



## Набор для определения ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА

Кат. № : 131-1864  
Количество : 96  
Производитель : DRG (Германия)

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

Методика от 05-2004  
Версия 6.0

### 1. ВВЕДЕНИЕ

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 тестом образцы пациента разводятся в буфере, поддаются ацидификации 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. Для диагностики in vitro.
2. Относительно информации по безопасности, которые включены в набор, следуйте листу данных по безопасности.
3. Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазма. Использованные сыворотка или плазма тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.
4. Избегайте контактов с кислотой стоп раствора. Это может привести к раздражению кожи и ожогам.
5. Не пипетируйте ртом и избегайте контакта кожи и слизистых с реагентами.
6. Не курите, не пейте, не ешьте и не применяйте косметику в местах работы с реагентами.
7. Используйте одноразовые перчатки при обращении с образцами и реагентами. Микробиологическое загрязнение реагентов или образцов может влиять на результаты.
8. Обращайтесь с реагентами согласно правилам безопасности.
9. Не используйте реагенты после истечения срока годности.
10. Необходимо придерживаться всех объемов, описанных в

инструкции. Оптимальные тестовые результаты при использовании калиброванных пипеток.

11. Не смешивайте компоненты разных наборов. Не рекомендуется менять местами лунки разных планшеток даже от одного набора. Наборы могут транспортироваться разными способами, поэтому допускается незначительное различие.
12. Химикалии и приготовленные или использованные реагенты необходимо обрабатывать согласно требованиям безопасности.
13. Лист данных безопасности доступен по требованию.

### 4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

#### 4.1 Состав набора

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

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

#### 4.1.1 Необходимые, но не поставляемые материалы.

1. 1,5 мл реакционной емкости (напр. Эппендорфа) для приготовления образцов (ацидификации или нейтрализации),
2. Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при (450 нм ± 10 нм).
3. Калиброванные микропипетки разной точности.
4. Абсорбирующая бумага.
5. Дистиллированная вода
6. Адгезивная фольга
7. Универсальная индикаторная бумага

#### 4.2 Хранение и стабильность набора

- При хранении при 2-8°C неповрежденные реагенты будут сохранять свою активность до окончания срока годности. Не используйте реагенты после этого срока.
- **Стандарт: Для более длительного хранения (более 8 недель) необходимо заморозить до -20°C.**
- Энзимный конъюгат, энзимный комплекс, раствор субстрата и рабочий буфер должен храниться при 2-8°C.
- **Лунки:** хранить при 2-8°C. После открытия упаковки нужно плотно закрыть ее снова. Иммунореактивность поверхности лунок на планшетке стабильна в открытом, но плотно после этого упакованном с десикантом состоянии приблизительно 6 недель.

#### 4.3 Приготовление реагентов

Приведите все реагенты и стрипы к комнатной температуре.

**Рабочий буфер:** Разбавьте содержимое флакона (10x концентрированный) с 90 мл дистиллированной воды, чтобы достичь окончательного объема Рабочего раствора 100 мл.

**Моющий раствор:** Разбавьте 30 мл концентрированного моющего раствора дистиллированной водой, что в итоге получился объем 1200 мл. Разбавленный моющий раствор может храниться 2 недели при комнатной температуре.

#### Стандарты:

Серийное разведение стандарта (600 пг/мл):

| Описание                               | Концентрация пг/мл |
|--|--------------------|
| Стандарт А                             | 600                |
| Стандарт В 1 мл Станд. А + 1 мл буфера | 300                |
| Стандарт С 1 мл Станд. В + 1 мл буфера | 150                |
| Стандарт D 1 мл Станд. С + 1 мл буфера | 75                 |
| Стандарт E 1 мл Станд. D + 1 мл буфера | 38                 |

|            |                             |    |
|------------|-----------------------------|----|
| Стандарт F | 1 мл Станд. E + 1 мл буфера | 19 |
| Стандарт G | 2 мл буфера                 | 0  |

слишком низкая или высокая, Вы можете увеличить или удлинить инкубационное время финального формирования цвета, соответственно.

**Хранение:** разведенные Стандарты хранить при 2-8°C 8 недель. Для более длительного хранения – заморозить до -20°C.

#### 4.4 Утилизация набора

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

#### 4.5 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. ОБРАЗЦЫ

#### 5.1 Забор образцов

**Образцы сыворотки** соберите кровь венопункцией, дайте возможность стечь и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. должны постоять при комнатной температуре.

Для **образцов плазмы** нужно в качестве антикоагулянта использовать ЭДТА или натрия цитрат. Для сепарации образцов плазмы нужно центрифугировать (20 минут при 4000 x g при 4°C).

Не используйте для анализа сильно гемолизированные и липемические образцы.

#### 5.2 Хранение образцов

Образцы нужно хранить при 2-8°C 24 часа, для более длительного хранения – заморозить до -20°C.

#### 5.3 Разбавление образцов

**А) Образцы сыворотки и плазмы нужно развести 1:50 перед тестом рабочим буфером.**

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

**В) Образцы культуры клеток.** Центрифугируйте образцы культуры клеток. Разведите супернатант Буфером, соответственно к ожидаемым концентрациям TGF β-1, к примеру, 1:10, если ожидается низкая концентрация. Результаты должны быть умножены на фактор разведения.

Пример:

- Разбавление 1:10: 10 мкл образца + 90 мкл рабочего буфера (тщательно перемешайте)
- Разбавление 1:50: 10 мкл образца + 490 мкл рабочего буфера (тщательно перемешайте).

#### 5.4 Окисление и нейтрализация образцов (сыворотка, плазма и образцы культуры клеток) 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 M HCl во все емкости.
3. Хорошо смешайте и оставьте на 15 минут.
4. Добавьте 20 мкл 1M NaOH для нейтрализации.
5. 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

1. Перед использованием приведите все реагенты к комнатной температуре. Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием без образования пены.
2. После начала теста все этапы нужно выполнять без перерывов.
3. Используйте каждый раз новые пипетки, а для добавления субстрата и стоп раствора не используйте пипетки с металлическими частями.
4. В общем, ферментная реакция зависит линейно от времени и температуры. Приготовьте все необходимое перед началом теста, чтобы не тратить время во время самого теста.
5. Данный набор предназначен для получения абсорбции для наивысшего стандарта >1200 в течении 10 минут при комнатной температуре. В общем, ферментная реакция зависит линейно от времени и температуры. Если абсорбция

#### 6.2 Procedural notes

1. Все образцы, стандарты и контроли должны анализироваться в дубле, что б сохранялись одинаковые условия тестирования.
2. Концентрация образца может считываться прямо со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше наивысшего стандарта должны дальше разбавляться рабочим буфером. При вычислении концентраций эти факторы необходимо учитывать.

#### 6.3 Procedure analysis

1. Пометьте стрипы, которые будут использованы. Снова тесно закройте ящик с остатком стрипов с лунками.
  2. Пипеткой внесите **100 мкл** приготовленных (после ацидификации и нейтрализации) стандартов и образцов (после разведения 1:50) в соответствующие лунки планшетки.
  3. Накройте планшетку и инкубируйте через ночь (**8-16 часов**) при 4°C или, альтернативно, **3 часа** при комнатной температуре.
  4. Резко встряхните содержимое лунок. Промойте разведенным промывочным раствором три раза (**300 мкл** на лунку). Резко встряхните планшетку над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги. Чувствительность и точность зависит от процедуры промывания.
  5. Добавьте **100 мкл** антисыворотки в каждую лунку планшетки.
  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 Конъюгата (Антимышиный биотин) в каждую лунку планшета.
  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** Энзимного 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 (ТМВ) в каждую лунку.
  15. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
  16. Добавьте **50 мкл** Стоп раствора в каждую лунку за те же промежутки времени, что и в пункте 14.
- Заметьте:** добавляйте стоп раствор в центр лунки, чтобы достичь полного смешивания реагента.
17. Измерьте оптическую плотность каждой лунки **при 450 нм±10 нм** на протяжении 10 минут после добавления стоп раствора.

#### 6.4 Calculation results

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. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

#### 7.1 Ожидаемые значения

Рекомендуется, что б каждая лаборатория устанавливала

собственные нормальные и патологические значения.  
Данные доступны по запросу.

### 7.2 Специфичность

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

### 7.3 Чувствительность

Самый низкий определяемый уровень TGF β-1, который можно отличить от нулевого стандарта, **1,9 пг/мл**.

### 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.

### 7.5 Точность

| Сыворотка       | n  | КВ*, % |
|-----------------|----|--------|
| Внутри тестовая | 8  | 1,0    |
| Между тестовая  | 12 | 7,5    |

\* - коэффициент вариации

### 7.6 Тест на восстановление

Восстановление: 92,5% (n=2). Это значит, что около 93% оригинального образца определено в данном тесте.

### 7.7 Тест на разбавление (линейность).

Плазма, обедненная на тромбоциты, была разбавлена рабочим буфером.

## 8. ОГРАНИЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

### 8.1 Влияющие вещества

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

## 9. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

### 9.1 Достоверность результатов

Тест 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. Тестовые результаты достоверны только если контроли попадают в указанные границы и если все другие параметры соответствуют спецификации.

### 9.2 Терапевтическое заключение

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

Тестовые результаты не должны быть единственным фактором, на основе которого ставится терапевтическое заключение.

### 9.3 Надежность

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

Такие модификации не могут быть причиной для замены набора.

Любые повреждения при транспортировке набора не является под ответственностью производителя.

### Информация для заказа:

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
Тел.: (0342) 775122  
Факс: (0342) 775612  
E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)