міліметровий папір або програмне забезпечення для аналізу даних ELISA.
8. Пробірки для підготовки розведення стандарту або зразка.

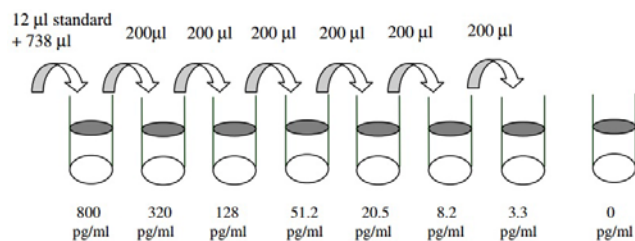
V. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Доведіть всі реагенти і зразки до кімнатної температури (18-25 °С) перед використанням.
2. Розчинник для зразків В (елемент Е): слід розбавити в 5 раз деіонізованою або дистильованою водою перед використанням.

3. Розведення зразків: Розчинник для аналізів А (елемент D) повинен бути використаний для розведення зразків сироватки і плазми. 1X Розчинник для аналізів В (елемент Е) використовується для розведення зразків супернатанта культури клітин. Рекомендоване розбавлення для нормальної сироватки/плазми – в 2 рази. Зібрати плазму використовуючи гепарин та/або ЕДТА в якості антикоагулянту. Цитрат не рекомендується.

Примітка: Рівні IL-15 можуть змінюватися між різними зразками. Оптимальні коефіцієнти розбавлення для кожного зразка має визначити оператор.

4. Приготування стандарту: Злегка потрясти флакон з елементом С. Додати 400 мкл Розчинника для аналізів А (для зразків сироватки/плазми) або 1X Розчинника для аналізів В (для зразків супернатанта культури клітин) у флакон з елементом С для приготування 50 нг/мл стандартного розчину. Повністю розчинити порошок ретельним обережним перемішуванням. Додати 12 мкл стандарту IL-15 з флакона елемента С в пробірку з 738 мкл Розчинника для аналізу А або 1X Розчинника для аналізів В для приготування 800 пг/мл стандартного розчину. Внесіть 300 мкл Розчинника для аналізу А або 1X Розчинника для аналізів В в кожну пробірку. Використовуйте стандартний розчин для отримання серії розбавлень (див. Нижче). Ретельно перемішувати кожну пробірку перед наступною передачею. Розчинник для аналізу А або 1X Розчинник для аналізів В служить в якості нульового стандарту (0 пг/мл).



5. Якщо Промивний Концентрат (20x) (елемент В) містить видимі кристали, нагріти його до кімнатної температури і обережно перемішати до повного розчинення. Розвести 20 мл Концентрату Промивного Розчину деіонізованою або дистильованою водою до отримання 400 мл 1X Промивного Буфера.
6. Швидко покрутити флакон з Антитілами Виявлення (елемент F) перед використанням. Додати 100 мкл 1X Розчинника для аналізів В (елемент Е) в пробірку для приготування концентрату антитіл виявлення. Піпетувати вгору і вниз, щоб акуратно перемішати (Концентрат можна зберігати при температурі 4 °С протягом 5 днів). Концентрат антитіл виявлення повинен бути розведений в 80 разів з 1X Розріджувачем для аналізу В і використаний в кроці 4 частини VI "Процедура аналізу".
7. Швидко покрутити флакон з концентратом HRP-стрептавідину (елемент G) і піпетувати вгору і вниз, щоб акуратно перемішати перед використанням. Концентрат HRP-стрептавідину повинен бути розведений в 200 разів з 1X Розчинником для аналізу В (елемент Е).

Наприклад: Швидко покрутити флакон (елемент G) і піпетувати вгору і вниз, щоб акуратно перемішати. Додати 60 мкл Концентрату HRP-стрептавідину в пробірку з 12 мл 1X Розчинника для аналізу В для приготування остаточного 200-кратного розведення розчину HRP-стрептавідину (не зберігати розведений розчин для використання на наступний день). Добре перемішати.

VI. ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

1. Привести всі реагенти і зразки до кімнатної температури (18-25 °С) перед використанням. Рекомендується, щоб всі стандарти і зразки були проаналізовані, щонайменше, в дублях.
2. Додати 100 мкл кожного стандарту (див. Підготовка реагентів крок 3) і зразка у відповідні лунки. Накрити лунку і інкубувати протягом 2,5 годин при кімнатній температурі або протягом ночі при 4 °С при обережному струшуванні.
3. Видалити розчин і промити 4 рази з 1X розчином для промивання. Вимийте кожну лунку за допомогою наповнення Промивним Буфером (300 мкл) з використанням багатоканальної піпетки або авто промивного пристрою. Повне видалення рідини на кожній стадії є необхідною умовою хорошої роботи. Після останньої промивки, видалити залишки промивного буфера шляхом аспірації або декантації. Перевернути планшет і промокнути чистими паперовими рушниками.
4. Додати 100 мкл 1X підготовлених біотинильованих антитіл (Підготовка реагентів крок 6) у кожну лунку. Інкубувати протягом 1 години при кімнатній температурі з обережним струшуванням.

- Видалити розчин. Повторити промивку як в кроці 3.
- Додати 100 мкл приготованого Розчину Стрептавідину (див. Підготовка реагентів крок 7) у кожну лунку. Інкубувати протягом 45 хвилин при кімнатній температурі з обережним струшуванням.
- Видалити розчин. Повторити промивку як в кроці 3.
- Додати 100 мкл реагенту однокрокового Субстрату TMB (елемент Н) в кожну лунку. Витримати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі в темряві з легким струшуванням.
- Додати 50 мкл стоп-розчину (елемент І) у кожну лунку. Зчитати результат при 450 нм негайно.

VII. СУМАРНА ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

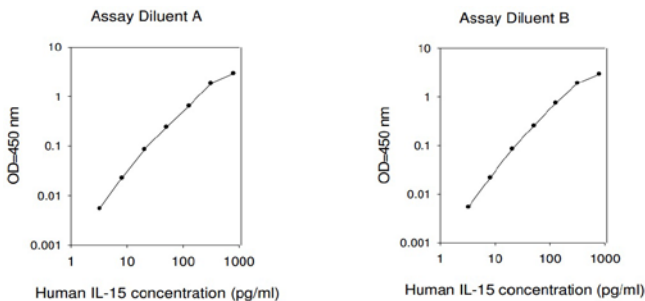
- Підготувати всі реагенти, зразки і стандарти відповідно до інструкцій.
↓
- Додати 100 мкл стандарту або зразка в кожну лунку. Витримати 2,5 години при кімнатній температурі або протягом ночі при 4 °С.
↓
- Додати 100 мкл підготовлених антитіл біотину в кожну лунку. Інкубувати 1 годину при кімнатній температурі.
↓
- Додати 100 мкл приготованого розчину стрептавідину. Інкубувати 45 хвилин при кімнатній температурі.
↓
- Додати 100 мкл однокрокового Реагенту субстрату TMB в кожну лунку. Інкубувати 30 хвилин при кімнатній температурі.
↓
- Додати 50 мкл стоп розчину в кожну лунку. Зчитати результат при 450 нм негайно.

VIII. ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Розрахувати середню абсорбцію для кожного набору повторюваних стандартів, зразків і, і відняти середню оптичну щільність нульового стандарту. Побудувати Стандартну криву на логарифмічному міліметровому папері або за допомогою програмного забезпечення Sigma, зі стандартною концентрацією на осі x і абсорбцією на осі y. Намалювати найбільш підходящу пряму лінію через стандартні точки.

A. ТИПОВІ ДАНІ

Ці стандартні криві призначені тільки для демонстрації. Стандартна крива повинна бути побудована для кожного аналізу.



B. ЧУТЛИВІСТЬ

Мінімальна доза виявлення людського IL-15 становить 3 пг/мл. Мінімальна доза виявлення визначається як концентрація аналіту, яка є результатом поглинання, яке на 2 стандартних відхилення вище, ніж бланк (буфер розчинника).

C. НАСИЧЕННЯ І ВІДНОВЛЕННЯ

Відновлення визначалося додаванням різних рівнів IL-15 в нормальні людські сироватки, плазми і супернатанти культури клітин. Середні відновлення наведені нижче:

Тип зразка	Середнє відновлення, %	Діапазон, %
Сироватка	92.26	80-102
Плазма	94.53	82-103
Середовище культури клітин	96.37	83-104

D. ЛІНІЙНІСТЬ

Тип зразка	Сироватка	Плазма	Середовище культури клітин
1:2	94	96	96
Середнє (%) від очікуваного	94	96	96
Діапазон (%)	80-101	82-102	83-104
1:4	97	96	93
Середнє (%) від очікуваного	97	96	93
Діапазон (%)	82-103	83-102	84-103

E. ВІДТВОРЮВАНІСТЬ

В постановці: CV < 10%

Між постановками: CV < 12%

IX. СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Даний ІФА не проявляє перехресної реактивності з будь-яким з наступних випробуваних цитокінів: *human Angiogenin, BDNF, BLC, ENA-78, FGF-4, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13, IL-15, IL-309, IP-10, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, Leptin (OB), MCP-1, MCP-3, MDC, MIP-1α, MIP-1 β, MIP-1, MMP-1, -2, -3, -10, PARC, RANTES, SCF, TARC, TGF-β, TIMP-1, TIMP-2, TNF-α, TNF-β, TPO, VEGF.*

X. МОЖЛИВІ НЕСПРАВНОСТІ ТА ЇХ УСУНЕННЯ

Проблема	Причина	Усунення
Погана стандартна крива	<ul style="list-style-type: none"> Неакуратне піпетування Неадекватне розведення стандарту 	<ul style="list-style-type: none"> Перевірити піпетки Переконайтеся, що Ви покрутили пробірку з елементом С і ретельно розчинили порошок обережним перемішуванням
Слабкий сигнал	<ul style="list-style-type: none"> Занадто короткий час інкубації Неадекватні обсяги реагентів або неправильне розведення 	<ul style="list-style-type: none"> Переконайтеся, що Ви покрутили пробірку з елементом С і ретельно розчинили порошок обережним перемішуванням Переконайтеся в достатньому часі інкубації; крок 2 процедури аналізу поміняти на інкубацію протягом ночі Перевірте піпетки і переконайтеся в належній підготовці
Високий CV	<ul style="list-style-type: none"> Неакуратне піпетування 	<ul style="list-style-type: none"> Перевірте піпетки
Завищений задній фон	<ul style="list-style-type: none"> Планшет погано промитий Забруднений промивний буфер 	<ul style="list-style-type: none"> Перевірити інструкції щодо належного промивання Якщо використовується промивний пристрій, перевірте, чи всі порти доступні Приготуйте свіжий промивний буфер
Низька чутливість	<ul style="list-style-type: none"> Неналежне зберігання набору Стоп розчин 	<ul style="list-style-type: none"> Зберігати стандарт при < -70 °С після відновлення, решту при 4 °С. Зберігати розчин субстрату захищеним від світла Стоп розчин повинен бути доданий в кожну лунку перед аналізом



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
www.diameb.com