



Набор ИФА для определения человеческого интерлейкина (IL-5)

Кат. № : IL05001
Количество : 96
Производитель : Origenium (Финляндия)

Версия 4.09

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА интерлейкин-5 (IL-5) компании «Ордженум Лабораториз» является ферментосвязанным иммуносорбентным анализом для количественного определения человеческого IL-5 в супернатантах культуры клеток, плазме (гепариновой или цитратной), сыворотке и других жидкостях тела. Анализ определяет как природный, так и рекомбинантный человеческий IL-5.

2. ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин-5 (IL-5) вырабатывается лимфоцитами как гликозилированный дисульфидосвязанный гомодимер. IL-5 является единственным эозинофильным гематопоэтическим фактором роста, дающим перекрестную реакцию, как у человеческого, так и мышиного вида. Человеческий и мышиный IL-5 участвует в 71% гомологии на аминокислотном уровне. Изначально определяемый множеством групп на основе разных биохимических аспектов, IL-5 сейчас известен как преобладающий цитокин в эозинофилии без влияния на реакцию IgE (функция IL-4). Гены, кодирующие IL-4 и IL-5, тесно связаны, а протеины часто взаимно выражены, хоть и находятся под контролем не связанных с ними провоцирующих факторов. IL-5 принадлежит к семейству структурно связанных цитокинов, включая IL-2, IL-4, GM-CSF и гормон роста. Главная роль эозинофилов в развитии хронических аллергических реакций выводит IL-5 на первое место в плане развития будущего поколения противоаллергических лекарственных средств. Т-лимфоциты, Т-лимфоциты взрослых людей, лейкозные клеточные ряды и изменённые действием вируса Эпштейна-Барра В-лимфоциты вырабатывают IL-5. Исследования показывают, что вызванный воспалениями и локально вырабатываемый IL-5 и эотаксин могут совместно воздействовать на костный мозг.

Настоящий набор является ферментосвязанным иммуносорбентным анализом *in vitro* для количественного определения человеческого IL-5 в супернатантах культуры клеток, плазме, сыворотке и моче. Этот анализ использует антитело, свойственное для человеческого IL-5, нанесенное на 96-луночный планшет. Стандарты, образцы и биотинилированный анти-человеческий IL-5 капаются в лунки и IL-5, присутствующий в образце, захватывается антителом, иммобилизованным на лунках и биотинилированным IL-5 специфическим обнаруживающим антителом. После вымывания несвязанного биотинилированного антитела, капается в лунки стрептавидин, конъюгированный пероксидазой хрена. Лунки промываются снова. После этого второго этапа промывки в лунки добавляется раствор субстрата ТМБ, что ведет к развитию цвета, который пропорционален количеству связанного IL-5. Стоп-раствор изменяет цвет из синего на желтый, и интенсивность цвета измеряется при 450 нм.

3. СОСТАВ НАБОРА

Компоненты набора	Количество/Объем
96-луночный планшет с 12 стрипами Делимые микротирационные стрипы для анализа, каждый с антителом IL-5, нанесенным на отдельные лунки. Готовы к использованию.	1 рамка
Стандарт IL-5 Лиофилизированный и стабилизированный человеческий IL-5. Разведите растворителем образца в количестве, указанном на этикетке.	2 флакона
Раствор биотинилированных антител IL-5. Готов к использованию.	10 мл
Авидин, конъюгированный пероксидазой хрена. Готов к использованию.	12 мл
20x концентрат промывочного раствора (достаточно для 1000 мл). Разбавить 1:20	50 мл
Разбавитель образца. Готов к использованию.	100 мл
Стоп-раствор. 0,9N H ₂ SO ₄ Готов к использованию.	8 мл
Субстрат ТМБ. Готов к использованию.	8 мл

4. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагент	Хранение	Стабильность
96-луночный планшет с 12 стрипами. Делимые микротирационные стрипы для анализа с 8 отдельными лунками, покрытыми антителом	Хранить при 2-8°C в закрытом мешочке из фольги с осушителями. Неиспользуемые стрипы должны храниться в запечатывающемся герметичном и влагозащитном мешочке из фольги!	3 месяца после вскрытия
Стандарт IL-5. Лиофилизированный.	Хранить при 2-8°C.	До истечения срока годности в лиофилизированном виде. Мин. 3 недели после растворения разбавителем образца.
Раствор биотинилированных антител. Готов к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники!)</i>	3 месяца после вскрытия
Авидин, конъюгированный пероксидазой хрена. Готов к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники!)</i>	3 месяца после вскрытия
Разбавитель образца. Готов к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники или</i>	3 месяца после вскрытия

	пипетку!)	
20x концентрат промывочного буфера.	Хранить при комнатной температуре.	До истечения срока годности при комнатной температуре.
Разбавленный промывочный буфер	1x рабочее разбавление. <i>Бутылки, используемые для рабочего разбавления, должны регулярно промываться. Уничтожать мутные растворы</i>	5 рабочих дней при комнатной температуре или 2 недели при +4°C.
Раствор ТМБ-субстрата. Готов к использованию.	Раствор готов для использования, при 2-8°C, защищая от света. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники или пипетки!)</i>	До истечения срока годности (указана на флаконе).
Стоп-раствор. Готов к использованию.	Хранить при комнатной температуре.	До истечения срока годности при комнатной температуре.

5. ДОПОЛНИТЕЛЬНО ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер для измерения абсорбции при 450 нм.
- Точные пипетки для внесения объемов от 2 мкл до 1 мл.
- Многоканальная пипетка (от 25 – 350 мкл).
- Регулируемые пипетки 1-25 мл для подготовки реагентов.
- Мерные колбы на 100 мл и 1л.
- Промокательная бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Логарифмическая графопостроительная бумага или ПК с ПО для анализа данных ИФА.
- Пробирки для подготовки стандарта или разбавлений образца.
- Таймер

6. ОБЪЕМЫ РЕАГЕНТОВ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты					
К-во используемых стрипов (каждый на 8 лунок)	Биотинилированные антитела 50 мкл/лунку	Авидин-пероксидаза хрена 100 мкл/лунку	Субстрат ТМБ 50 мкл/лунку	Стоп-раствор 25 мкл/лунку	Промывочный буфер 300 мкл/лунку
1 (8 лунок)	500 мкл	900 мкл	500 мкл	300 мкл	30 мл
2 (16 лунок)	1 мл	1,8 мл	1 мл	600 мкл	55 мл
4 (32 лунок)	2 мл	3,6 мл	2 мл	1,2 мл	110 мл
6 (48 лунок)	3 мл	5,4 мл	3 мл	1,8 мл	165 мл
8 (64 лунок)	4 мл	7,2 мл	4 мл	2,4 мл	220 мл
12 (96 лунок)	6 мл	11 мл	6 мл	4 мл	350 мл

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ

1. Перед использованием привести все реагенты и образцы к комнатной температуре (18-25°C).
2. **Планшет, покрытый антителами:** До вскрытия мешочка из фольги определить количество стрипов, необходимых для исследования требуемого количества образцов, плюс стандарты и бланки в дубли. Удалить неиспользуемые стрипы из рамки планшета и вернуть их в мешочек, содержащий осушитель, на хранение до 1 месяца при 2-8°C.

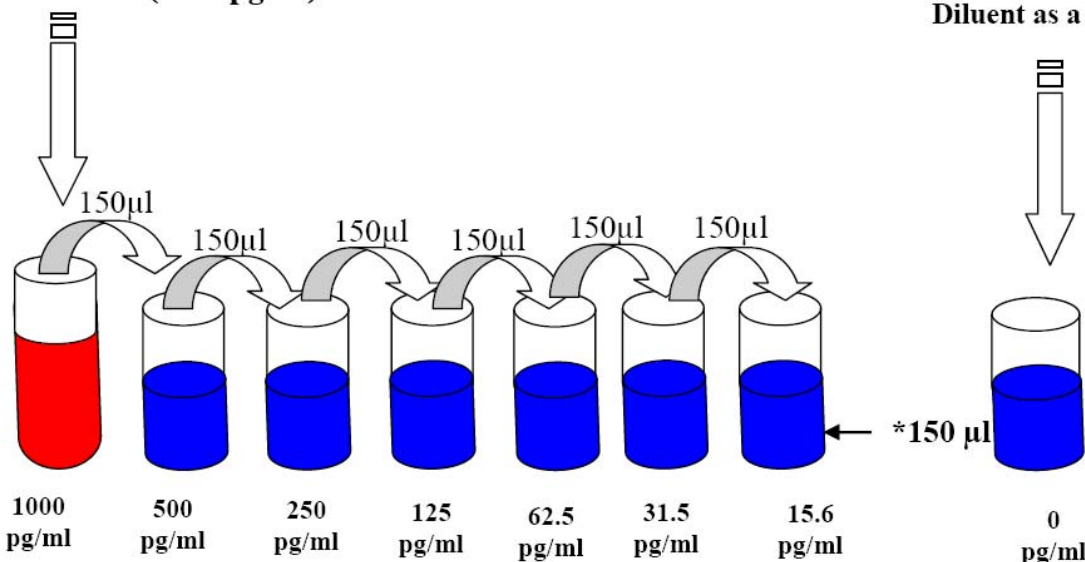
3. Разбавление стандарта для исследования:

Растворить лиофилизированный стандарт IL-5 разбавителем образца в объеме, указанном на этикетке.

Для получения калибровочной кривой разбавить следующим образом:

- а) Добавить **300 мкл** стандарта IL-5, который содержит 1000 пг/мл IL-5 в пробирку **1**
- б) Добавить **150 мкл*** разбавителя образца в другие **6** пробирок. Взять 150 мкл из **1** пробирки (1000 пг/мл) и начать 2-кратные последовательные разбавления в пробирках для разбавления как описано на рисунке путем перемешивания несколько раз пипеткой в каждой пробирке (всего 7 пробирок для разбавления).
- в) Разбавитель образца служит в качестве нулевого стандарта (0 нг/мл) в пробирке **8**.

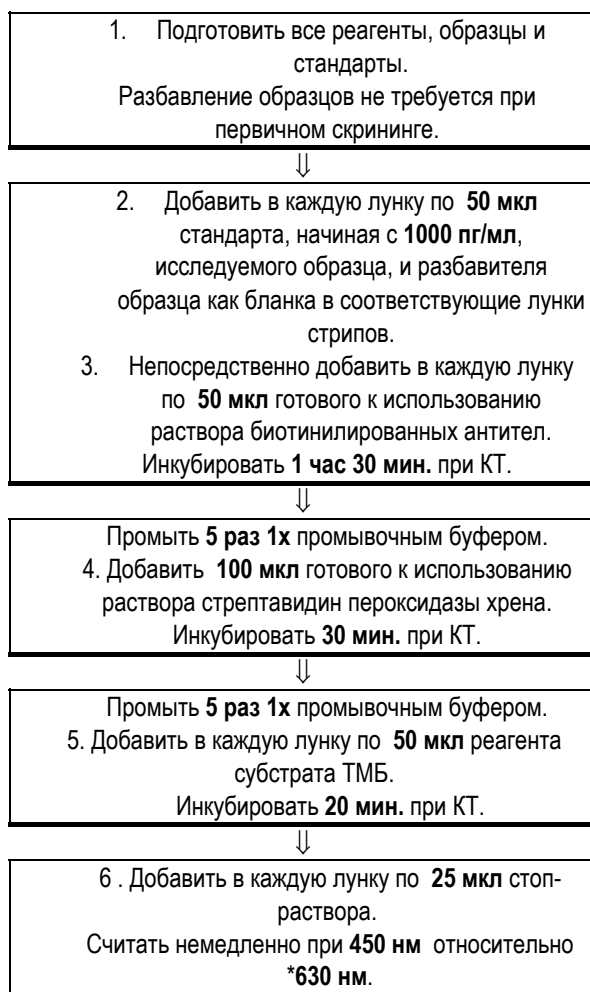
300 µl Standard (1000 pg/ml)



* Only Sample Diluent as a blank

4. **Подготовка и разбавление образца:** Не требуется разбавление образцов при первичном скрининге. Разбавитель образца используется для разбавления образцов, требующих разбавления. Хранить и разбавлять все образцы в пробирках или планшетах, изготовленных из полипропилена или материала с низкой связывающей поверхностью.
Образцы со значениями абсорбции > 1,900 могут быть последовательно разбавлены 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 разбавителем образца. При вычислении результатов должен быть принят во внимание коэффициент разбавления.
Сбор и хранение образцов: Сыворотка, ЭДТА-антикоагулирующие плазмы, цереброспинальная жидкость и жидкости культур подходят для использования в настоящем анализе (*предостережение:* отделить плазму/сыворотку и клетки крови в пределах 4 часов после сбора. Неотделенные образцы должны храниться при температуре от 2 до 8°C). Не использовать чрезвычайно гемолизированные или липемические образцы. Если образцы должны анализироваться в пределах 24 часов, они могут храниться при 2-8°C; иначе образцы должны храниться замороженными (между -18 и -32°C, предпочтительно < -70°C). До 3 циклов замораживания/размораживания не влияют на уровни IL-5 в образцах сыворотки или плазмы. Тем не менее, необходимо избегать неоднократных циклов замораживания/замораживания. Перед анализом замороженные образцы необходимо разморозить как можно скорее под проточной водой (18-25°C), не использовать для этих процедур водяную баню 37°C или 56°C.
5. **Промывочный буфер:** Если 20x концентрированный промывочный буфер содержит видимые кристаллы, нагреть его при 37°C и осторожно перемешать до растворения. Разбавить 25 мл концентрата промывочного раствора деионизированной или дистиллированной водой, чтобы получить 500 мл 1x промывочного буфера.
6. Перед использованием осторожно перемешать вортексом раствор **биотинилированных антител**.
7. Перед использованием осторожно перемешать вортексом **меченный пероксидазой авидин**.
- Предостережение:** субстрат ТМБ (тетраметилбензидин) и стоп-раствор (H_2SO_4) токсичны и едкие и должны использоваться с осторожностью. Во время применения использовать перчатки.

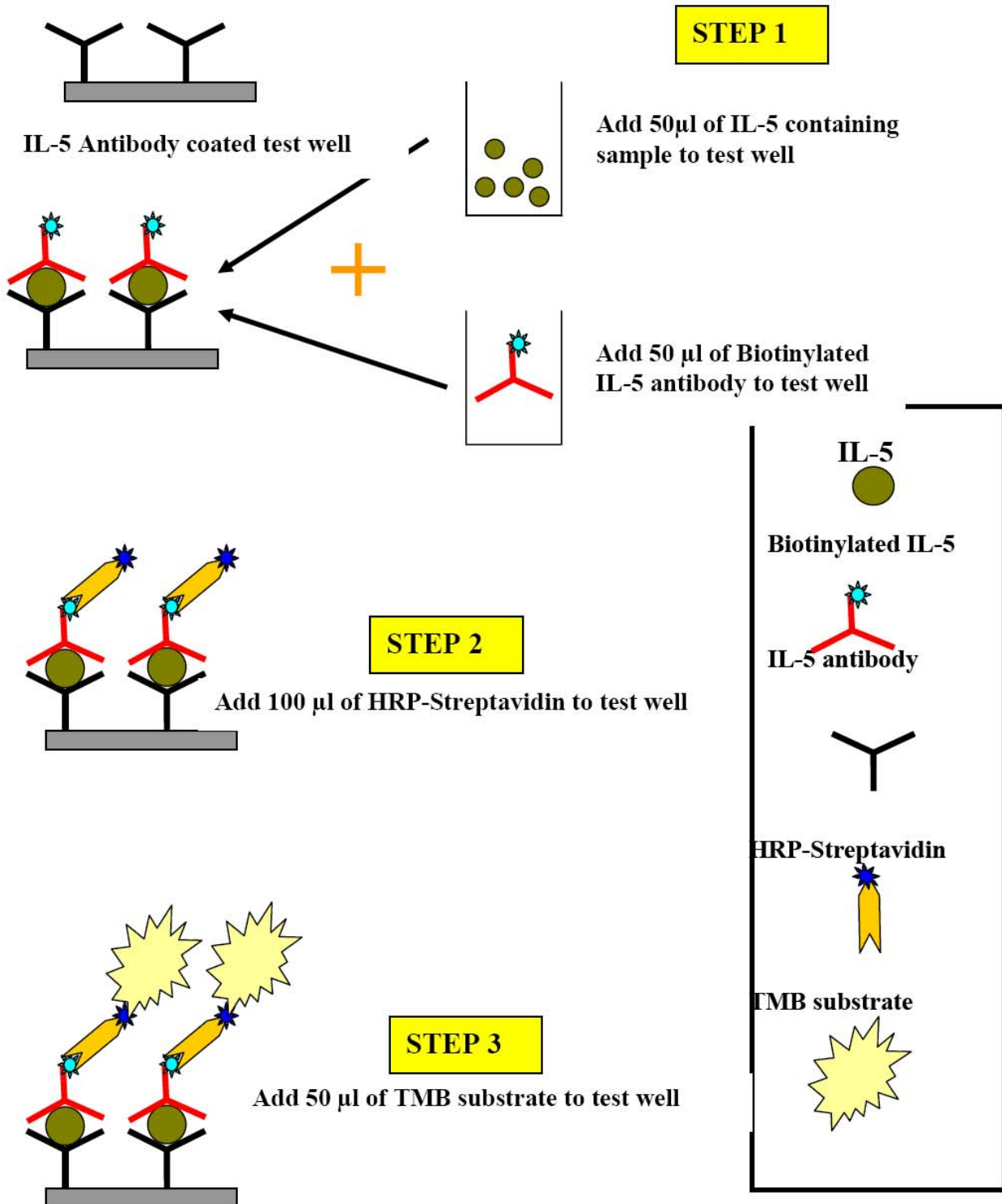
8. СХЕМА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА



*Рекомендуется проводить корректировку оптических неточностей в микропланшетах, отнимая A_{630nm} , но не в качестве обязательной процедуры.

ПРИНЦИП ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

TEST PRINCIPLE



9. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ / ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Компоненты набора должны храниться в холодильнике если не используются. Все реагенты должны быть нагреты до комнатной температуры перед использованием.
- Перед вскрытием мешков из фольги микротитрационным планшетам нужно позволить достичь комнатной температуры.
- Как только было извлечено желаемое количество стрипов, немедленно герметично закрыть мешочек и хранить при 2 - 8°C, чтобы сохранить целостность планшета. Защищать от влажности.
- Образцы должны быть собраны в пробирки не содержащие пирогена/эндотоксина.
- Образцы должны быть заморожены если не анализируются вскоре после сбора. Избегать многократных циклов размораживания/замораживания образцов. Полностью разморозить и хорошо перемешать перед анализом.
- Когда возможно избегать использования чрезмерно гемолизированных или липемических сывороток. Если присутствует большое количество макрочастиц, центрифугировать или фильтровать перед анализом.
- Рекомендуется, чтобы все стандарты, контроли и образцы использовались в двойном экземпляре.
- Образцы, которые составляют > 1000 пг/мл, должны быть разбавлены буфером разбавителя образца.
- При капании реагентов из пипетки сохранять последовательный порядок переноса из лунки в лунку. Это обеспечивает одинаковое время инкубации для всех лунок.
- Накрывать или закрыть все неиспользуемые реагенты.
- Не использовать реагенты по истечении срока годности набора.
- Считать абсорбции в пределах 20 минут после завершения анализа.
- Внутренние контроли должны применяться в каждом анализе. Если значения контролей вне предустановленных диапазонов - точность пробирного анализа под сомнением.
- Все остатки промывочной жидкости должны высушиваться в лунках достаточной аспирацией или декантацией, сопровождаемой постукиванием с усилием планшетом о промокательную бумагу. **Никогда** не вставлять промокательную бумагу непосредственно в лунку.
- Поскольку хромоген ТМБ высокочувствителен, избегать длительного контакта со светом. Также избегать контакта между стабилизированным хромогеном и металлом, иначе может развиваться цвет.

10. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Перед использованием привести все реагенты и образцы к комнатной температуре (18 - 25°C). Рекомендуется, чтобы все стандарты и образцы применялись по крайней мере в двойном экземпляре. Оставить некоторые лунки в качестве реагента бланка (от 2 до 4 лунок).

ПЕРВЫЙ ШАГ: СТАНДАРТ, ОБРАЗЦЫ И БЛАНК+РАСТВОР БИОТИНИЛИРОВАННЫХ АНТИТЕЛ

2. Раскапать в соответствующие лунки по 50 мкл образца и 50 мкл каждого разбавленного стандарта, начиная с 1000 пг/мл (более детально см. стр. 7). Раскапать по 50 мкл разбавителя образца в лунки, которые будут использоваться в качестве контрольной пробы.
3. Добавить по 50 мкл зеленого раствора биотинилированных обнаруживающих антител во все лунки, содержащие стандарты и образцы (общий реакционный объем = 100 мкл). Осторожно постучать по планшету, чтобы гомогенизировать смесь.
4. Инкубировать при комнатной температуре 1 час 30 мин. без встряхивания.

ВТОРОЙ ШАГ: СТРЕПТАВИДИН-ПЕРОКСИДАЗА ХРЕНА

5. Промыть 5 раз 1х промывочным раствором (по 300 мкл на каждую лунку).
Для промывки: Удалить содержимое планшета. Использовать многоканальную пипетку, чтобы заполнить каждую лунку 300 мкл промывочного буфера, затем удалить содержимое планшета. Повторить процедуру еще 4 раза, чтобы в сумме получилось **ПЯТЬ** промывок. Осторожно стукнуть планшетом о бумажные полотенца или другой гигроскопичный материал.
Внимание: Для автоматического промывания аспирируйте все лунки и промойте их 5 раз промывочным буфером. Постучите планшетом о бумажные полотенца или другой гигроскопичный материал. Не позволяйте реакционным лункам высохнуть. Продолжайте анализ без промедления.
6. Добавить в каждую лунку по 100 мкл подготовленного раствора стрептавидин-пероксидазы хрена (готовый к использованию). Инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре.

ТРЕТИЙ ШАГ: СУБСТРАТ ТМБ

7. Промыть 5 раз 1х промывочным раствором (300 мкл на каждую лунку).
8. Добавить в каждую лунку по 50 мкл готового к использованию реагента субстрата. Инкубировать в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте.

ЧЕТВЕРТЫЙ ШАГ: ОСТАНОВКА РЕАКЦИИ

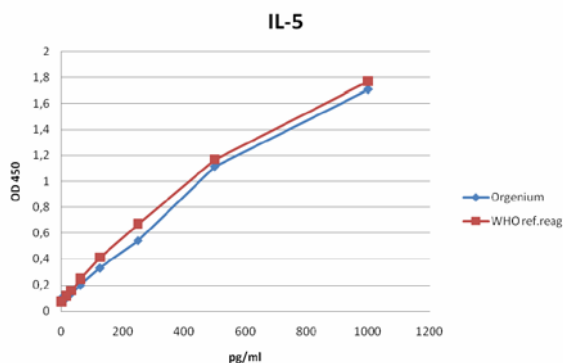
9. Добавить в каждую лунку по 25 мкл стоп-раствора. Считать при 450 нм в пределах 15 минут.

ПЯТЫЙ ШАГ: СЧИТЫВАНИЕ И ВЫЧИСЛЕНИЕ

10. Вычислить среднее из значений абсорбции реагента бланка и вычитать от всего значений исследуемых лунок (стандарта и образцов). Среднее значение реагента бланка должно быть меньше 0,200
11. Вычислить результаты относительно стандарта.

11. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Калибровочная кривая должна быть определена индивидуально для каждого эксперимента. Исправьте каждое значение абсорбции всех стандартов, вычитая ОП значения реагента бланка (Бл = только разбавитель образца). Вычислить из дубликатов среднее значение абсорбции каждого стандарта.




Калибровочная кривая используется, чтобы определить количество IL-5 в неизвестном образце. Калибровочная кривая производится изображением средней ОП (450 нм), полученной для каждой из концентраций стандартов на вертикальной (Y) оси против соответствующей концентрации IL-5 (пг/мл) на горизонтальной (X) оси.

Создать калибровочную кривую, используя миллиметровку или статистическое программное обеспечение.

Если образцы производят значения выше чем самый высокий стандарт, разбавить образцы разбавителем образца и повторить анализ. Концентрация, полученная из калибровочной кривой должна быть умножена на коэффициент разбавления.

12. ТИПИЧНЫЕ ДАННЫЕ

Следующие данные были получены для различных стандартов IL-5 в диапазоне от 0 до 1000 пг/мл. График также показывает данные калибровки референтного стандарта ВОЗ, сравненные со стандартом компании «Орджениум».

 стандарт Orgenium

 референтный реагент ВОЗ

13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

	IL-5
Диапазон анализа	15,62 -1000 пг/мл
Точки калибровочной кривой	1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62 и 0 пг/мл.
Точность в анализе	≤9%
Точность между анализами	≤7%
Точность между сериями	≤12%
Перекрестная реактивность	Перекрестной реактивности не наблюдалось в следующий рекомбинантах белков человека: IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-13, TNF α, тимус и регулируемом активацией хемокине (TARC)
Интерференция	Нет интерференции к билирубину до 0,3 мг/мл, гемоглобину до 8 мг/мл и триглицеридам до 5 мг/мл.
Специфичность	Отличает и природный и рекомбинантный человеческий IL-5.
Чувствительность	<15 пг/мл

14. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Данный набор предназначен только для использования в исследовательных целях обученным квалифицированным персоналом.

Если этот набор каким-либо образом попадет в руки третьих лиц, данная инструкция должна прилагаться и информировать получателя об ограничении ответственности со стороны компании Orgenium Laboratories; последующее использование набора является ответственностью получателя.

Компания Orgenium Laboratories не несет ответственности за повреждения или утраты, связанные с нецелевым использованием набора.

Ответственность компании Orgenium Laboratories ни в коем случае не может превышать коммерческую стоимость набора.

Компания Orgenium Laboratories ни при каких обстоятельствах не несет ответственности за прямые, особые или косвенные повреждения включая, но не ограничиваясь потерей прибыли.

15. ОБНАРУЖЕНИЕ И УСТРАНЕНИЕ ТРУДНОСТЕЙ

Проблема	Причина	Решение
Некачественная калибровочная кривая	1. Неточное капанье или ошибка капанья. 2. Неправильное разбавление стандарта. 3. Бактериологическое загрязнение реагентов.	Проверять пипетки и регулярно калибровать. Перемешать вортексом состав перед использованием и осторожно разбавить в пробирке Эппендорфа.
Слабый сигнал	1. Инкубация короче рекомендуемой. 2. Несоответствующие объемы реагента, неправильное разбавление или ошибка капанья.	Убедиться в достаточности времени инкубации. Проверить пипетки и убедиться в правильности их работы.
Большой КВ	Неправильное капанье и высушивание лунок в течении процедуры анализа.	Проверить пипетки. Немедленно заполнить лунки промывочным буфером и реагентами.
Высокий фон	1. Недостаточная промывка планшета. 2. Загрязненный промывочный буфер. 3. Объем промывочного буфера меньше рекомендуемого.	Посмотреть руководство по правильности промывки. При использовании планшетного промывателя проверить открытость и чистоту всех проточных путей. Приготовить новый промывочный буфер. Использовать 300 мкл/лунку.
Низкая чувствительность	1. Неправильное хранение набора ИФА. 2. Стоп-раствор. 3. Загрязнение реагентов.	Хранить компоненты набора для исследования следуя рекомендациям настоящего руководства пользователя. Защищать раствор субстрата от света. Стоп-раствор должен добавляться в каждую лунку перед измерением. Использовать чистые стерильные наконечники. Удалить загрязненные реагенты.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua