

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА

## EIA-1864, TGF-β1 ELISA

Каталог. № : EIA-1864  
Количество : 96  
Производитель: DRG, (США)

Методика от 01-2013  
Версия 10.0



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

### 1. ВВЕДЕНИЕ

#### 1.1 Назначение использования

Набор DRG TGF-β1 ELISA – иммуноферментный анализ для количественного диагностического определения in vitro TGF β-1 в сыворотке, плазме и супернатанте культуры клеток.

#### 1.2 Краткое описание и объяснение

Трансформирующий фактор роста β-1 (ТФРВ-1) гомодимер, 25 кДа, состоящий из 2 субъединиц (12,5 кДа каждая), связанных дисульфидными связями. ТФР β-1 мультипотентный Цитокин с клеточной и дозозависимой активностью. Эта Молекула продуцируется большим количеством клеток и типами тканей, к примеру, тромбоцитами, костной тканью, плацентой и почками. Этот Цитокин модулирует эмбриональное развитие, формирование костей, развитие молочных желез, заживление ран, гематопоз, циклическое развитие клеток и продукцию экстрацеллюлярного матрикса. Он также ингибирует Т- и В-клеточную пролиферацию и действует как противовоспалительный агент как "in vivo", так и "in vitro". ТФР β-1 ингибирует созревание и активность макрофагов. Он также угнетает активность врожденных киллеров и клетки-киллеры, активированные лимфокинами; блокирует продукцию цитокинов.

### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG ТФР β-1 ELISA базируется на принципе "сэндвича". Перед анализом образцы пациента разводятся в буфере, поддаются acidификации HCl, а потом нейтрализации NaOH. После этого в лунки, покрытые антителами, добавляются стандарты и нейтрализованные образцы. После первой инкубации несвязанные материалы образца вымываются разведенным моющим раствором. Добавляются моноклональное мышиное анти-ТФР β-1-антитело, биотиноловое антимышиное антитело класса IgG и комплекс Стрептавидин-HRP Фермента и лунки опять инкубируются. Формируется иммуноферментный комплекс. Несвязанный конъюгат вымывается промыванием. Последовательно добавляется раствор Субстрата. После некоторого времени развития цвета добавляется стоп раствор и измеряется величина абсорбции при 450 нм. Интенсивность цвета прямо пропорциональна концентрации ТФР β-1 в образце.

### 3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен только для использования в in-Vitro диагностике. Только для профессионального использования.
2. Перед началом анализа полностью и внимательно прочитать инструкции. Использовать действующую версию инструкции, поставляемой с набором. Убедиться, что все понятно.
3. Все реагенты данного набора, содержащие сыворотку или плазму человека, были протестированы утвержденными методами и дали отрицательные результаты с ВИЧ 1/2, HBsAg и HCV. Со всеми реагентами обращаться как с потенциально опасными.
4. Избегать контакта со стоп-раствором, содержащим 0.2 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
5. ТМБ раствор вреден. Вызывает раздражение кожи и слизистой. В случае возможного контакта промыть глаза с достаточным количеством воды и вымыть руки с мылом и водой. Вымыть загрязненные предметы перед их повторным использованием. Вывести человека на свежий воздух при вдыхании.
6. Микропланшет состоит из отделяющихся полосок. Неиспользованные лунки должны храниться при 2-8 °C в запечатанной упаковке и должны использоваться с поставляемой рамкой.

7. Пипетирование образцов и реагентов должно проводиться как можно быстрее и с одинаковыми промежутками для каждого шага.
8. Резервуары использовать только для одиночных реагентов. Особенно это касается резервуаров с субстратами. Использование резервуаров, бывших в употреблении с раствором конъюгата, может привести к окрасу раствора. Не помещать реагенты обратно в пробирки во избежание загрязнения.
9. Для получения надлежащих результатов, тщательно перемешивать содержимое лунок. Не использовать лунки повторно.
10. Не допускать высушивания лунок в процессе тестирования; добавлять реагенты немедленно после завершения шага промывки.
11. Привести реагенты к комнатной температуре (21-26 °C) перед тестированием. Температура может исказить результаты оптической плотности анализа. Тем не менее, это не повлияет на результаты тестируемых образцов.
12. Не пипетировать ртом. Избегать контакта с кожей и слизистой.
13. Не употреблять пищу, не пить и не пользоваться косметикой в области работы с реагентами.
14. При работе с образцами и реагентами использовать одноразовые перчатки. Микробное загрязнение реагентов или образцов может привести к ложным результатам.
15. Обращаться с реагентами в соответствии с установленными нормами.
16. Не использовать после окончания срока годности.
17. Соблюдать все указанные объемы. Оптимальные результаты возможны только при использовании калиброванных пипеток и считывающего устройства микропланшета.
18. Не смешивать компоненты из разных наборов и партий.
19. Химикаты и приготовленные или использованные реагенты уничтожать в соответствии с установленными правилами.
20. За дополнительной информацией обратиться к производителю

### 4. РЕАГЕНТЫ

#### 4.1 Поставляемые реагенты

1. **Микротитрационные лунки** с привитыми анти-TGF β-1 антителами, 96 лунок
2. **Стандарт (Исходный стандарт)**, 1 флакон, 2 мл, 600 пг/мл TGF β-1. (Смотрите «Приготовление реагентов»)
3. **Рабочий буфер** (10 x конц.), 1 флакон, 10 мл, 0 пг/мл TGF β-1, содержит консервант
4. **Антисыворотка**, 1 флакон, 11 мл, готов к использованию, моноклональное мышиное анти- TGF β-1 антитело, содержит консервант
5. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 11 мл, готов к использованию, конъюгат: антимышиный IgG биотин, содержит консервант
6. **Ферментный комплекс** стрептавидин-пероксидазы, 1 флакон, 11 мл, готов к использованию, содержит консервант
7. **Раствор субстрата** (ТМБ), 1 флакон, 14 мл, готов к использованию
8. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, готов к использованию. Избегайте контакта с ним, поскольку это может вызвать ожог
9. **Раствор для промывания** (40x), 1 флакон, 30 мл
10. **1 N HCl** для окисления образцов, 1 флакон, 3 мл, готов к использованию
11. **1 N NaOH** для нейтрализации, 1 флакон, 3 мл, готов к использованию.

*Примечание:* дополнительный *рабочий буфер для разбавления образцов* доступен по запросу.

#### 4.2 Необходимые, но не поставляемые материалы:

- 1,5 мл реакционные емкости (напр. Эппендорфа) для приготовления образцов (окисления или нейтрализации),
- Микропланшетный считыватель, способный проводить измерения при (450 нм ± 10 нм).
- Откалиброванные микропипетки разной точности.
- Абсорбирующая бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Универсальная индикаторная бумага
- Таймер
- Полулогарифмическая графопостроительная бумага или ПО для обработки данных.

#### 4.3 Условия хранения

При хранении при 2-8<sup>o</sup>C не вскрытые реагенты будут сохранять свою активность до окончания срока годности. Не используйте реагенты после этого срока.

Вскрытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микротитровальные лунки хранить при 2-8°C. После открытия упаковки нужно плотно закрыть ее снова.

Неразбавленный исходный стандарт может храниться при -20°C. Вскрытые наборы сохраняют активность в течение 6 недель при хранении как указано выше.

#### 4.4 Подготовка реагентов

Приведите все реагенты и стрипы к комнатной температуре.

#### Рабочий буфер

Разбавьте 10 мл концентрированного рабочего буфера 90 мл дистиллированной воды, чтобы достичь окончательного объема рабочего раствора 100 мл.

#### Стандарты

Серийное разбавление **исходного стандарта** (600 пг/мл):

Описание		Концентрация пг/мл
<b>Стандарт А</b>	1.5 мл Исходного Стандарта	<b>600</b>
<b>Стандарт В</b>	0.5 мл Станд. А + 1 мл буфера	<b>200</b>
<b>Стандарт С</b>	0.5 мл Станд. В + 1 мл буфера	<b>66</b>
<b>Стандарт D</b>	0.5 мл Станд. С + 1 мл буфера	<b>22</b>
<b>Стандарт Е</b>	1 мл буфера	<b>0</b>

**Хранение:** разведенные стандарты стабильны в течение 1 недели при 2-8°C. При более длительном хранении заморозить при -20°C.

#### Промывочный раствор

Добавьте деионизированной воды к 40x концентрату промывочного раствора.

Разбавьте 30 мл концентрированного моющего раствора 1170 мл деионизированной воды до конечного объема 1200 мл. Разбавленный промывочный раствор может храниться 2 недели при комнатной температуре.

#### 4.5 Утилизация набора

Уничтожение набора должно проводиться согласно национальным требованиям по безопасности. Специальная информация указана в Паспорте безопасности (см. Раздел 13).

#### 4.6 Поврежденные наборы

При повреждении набора необходимо уведомить производителя в течении одной недели после получения набора. Поврежденные компоненты не должны использоваться в анализе. Они должны храниться пока раствор не будет заменен.

### 5. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В данном исследовании могут использоваться сыворотка или плазма (ЭДТК или цитратная) и супернатант культуры клеток.

Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

Примечание: не использовать образцы, содержащие азид натрия.

#### 5.1 Сбор образцов

##### Сыворотка:

Соберите кровь венопункцией, дайте возможность стечь и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Должны постоять при комнатной температуре.

##### Плазма:

Собрать в пробирки для центрифугирования, содержащие антикоагулянт. Центрифугировать немедленно после забора. Не используйте для анализа сильно гемолизированные и липемические образцы.

#### 5.2 Хранение образцов

Образцы нужно хранить закрытыми при 2-8°C до 24 часов перед исследованием. При более длительном хранении должны быть заморожены перед исследованием только один раз до -20°C. Размороженные образцы необходимо перевернуть несколько раз перед исследованием.

#### 5.3 Разбавление образцов

##### 5.3.1 Сыворотка и плазма

Образцы сыворотки и плазмы нужно развести 1:50 перед анализом рабочим буфером.

**Заметьте:** результаты должны быть умножены на фактор разведения (x 50).

##### Пример:

Разбавление 1:50: 10 мкл сыворотки + 490 мкл рабочего буфера

(тщательно перемешайте).

#### 5.3.2 Образцы культуры клеток

Центрифугируйте образцы культуры клеток. Разведите супернатант рабочим буфером, соответственно с ожидаемыми концентрациям TGF  $\beta$ -1, к примеру, 1:10, если ожидается высокая концентрация. Результаты должны быть умножены на фактор разведения.

##### Пример:

Разбавление 1:10: 10 мкл образца + 90 мкл рабочего буфера (тщательно перемешайте).

Если в начальном анализе оказалось, что образцы имеют концентрацию больше, чем самый высокий стандарт, они могут быть разбавлены рабочим буфером и повторно проанализированы, как описано в процедуре анализа.

Для вычисления концентраций необходимо учитывать этот дополнительный коэффициент разбавления.

#### 5.4 Окисление и нейтрализация образцов и стандартов

1. Добавьте 200 мкл разведенного образца или стандартов (не разведенных) в емкости (к примеру, емкости Эппендорфа).

**Заметьте:** стандарты, которые были приготовлены серийным разведением, также должны быть обработаны, как описано ниже.

2. Добавьте 20 мкл 1 N HCl во все емкости.

3. Закройте емкости, хорошо смешайте (вихревыми движениями) и оставьте на 15 минут.

4. Добавьте 20 мкл 1N NaOH для нейтрализации и тщательно перемешайте. После нейтрализации образцы должны иметь значения pH между 7 и 8. Так что, пожалуйста, проверьте значение pH Универсальной Индикаторной Бумагой.

### 6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

#### 6.1 Общие замечания

- Перед использованием приведите все реагенты к комнатной температуре. Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием без образования пены.

- После начала анализа все этапы нужно выполнять без перерывов.

- Используйте каждый раз новые пипетки, а для добавления субстрата и стоп раствора не используйте пипетки с металлическими частями.

- В общем, ферментная реакция зависит линейно от времени и температуры. Приготовьте все необходимое перед началом анализа, чтобы не тратить время во время самого анализа.

- принято считать, что ферментативная реакция прямо пропорциональна времени и температуре.

#### 6.2 Процедура теста

Каждая процедура должна включать калибровочную кривую.

1. Закрепите требуемое количество микротитрационных лунок в держателе рамки.

2. Пипеткой внесите **100 мкл** приготовленного **стандарта, контроля и образцов новыми одноразовыми наконечниками** в соответствующие лунки.

3. Накройте планшетку и инкубируйте через ночь (**8-16 часов**) при 4°C или, как вариант, **3 часа** при комнатной температуре.

4. Резко встряхните содержимое лунок. Промойте разведенным промывочным раствором **три раза (300 мкл на лунку)**. Резко встряхните планшетку над абсорбирующей бумагой и промокните остатки влаги.

**Важное замечание:** чувствительность и точность зависит от процедуры промывания.

5. Добавьте **100 мкл антисыворотки** во все лунки.

6. Инкубируйте **2 часа** при комнатной температуре.

7. Резко встряхните содержимое лунок. Промойте разведенным промывочным раствором **три раза (300 мкл на лунку)**. Резко встряхните планшетку над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги.

8. Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата (антимышиного биотина) в каждую лунку.

9. Инкубируйте **45 минут** при комнатной температуре.

10. Резко встряхните содержимое лунок. Промойте разведенным промывочным раствором **три раза (300 мкл на лунку)**. Резко встряхните планшетку над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги.

11. Добавьте **100 мкл** ферментного комплекса в каждую лунку.

12. Инкубируйте **45 минут** при комнатной температуре.

13. Резко встряхните содержимое лунок. Промойте разведенным промывочным раствором **три раза (300 мкл на лунку)**. Резко встряхните планшетку над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги.

14. Добавьте **100 мкл** раствора субстрата (ТМБ) в каждую лунку.

15. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
16. Добавьте **50 мкл** стоп-раствора в каждую лунку.
17. Измерьте оптическую плотность каждой лунки **при 450 нм±10 нм** на протяжении **10 минут** после добавления стоп раствора.

### 6.3 Вычисление результатов

1. Вычислите значения средней абсорбции для каждого набора стандарта, контролей и образцов пациентов.
2. Постройте стандартную кривую, откладывая среднюю абсорбцию на оси Y, полученную для каждого стандарта против его концентрации на оси X.
3. Используя среднюю абсорбцию для каждого образца определите соответствующую концентрацию со стандартной кривой. Можно использовать другие методы обработки данных.
4. Автоматический метод: компьютерные программы, использующие кубические сплины, 4 ПЛ или линейно-логарифмическую.
5. Концентрация образцов может считываться прямо со стандартной кривой. Умножьте начальное разбавление образцов на 50. Образцы с концентрацией выше наивысшего стандарта необходимо дальше разбавить рабочим буфером. Для вычисления концентрации, необходимо учитывать этот фактор разбавления.

### 7. ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственные нормальные и патологические значения. Данные доступны по запросу.

### 8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контроли согласно государственным и федеральным правилам. Использование контроля дает возможность повседневной оценки достоверности результатов. Используйте контроли и нормального уровня, и патологического.

Контроли и соответствующие результаты QC лаборатории указаны в QC сертификате, что поставляется с набором. Величины, указанные в данном сертификате соответствуют лоту набора и должны использоваться для сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для подтверждения достоверности результатов.

Используйте соответствующий статистический метод для анализа величин контроля. Если результаты анализа не попадают в установленные границы материалов контроля, результаты являются не достоверными.

В таком случае проверьте следующие данные: устройства пипетирования и измерения времени; фотометр; даты пригодности реагентов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывания.

Если не обнаружено ошибки, обратитесь к Вашему поставщику.

### 9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### 9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа в пределах 1,9-600 пг/мл.

#### 9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Перекрестные реакции с TGF β-2 и TGF β-3 не определены. Перекрестная реакция с TGF β-1 крысы: 98%.

#### 9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность была определена из среднего значения плюс двух стандартных отклонений 20 репликатов 0 стандарта. Полученный результат составляет **1,9 пг/мл**.

#### 9.4 Воспроизводимость

Сыворотка	К-во	КВ, %
Внутри анализа	8	1,0
Между анализами	12	7,5

#### 9.5 Восстановление

Восстановление: 92,5% (к-во=2). Это значит, что около 93% исходного образца определено в данном исследовании.

#### 9.6 Линейность

Образцы плазмы были разбавлены рабочим буфером.

Разбавление	Полученная концентрация (пг/мл)
1:30	48,73
1:40	55,19
1:50	56,33
1:60	58,00

### 10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Неправильное обращение с образцами или модификация анализа может влиять на результаты.

#### 10.1 Влияющие вещества

Данные возможно получить по запросу.

#### 10.2 Влияние лекарственных препаратов

Данные отсутствуют.

#### 10.3 «Хук-эффект» высокой дозы

Данные возможно получить по запросу.

### 11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

#### 11.1 Достоверность результатов

Анализ должен проводиться точно с инструкцией производителя. Также пользователь должен следовать национальным стандартам и законам. Это особенно относится к использованию контролей. Очень важно всегда включать в анализ достаточное количество контролей для оценки достоверности и точности анализа.

Результаты анализов достоверны только, если контроли попадают в указанные границы и если все другие параметры соответствуют спецификации.

#### 11.2 Терапевтические заключения

Терапевтическое заключение никогда не должно основываться на результатах лабораторных исследований. Оно должно учитывать полностью всю клиническую картину пациента.

Результаты анализа не должны быть единственным фактором, на основе которого ставится терапевтическое заключение.

#### 11.3 Ответственность

Любые изменения набора и/или смешивания компонентов разных лотов могут отрицательно влиять на результаты анализа.

Такие модификации не могут быть причиной для замены набора.

Любые повреждения при транспортировке набора не являются под ответственностью производителя.



**ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

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