

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ТРОМБОЦИТАРНОГО ФАКТОРА РОСТА АВ (PDGF-AB) В СУПЕРНАТАНТАХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР, СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ

DHD00C, Human PDGF-AB

Каталог. № : **DHD00C, SHD00C**
Количество : **96**
Производитель: **R&D (Великобритания)**

Методика от **07-2012**
Версия **752354.0**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Только для исследовательских целей
Не для диагностического использования

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Тромбоцитарный фактор роста (PDGF) был выявлен в качестве основного митогенного фактора в сыворотке, отсутствующего в плазме (1 - 3). Было показано, что он секретируется α -гранулами активированных при коагуляции тромбоцитов. Последующие исследования показали, что PDGF – это не одна молекула, а три, каждая из которых представляет собой димер, состоящий из двух различных, но структурно подобных пептидных цепей, обозначенных А и В. Различные изоформы, димеры PDGF-AA, -AB и -BB по-разному экспрессируются в различных типах клеток и воздействуют через два различных рецептора, обозначенных α и β . Разница существует в связывании с каждым рецептором. В общем случае изоформы PDGF являются потенциальными митогенами соединительнотканых клеток, включая фибробласты кожи (4), глиальные клетки (5, 6), артериальные гладкомышечные клетки (7), различные эпителиальные и эндотелиальные (8) клетки. Вдобавок к их митогенной активности, PDGF обладает хемотаксическим эффектом по отношению к фибробластам и гладкомышечным клеткам, клеткам, на которые PDGF также оказывает митогенное воздействие (9); и по отношению к нейтрофилам и мононуклеарным клеткам, т.е. к клеткам, для которых PDGF не является митогеном (10). Показаны и другие проявления активности PDGF, включая стимуляцию высвобождения гранул нейтрофилами и моноцитами (11), содействие синтезу стероидов клетками Лейдига (12), стимуляция фагоцитоза нейтрофилами (13), ингибирование активности натуральных клеток-киллеров (NK-клетки), стимуляция синтеза коллагена (14), модулирование экспрессии и секреции тромбоспондина (15), стимуляция коллагеназной активности и секреции (16), индукция сокращения мышечных волокон аорты крысы *in vitro* (17), транзиторная индукция секреции IL-2 Т-клетками, сопровождающаяся обратной регуляцией продукции IL-4 и IFN- γ , временные эффекты, которые могут позволить клональное размножение антиген-активированных В и Т-хелперных лимфоцитов перед дифференциацией (18). PDGF также повсеместно присутствует в нейронах по всей ЦНС, где, как предполагают, он играет важную роль в выживании и регенерации нейронов, в опосредовании пролиферации и дифференцировки глиальных клеток (19 - 22). Димерная композиция PDGF различается в разных типах клеток. Изоформа PDGF-AA предпочтительно секретируется фибробластами, гладкомышечными клетками сосудов, остеобластами, астроцитами, клетками линий COLO (карциномы толстой кишки) и WLM (опухоль Вильма (Wilm's tumor)) (23 - 27). Синтез PDGF-BB ассоциирован с макрофагами, клетками островков Лангерганса, неангиогенным эпителием и клеточной линией SW (тироидная карцинома) (26, 28, 29). К клеткам, продуцирующим обе цепи, А и В, относят нейроны, мезангиальные клетки почки, клеточные

линии глиомы и мезотелиомы и тромбоциты (19, 22, 26, 30, 31). Начальные данные предполагали, что в тромбоцитах человека содержится примерно 70% PDGF-AB и 30% PDGF-BB (32). Однако в более поздних исследованиях было показано, что возможно содержание до 70% PDGF-AA, а полученные ранее данные являются артефактом, полученным в результате очистки (33). С другой стороны, свиные тромбоциты в основном содержат PDGF-BB (34). Тип секретируемого/секретируемых PDGF димера/димеров зависит от продуцируемой мРНК, а также на него могут влиять эффективность трансляции, секреция и внутриклеточная деградация (35).

Были идентифицированы два различных рецептора PDGF (36, 37), α -рецептор (PDGF R α) с м.м. 170 кДа и β -рецептор с м.м. 190 кДа (PDGF R β). Оба рецептора структурно подобны и обладают внеклеточной структурой, содержащей пять иммуноглобулин-подобных доменов, один трансмембранный регион, и внутриклеточную часть с протеинтирозинкиназным доменом (36 - 38). Кроме того, в супернатанте клеточных культур и в человеческой плазме был идентифицирован растворимый PDGF R α , состоящий из внеклеточного домена (39). Эти два трансмембранных рецептора обладают схожими характеристиками с другими рецепторами факторов роста, такими как рецептор M-CSF, рецептор c-kit, семейство рецепторов FGF (40). Высокоаффинное связывание PDGF предусматривает димеры рецепторов, как гомодимеры, так и гетеродимеры, и считается, что каждая субъединица димера PDGF связывается с одним мономером рецептора (41 - 43). PDGF R α связывает каждую из трех форм димерного PDGF с высокой аффинностью. Хотя PDGF R β связывает PDGF-BB с высокой аффинностью (Kd = 1 нМ), его связывание с PDGF-AB было показано и с низкой и с высокой аффинностью (44 - 46). Известно, что клетками, экспрессирующими α -рецептор, являются фибробласты, эпителий хрусталика, клетки-предшественники тромбоцитов и олигодендроглии; тогда как β -рецепторы ассоциированы с сосудистым эндотелием, моноцитами и мезангиальными клетками почки. В гладкомышечных клетках, немиелинизированных шванновских клетках отмечена одновременная экспрессия α и β рецепторов (47 - 51).

Известно, что связывание PDGF активирует внутриклеточную тирозинкиназу, приводя к аутофосфорилированию цитоплазматического домена рецептора и фосфорилированию других внутриклеточных субстратов, включая Shc, фосфоорилазу C- γ , белок, активирующий ГТФазу, регуляторную субъединицу фосфатидилинозитол 3'-киназы, членов семейства p60src и Raf-1 (52 - 64). Эти субстраты связываются с различной аффинностью с α и β рецепторами (65), и, таким образом, конкретный ответ клетки зависит от типа экспрессируемого ею рецептора и типа воздействующего димера PDGF.

Множество видов биологической активности, показанной для PDGF, предполагают его возможные роли *in vivo* в нормальных и патологических процессах. Мощное воздействие PDGF как митогена и данные о том, что многие трансформированные и опухолевые клетки экспрессируют некоторые формы PDGF или PDGF-подобных молекул дают основание полагать, что PDGF играет роль, возможно, как аутокринный фактор, в неопластической трансформации и патогенезе опухоли.

Демонстрация того факта, что ген В цепи PDGF является нормальным клеточным аналогом v-sis онкогена вируса саркомы обезьян впервые ясно показала связь между онкогенами и нормальными генами клетки, вовлеченными в регуляцию роста и развития (66 - 68). Существует масса данных, показывающих что PDGF, полученный из макрофагов, может действовать как хемотаксический и стимулирующий рост агент на гладкомышечные клетки, приводящий к утолщению интиме-медиального слоя при атеросклеротических поражениях (69). PDGF может также играть роль в стимуляции пролиферации синовиальных клеток, обнаруживаемой при воспалительных заболеваниях суставов, например, при артритах (70, 71). PDGF играет роль в нормальном процессе заживления ран, и было показано, что применение PDGF ускоряет скорость заживления различных типов ран (72 - 74).

Методы определения PDGF-AB базируются на его способности стимулировать пролиферацию соответствующих клеточных линий, измеряемую по включению ³H-тимидиновой метки. Такой метод требует инкубации в течение ночи и не является полностью специфичным по отношению к PDGF-AB. Данный метод Quantikine PDGF-AB основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA), и предназначен для измерения человеческого PDGF-AB в супернатанте клеточных культур, сыворотке и плазме, длительность постановки составляет 4.5 часа. В методе используется рекомбинантный PDGF-AB человека, экспрессируемый в E. Coli, и точно определяет рекомбинантный фактор. Результаты, полученные при использовании нативного PDGF человека, показали линейную кривую, параллельную стандартной кривой, полученной при использовании рекомбинантных стандартов, поставляемых в данном наборе Quantikine. Это свидетельствует о том, что данный метод Quantikine

Immunoassay может быть использован для определения относительных значений массы нативного PDGF-AB человека.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный тест основан на методе количественного твердофазного иммуноферментного анализа типа «сэндвич». Микропланшет покрыт специфическими моноклональными антителами к PDGF-BB. В ходе реакции в лунки планшета добавляются стандарты и образцы, и любой PDGF-AB, присутствующий в образце, связывается с иммобилизованными антителами. После промывки несвязавшиеся компоненты удаляются, и в ячейки добавляется конъюгат поликлональных антител к PDGF-AA с ферментом. После второй промывки и удаления несвязавшегося конъюгата фермент-антитела добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментом с образованием цветного комплекса. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации PDGF-AB, присутствующей в образце. Цветная реакция останавливается стоп-реагентом и интенсивность окраски измеряется на планшетном фотометре.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- ИСПОЛЬЗОВАТЬ ТОЛЬКО ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЕЙ. НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР
- Данный Набор должен быть использован до истечения срока годности указанного на этикетке набора.
- Не смешивайте и не заменяйте реагенты с реагентами других лотов или других производителей.
- Если значения концентрации образцов выше, чем концентрация самого высокого стандарта, разведите образцы соответствующим буфером для разведения стандарта и повторите анализ.
- Любые изменение в буфере для разведения стандарта, выполнении процедуры, техники пипетирования, промывки, времени инкубации или температуре и сроке годности набора могут быть причиной изменений в связывании.
- Данный метод предполагает исключение влияния растворимых рецепторов, связывающих белков и других факторов, присутствующих в биологических образцах. До проверки всех факторов, однако, возможность влияния не может быть исключена.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- При перемешивании белковых растворов избегайте вспенивания.
- Избегайте взаимной контаминации растворов, заменяйте наконечник на новый каждый раз при внесении стандарта другой концентрации, нового образца и нового реагента. Также для каждого реагента необходимо использовать отдельные резервуары (ванночки).
- Для получения корректных результатов закрывайте планшет адгезивной плёнкой каждый раз на время инкубации.
- При использовании автоматического вошера для промывок, установите после добавления буфера для промывок период замачивания 30 секунд, и/или вращение микропланшета на 180 градусов между шагами промывок может повысить точность результатов.
- Субстратный раствор должен оставаться бесцветным до момента добавления в ячейки. Храните в тёмном месте. Цвет Субстратного раствора во время реакции должен изменяться от бесцветного до голубого различной интенсивности.
- Стоп-раствор необходимо добавлять в ячейки в той же последовательности и с той же скоростью, что и Субстратный раствор. Цвет в ячейках будет меняться с голубого на жёлтый при добавлении стоп-реагента. Зеленый цвет в лунках свидетельствует о том, что стоп-раствор не был тщательно перемешан с раствором субстрата.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Хранить невскрытый набор при 2-8 °С. Не использовать после окончания срока годности.

Реагент	№ реагента	Кат.№ DHD00C	Кат.№ SHD00C	Описание	Хранение открытых / восстановленных материалов
PDGF-AB	894230	1 планшет	6 планшетов	96-луночный	Верните

микро-планшет				полистериновый микропланшет (12 x 8 лунок), покрытый мышиными моноклональными антителами к PDGF-BB	оставшиеся стрипы в пакет с осушителем, закройте зип-застёжку и поместите в холодильник. Неиспользованные стрипы храните в пакете при 2-8°C 1 месяц*.
PDGF-AB стандарт	894232	1 флакон	6 флаконов	Рекомбинантный человеческий PDGF-AB в белковом буферном растворе с консервантами, лиофилизированный. Восстановленные объемы указаны на этикетке.	Аликвотировать и хранить в течение 1 месяца при ≤ - 20 °С в морозилке с ручной разморозкой. Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания.
PDGF-AB конъюгат	894231	1 флакон	6 флаконов	21 мл/флакон поликлональных антител к PDGF-AA, конъюгированных с пероксидазой хрена, с консервантами.	Можно хранить 1 месяц при температуре 2-8°C*
Рабочий буфер RD1X	895121	1 флакон	6 флаконов	11 мл/флакон белкового буферного раствора с консервантами. <i>Может содержать преципитат. Перед использованием нагреть до комнатной температуры и тщательно перемешать перед и в процессе использования.</i>	
Буфер для разведения стандарта RD5R	895190	1 флакон	6 флаконов	21 мл/флакон белкового буферного раствора с консервантами. <i>Для образцов супернатантов клеточных культур.</i>	
Буфер для разведения стандарта RD6-11	89549	2 флакона	12 флаконов	21 мл/флакон белкового буферного раствора с консервантами. <i>Для образцов сывороток/плазмы.</i>	
Концентрат буфера для промывок	895003	1 флакон	6 флаконов	21 мл/флакон 25x буферного солевого раствора с детергентом и консервантами	
Цветной реагент А	895000	1 флакон	6 флаконов	12 мл/флакон стабилизированного раствора перекиси водорода	
Цветной реагент В	895001	1 флакон	6 флаконов	12 мл/флакон стабилизированного раствора хромогена (тетраметилбензидин)	
Стоп-раствор	895032	1 флакон	6 флаконов	6 мл/флакон раствор 2 N серной кислоты	
Плётки для заклеивания стрипов	Без номера	4 полоски	24 полоски	Адгезивные плёнки	

*Учитывая, что не заканчивается срок годности.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Микропланшетный ридер с фильтром 450 нм с фильтром сравнения 540 или 570 нм.
- Калиброванные пипетки переменного объема с одноразовыми наконечниками.
- Деионизированная или дистиллированная вода.
- Впрыскивающая бутылка, ручное или автоматическое промывающее устройство
- Градуированный цилиндр на 500 мл.
- Горизонтальный орбитальный шейкер со скоростью 500 ± 50 об/мин.
- **Полипропиленовые** тестовые пробирки для разбавления стандартов и образцов.
- Контроли PDGF-AB человека (опционально; могут быть заказаны отдельно в R&D Systems).

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Разбавитель калибраторов RD6-11 содержит азид натрия, который может реагировать с медью и свинцом с образованием взрывоопасных азидов металлов. При выливании реагентов промывайте большим количеством воды.

Стоп-раствор содержит раствор кислоты. Защищайте глаза, руки, лицо и надевайте защитную одежду при работе с данным набором.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы супернатантов клеточных культур

Центрифугируйте образцы для удаления частиц и анализируйте немедленно или приготовьте аликвоты и храните при -20°C. Избегайте повторного замораживания-размораживания.

Внимание: Человеческая сыворотка, используемая для приготовления культуральных сред, может содержать высокий уровень PDGF. Благодаря низкой межвидовой перекрестной реактивности данного набора, уровень человеческого PDGF в культуральной среде, содержащей 10% бычьей или фетальную коровью сыворотку может быть определен без интерференции.

Образцы сыворотки

Если используете сепарационные пробирки, позвольте крови свернуться в течение 30 минут при комнатной температуре. Центрифугируйте 15 минут при 1000 g. Анализируйте сыворотку сразу или приготовьте аликвоты и храните при -20°C. Избегайте повторного замораживания-размораживания образцов.

Образцы плазмы

Соберите плазму на льду, используя для сбора образцов в качестве антикоагулянта ЭДТА или гепарин. Отделите плазму центрифугированием в течение 15 минут при 1000 g. Рекомендуется дополнительно центрифугировать образцы отделенной плазмы при 10,000 x g в течение 10 минут при 2 - 8° C, для полного удаления тромбоцитов.

Анализируйте плазму сразу или приготовьте аликвоты и храните при -20°C. Избегайте повторного замораживания-размораживания.

Замечание: Использование цитратной плазмы не было протестировано для данного метода. Не использовать иктерические образцы.

PDGF присутствует в гранулах тромбоцитов и при их активации происходит его релиз. Таким образом, для измерения уровня циркулирующего PDGF, для измерений должна быть собрана свободная от тромбоцитов плазма. Следует отметить, что многие протоколы подготовки плазмы, включая протоколы, рекомендованные Национальным Комитетом по Клиническим Лабораторным Стандартам (NCCLS), приводят к неполному удалению тромбоцитов из крови. Это является причиной переменных и не воспроизводимых результатов, получаемых при анализе факторов, содержащихся в тромбоцитах и высвобождающихся при их активации.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Используйте полипропиленовые пробирки.

Образцы сыворотки и плазмы должны быть разведены не менее, чем в 50 раз буфером для разведения стандарта RD6-11 перед тестированием. Например, 10 мкл образца + 490 мкл буфера для разведения стандарта RD6-11.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

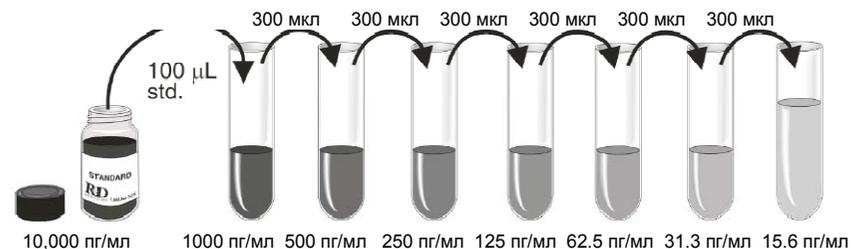
Все реагенты должны достичь комнатной температуры (18-25°) перед использованием.

Разведение буфера для промывок - нагрейте концентрат буфера для промывок до комнатной температуры и перемешайте, убедившись, что кристаллы соли, выпавшие в осадок, полностью растворились. Разведите 20 мл концентрата буфера для промывок дистиллированной или деионизированной водой для приготовления до 500 мл готового буфера для промывок.

Субстратный раствор - Смешайте равные доли Цветных реагентов А и В в подходящей емкости за 15 минут до использования. Защищайте от света. Для одной ячейки необходимо 200 мкл смеси.

PDGF-AB стандарт - Растворите лиофилизированный PDGF-AB стандарт в 1.0 мл дистиллированной или деионизированной воды. В результате растворения будет получен сток-раствор с концентрацией 10,000 пг/мл. Оставьте на **15 минут** для полного растворения, затем перед дальнейшим разведением перемешайте осторожно, покачиванием.

Используйте полипропиленовые пробирки. Добавьте 900 мкл буфера для разведения стандарта RD5R (для образцов супернатантов клеточных культур) или буфера для разведения стандарта RD6-11 (для образцов сыворотки/плазмы) в пробирку, помеченную 1000 пг/мл. Добавьте по 300 мкл соответствующего буфера для разведения стандарта в каждую из оставшихся пробирок. Используйте сток-раствор для приготовления серии разведений (см. рисунок), тщательно перемешивая полученные стандарты между шагами разведения. Стандарт 1000 пг/мл используйте в качестве самого высокого стандарта и соответствующий буфер для разведения стандарта в качестве нулевого стандарта (0 пг/мл).



ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Все реагенты и образцы должны достичь комнатной температуры (18-25°) перед использованием. Рекомендуется все образцы анализировать в дублях.

1. Приготовьте все реагенты, рабочие разведения стандартов и образцы как это описано в предыдущем разделе.
2. Достаньте требуемое для проведения анализа число стрипов. Неиспользованные стрипы храните в пакете с осушителем при 2-8°C. Поместите требуемое количество стрипов в держатель. Верните оставшиеся стрипы в пакет с осушителем и поместите в холодильник.
3. Добавьте по 100 мкл Рабочего буфера RD1X во все ячейки. *RD1X может содержать преципитат. Тщательно перемешивайте до и во время использования.*
4. Добавьте по 100 мкл каждого стандарта, контроля или образца* в соответствующие ячейки. Закройте стрипы адгезивной плёнкой. Инкубируйте 2 часа при комнатной температуре на горизонтальном шейкере при 500 ± 50 об/мин.
5. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 4 раза. Промывайте, заполняя каждую ячейку 400 мкл буфера для промывок, используя сжимаемую бутылку, многоканальную пипетку ручной диспенсер или устройство для автоматической промывки (вошер). Полное удаление жидкости в каждом цикле промывки принципиально для хорошего качества анализа. После последнего цикла промывки удалите остатки буфера для промывок аспирацией или декантированием. Переверните и подсушите планшет на чистой фильтровальной бумаге.

- Добавьте по 200 мкл PDGF-AB конъюгата в каждую лунку. Закройте стрипы новой адгезивной плёнкой. Инкубируйте 2 часа при комнатной температуре.
- Повторите промывку как указано в п. 5.
- Внесите по 200 мкл Субстратного раствора во все ячейки. Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре. **Защищайте планшет от воздействия света.**
- Добавьте по 50 мкл стоп-раствора во все ячейки. Если цвет в ячейках зеленый или, если изменение цвета не происходит однородно, постучите осторожно по держателю стрипов для перемешивания реагентов.
- Определите оптическую плотность ячеек в течение 30 минут при 450 нм. Используйте, если это возможно, длину волны сравнения 540 или 570 нм. Это необходимо для устранения оптических дефектов планшета. Если измерения с корректировкой невозможны, вычитите значения, полученные для лунок при длине волны 540 нм или 570 нм из значений, полученных при 450 нм. Считывание только при 450 нм может быть выше и менее точным по сравнению с двухволновым считыванием.

*Образцы сыворотки необходимо развести перед использованием.

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

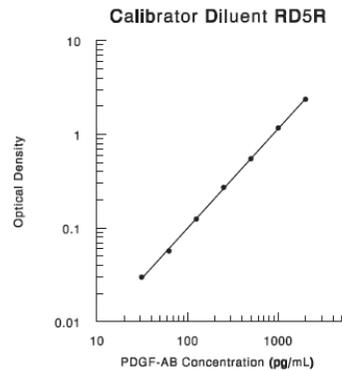
Рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта, контроля и образца и вычитите среднее значение О.П. нулевого стандарта.

Используя графическую бумагу, отметьте точки рассчитанных значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую. Оптимально может использоваться график в координатах log/log, для log трансформации может быть использован регрессионный анализ.

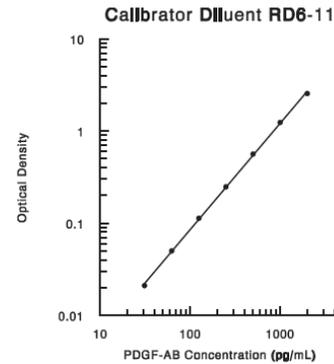
Для определения концентрации PDGF-AB каждого образца сначала найдите соответствующее значение О.П. на оси y и проведите горизонтальную линию до пересечения с калибровочной кривой. Затем из точки пересечения проведите вертикальную линию до пересечения с осью x. Значение на оси X в точке пересечения будет соответствовать концентрации PDGF-AB в образце. Так как образцы разводили, то значение найденной концентрации необходимо умножить на коэффициент разведения.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Пример результатов измерения стандартов PDGF-AB. Эти данные приводятся только в качестве примера. Стандартная кривая должна строиться для каждой серии анализов:



пг/мл	ОП	Среднее ОП	Скорректированное
0	0.005	0.005	-
	0.005		
15.6	0.033	0.034	0.029
	0.034		
31.3	0.067	0.068	0.063
	0.068		
62.5	0.135	0.138	0.133
	0.141		
125	0.286	0.289	0.284
	0.291		
250	0.596	0.599	0.594
	0.602		
500	1.196	1.216	1.211
	1.236		
1000	2.319		
	2.329	2.324	2.319



пг/мл	ОП	Среднее ОП	Скорректированное
	0.005	0.006	-
0	0.006		
	0.035	0.036	0.030
15.6	0.036		
	0.070	0.070	0.064
31.3	0.070		
	0.142	0.144	0.138
62.5	0.146		
	0.287	0.290	0.284
125	0.293		
	0.598		
250	0.605	0.602	0.596
	1.209	1.224	1.218
500	1.238		
	2.351	2.395	2.389
1000	2.439		

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась путем 20 определений каждого из 3 образцов с известной концентрацией на одном планшете.

Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями исследований определялась анализом трех образцов сыворотки с известной концентрацией 20 раз в независимых сериях анализа.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В СУПЕРНАТАНТЕ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

Внутри серии:

Образец	Образец 1	Образец 2	Образец 3
п	20	20	20
Среднее значение, (пг/мл)	92.7	312	656
Стандартное отклонение	8.28	9.73	15.2
Коэффициент вариации CV, (%)	8.9	3.1	2.3

Между сериями:

Образец	Образец 1	Образец 2	Образец 3
п	20	20	20
Среднее значение, (пг/мл)	102	343	701
Стандартное отклонение	10.9	29.9	52.3
Коэффициент вариации CV, (%)	10.7	8.7	7.5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В СЫВОРОТКЕ/ПЛАЗМЕ

Внутри серии:

Образец	Образец 1	Образец 2	Образец 3
п	20	20	20
Среднее значение, (пг/мл)	107	350	726
Стандартное отклонение	6.95	10.9	63.1
Коэффициент вариации CV, (%)	6.5	3.1	8.7

Между сериями:

Образец	Образец 1	Образец 2	Образец 3
п	20	20	20
Среднее значение, (пг/мл)	119	362	723
Стандартное отклонение	10.7	20.9	54.5
Коэффициент вариации CV, (%)	9.0	5.8	7.5

ИЗВЛЕЧЕНИЕ

Извлечение PDGF-AB, добавленного в образцы с различными концентрациями белка, охватывающими весь измеряемый диапазон, было определено для различных матриц.

Тип образца	Среднее извлечения, %	Диапазон
Культуральная среда (n=4)	105	93 - 119%
Гепариновая плазма (n=4)	104	86 - 121%
ЭДТА плазма (n=4)	105	78 - 117%

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Минимально определяемая концентрация (MDD) или чувствительность метода, измеренная в 70 анализах составила в среднем 1.14 пг/мл с диапазоном 0.29 – 3.83 пг/мл.

Чувствительность была рассчитана добавлением 2 стандартных отклонений к среднему значению оптической плотности 20 измеренных реплик стандарта 0 нг/мл и расчетом соответствующей концентрации.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Образцы с высоким содержанием, или насыщенные до высокой концентрации PDGF-AB были серийно разведены *буфером для разведения стандарта* и проанализированы.

		Культуральная среда (n=4)	Сыворотка* (n=4)	Гепариновая плазма без тромбоцитов (n=4)	ЭДТА плазма без тромбоцитов (n=4)
1:2	Среднее ожидаемое, %	92	95	102	97
	Диапазон, %	87-96	91-98	100-104	95-99
1:4	Среднее ожидаемое, %	90	94	100	98
	Диапазон, %	84-93	88-99	99-101	95-105
1:8	Среднее ожидаемое, %	90	92	103	96
	Диапазон, %	82-95	88-98	102-105	91-106
1:16	Среднее ожидаемое, %	86	86	104	95
	Диапазон, %	75-101	74-93	101-108	90-101

* Образцы сыворотки перед анализом были разведены.

КАЛИБРОВКА

Данный иммуноферментный метод был прокалиброван по высокочистому препарату рекомбинантного человеческого PDGF-AB, экспрессируемому в *E. Coli*, произведенному R&D Systems.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Сыворотка/плазма- Данным методом был протестированы образцы сыворотки и плазмы.

Тип образца	Среднее (пг/мл)	Диапазон (пг/мл)	Отклонение (пг/мл)
Сыворотка (n=21)*	14,105	6791-28.550	4888
Гепариновая плазма (n=21)	139	16.7-466	109
ЭДТА плазма (n=21)	107	43.5-610	128

* Образцы были разведены.

Супернатанты клеточных культур – Клетки периферической крови человека (1×10^6 клеток/мл) растили в среде RPMI, дополненной 10% FCS, 15 мкМ β-меркаптоэтанолом, 2 мМ L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 г/мл стрептомицин сульфата. Клетки растили не стимулированными или стимулировали РНА. Аликвоты супернатантов клеточных культур были протестированы с помощью данного метода для определения уровня нативного PDGF-AB.

Условия	день 1 (пг/мл)	день 5 (пг/мл)
Без стимуляции	98.2	40.8
Стимулированные	43.5	79.6

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Данный метод распознаёт рекомбинантную и нативную формы человеческого PDGF-AB. Факторы, перечисленные ниже, были приготовлены в концентрации 50 нг/мл в буферах для разведения стандарта RD5R и RD6-11 и были проанализированы на перекрестную реактивность. Приготовленные нижеперечисленные факторы в концентрации 50 нг/мл в среднем диапазоне контролей были проанализированы на интерференцию. Не обнаружено значительной перекрестной

реактивности, за исключением PDGF-подобных белков, как указано. Интерференция не была обнаружена ни для одного из протестированных веществ.

Рекомбинантные, человека:

CTGF	β-ECGF	β-NGF
EGF	FGF кислый	FGF основной
FGF-4	FGF-5	FGF-6
FGF-9	FGF-10	FGF-18
Flt-3/Flt-2 лиганд	G-CSF	GM-CSF
HB-EGF	HGF	HRG-α
HRG-β1	IGF-I	IGF-II
KGF	M-CSF	MSP
MSP β-цепь	PD-ECGF	P/GF
VEGF121	VEGF165	VEGF/P/GF
VEGF-D	VEGF R3	

Рекомбинантные, мышиные:

FGF-8b	FGF-8c	Flt-3/Flt-2 лиганд
G-CSF	GM-CSF	M-CSF
P/GF-2	VEGF120	VEGF164

Рекомбинантные, крысиные:

β-NGF
GM-CSF

Рекомбинантные, свиные:

GM-CSF

Другие:

bFGF кислые
bFGF основной



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»