



## Набор ИФА для определения человеческого интерлейкина (IL-10)

Кат. № : IL10001  
Количество : 96  
Производитель : Origenium (Финляндия)

Версия 1.10

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

### ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ

#### 1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА интерлейкин-2 (IL-10) компании «Орджениум Лабораториз» является ферментосвязанным иммуносорбентным анализом для количественного определения человеческого IL-10 в супернатантах культуры клеток, плазме (гепариновой или цитратной), сыворотке, моче и других жидкостях тела. Анализ определяет как природный, так и рекомбинантный человеческий IL-10.

#### 2. ВВЕДЕНИЕ

Настоящий набор является ферментосвязанным иммуносорбентным анализом *in vitro* для количественного определения человеческого IL-10 в супернатантах культуры клеток, плазме, сыворотке и моче. Этот анализ использует антитело, свойственное для человеческого IL-10, нанесенное на 96-луночный планшет. Стандарты, образцы и биотинилированный анти-человеческий IL-10 каплются в лунки и IL-10, присутствующий в образце, захватывается антителом, иммобилизованным на лунках и биотинилированным IL-10 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-10. Стоп-раствор изменяет цвет из синего на желтый, и интенсивность цвета измеряется при 450 нм.

#### 3. СОСТАВ НАБОРА

Компоненты набора	Количество/Объем
<b>96-луночный планшет с 12 стрипами</b> Делимые микротирационные стрипы для анализа, каждый с антителом IL-10, нанесенным на отдельные лунки.	1 рамка
<b>Стандарт IL-10 250 пг/мл</b> Лиофилизированный и стабилизированный рекомбинант человеческого IL-10, перед использованием добавить 1 мл разбавителя образца.	2 x 1 мл
<b>Раствор биотинилированных антител IL-10</b> Готов к использованию.	10 мл
<b>Авидин, конъюгированный пероксидазой хрена</b> Готов к использованию.	12 мл
<b>20x концентрат промывочного раствора (достаточно для 1000 мл)</b> Разбавить 1:20	50 мл
<b>Разбавитель образца</b> Готов к использованию.	100 мл
<b>Сток-раствор</b> 0,9N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Готов к использованию.	8 мл
<b>Субстрат ТМБ</b> Готов к использованию.	8 мл

#### 4. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагент	Хранение	Стабильность
<b>96-луночный планшет с 12 стрипами.</b> Делимые микротирационные стрипы для анализа с 8 отдельными лунки, 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
<b>Стандарт IL-10.</b> Готов к использованию.	Хранить при 2-8°C.	До истечения срока годности набора в лиофилизированном виде. По крайней мере 3 недели после растворения разбавителем образца.
<b>Раствор биотинилированных антител.</b> Готов к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники!)</i>	3 месяца после вскрытия
<b>Авидин, конъюгированный пероксидазой хрена.</b> Готов к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники!)</i>	3 месяца после вскрытия
<b>Разбавитель образца.</b> Готов к использованию.	Хранить при 2-8°C. <i>Избегать загрязнения (использовать чистые стерильные наконечники или пипетки!)</i>	3 месяца после вскрытия
<b>20x концентрат промывочного буфера.</b> Разбавленный промывочный буфер	Хранить при комнатной температуре. 1x рабочее разбавление. <i>Бутылки, используемые для рабочего разбавления, должны регулярно промываться. Уничтожить мутные растворы</i>	До истечения срока годности при комнатной температуре. 5 рабочих дней при комнатной температуре или 2 недели при +4°C.
<b>Раствор ТМБ-субстрата.</b> 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).
<b>Сток-раствор.</b> 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.
- Градуированные колбы объемом 100 мл и 1 л.
- 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

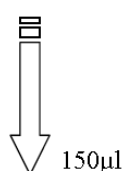
## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ

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 16 лунок, необходимых для стандартов и бланков 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:**
  - а) Добавить **150 мкл** стандарта IL-10, который содержит 250 пг/мл IL-10 и 150 мкл разбавителя образца, пробирку **1**, получив концентрацию IL-10 125 пг/мл (пробирка стандарта 1).
  - б) Добавить **150 мкл** разбавителя образца в другие **5** пробирок. Взять 150 мкл из **1** пробирки (125 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 6 пробирок для разбавления).
  - в) Разбавитель образца служит в качестве нулевого стандарта (0 нг/мл) в пробирке **7**, (использовать по крайней мере 2 лунки в качестве контрольной пробы). Избегать перекрестных загрязнений во время пипетирования.

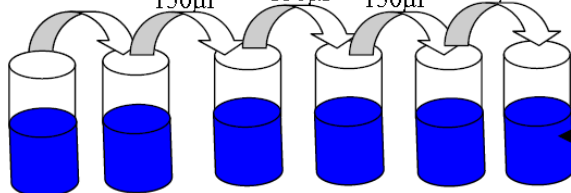
150 µl Standard (250 pg/ml)

+

150 µl Sample Diluent



150µl



125  
pg/ml

62,5  
pg/ml

31,5  
pg/ml

15,6  
pg/ml

7,8  
pg/ml

3,9  
pg/ml

\* Only Sample  
Diluent as a blank



150µl



\*150 µl

\*150 µl

0  
pg/ml

\* Только разбавитель образца в качестве контрольной пробы

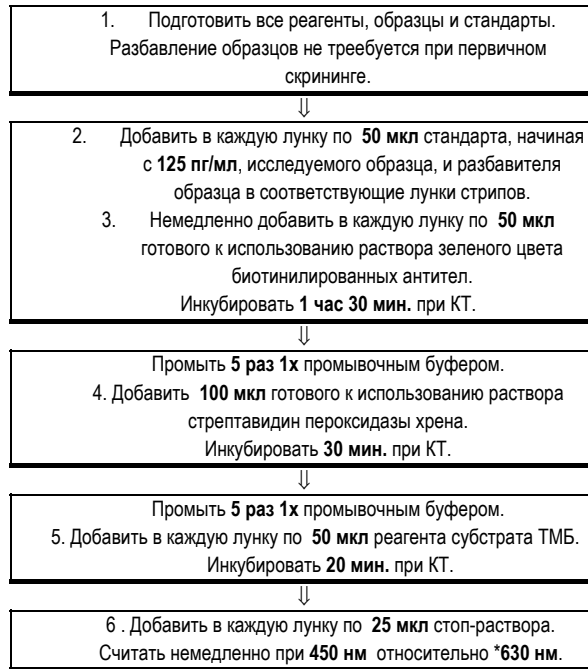
4. **Подготовка и разбавление образца:** Разбавитель образца используется для разбавления сыворотки/плазмы, культуры супернатантов и мочи), требующих разбавления. Хранить и разбавлять все образцы в пробирках или планшетах, изготовленных из материала с низкой связывающей поверхностью, типа полипропилена.

**Разбавление образцов:** Не требуется разбавление образцов при первичном скрининге. Образцы, которые превышают диапазон измерений, должны быть разбавлены разбавителем образца 1:2 или 1:5 и измерены снова. Образцы со значениями меры поглощения света > 1,900 могут быть последовательно разбавлены 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-10 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 20х 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 1х промывочного буфера.
6. Перед использованием осторожно перемешать вортексом раствор **биотинилированных антител**.
7. Перед использованием осторожно перемешать **меченный пероксидазой авидин**.
- Предостережение:** субстрат ТМБ (тетраметилбензидин) и стоп-раствор ( $H_2SO_4$ ) токсичные или 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.

## 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 > 125 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 лунки.
- 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 250 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.

### ВТОРОЙ ШАГ: СТРЕПТАВИДИН-ПЕРОКСИДАЗА ХРЕНА

4. Инкубировать при комнатной температуре 1 час 30 мин. без встряхивания.
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 автоматизированной промывки аспирировать все лунки и промыть 5 раз промывочным буфером. Стукнуть планшетом о бумажные полотенца или другой гигроскопичный материал. Никогда не позволять реакционным лункам высыхать. Продолжить следующий этап без задержки или прерывания.

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.

Корректировка оптический интерференций в микропланшете путем вычитания А630 нм рекомендованная, но не обязательная процедура.

### 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 меры поглощения света всех стандартов, вычитая ОП значения реагента бланка (Бл = только разбавитель образца). Вычислить из дубликатов среднее значение абсорбции каждого стандарта.

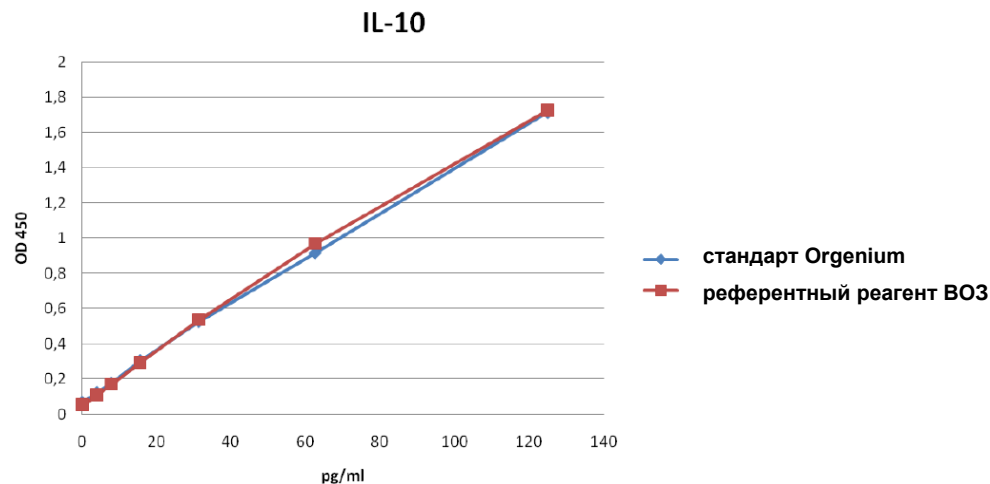
Калибровочная кривая используется, чтобы определить количество IL-10 в неизвестном образце. Калибровочная кривая производится изображением средней ОП (450 нм), полученной для каждой из концентраций стандартов на вертикальной (Y) оси против соответствующей концентрации IL-10 (пг/мл) на горизонтальной (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-10 в диапазоне от 0 до 500 пг/мл. График также показывает данные калибровки референтного стандарта ВОЗ, сравненные со стандартом компании «Орджениум».



\* Среднее значение разбавителя образца должно составлять менее 0,200.

### 13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

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

**14. ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**15. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ**

Настоящий набор предназначен только для использования в исследовательских целях квалифицированным и компетентным персоналом, выполняющим диагностические или исследовательские процедуры.

Если получатель настоящего набора передает его любым способом третьему лицу, эта инструкция, должна прилагаться, и вышеуказанный получатель должен под собственную ответственность обеспечить в пользу производителя все ограничения ответственности здесь изложенные.

Компания-производитель не несет ответственности за любые повреждения или потери из-за использования набора в любых случаях кроме тех, которые четко указаны в этой инструкции.

Ответственность производителя ни в коем случае не должна превышать коммерческой стоимости набора.

Производитель ни в коем случае не несет ответственности за косвенные, умышленные или наследственные повреждения, включая, но не ограничиваясь потерей прибыли.

**16. ОБНАРУЖЕНИЕ И УСТРАНЕНИЕ ТРУДНОСТЕЙ**

Проблема	Причина	Решение
<b>Некачественная калибровочная кривая</b>	1. Неточное капанье или ошибка капанья. 2. Неправильное разбавление стандарта. 3. Бактериологическое загрязнение реагентов.	Проверить пипетки и регулярно калибровать. Перемешать вортексом состав перед использованием и осторожно разбавить в пробирке Эппендорфа.
<b>Слабый сигнал</b>	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.
<b>Большой КВ</b>	Неправильное капанье и высушивание лунок в течении процедуры анализа.	Проверить пипетки. Немедленно заполнить лунки промывочным буфером и реагентами.
<b>Высокий фон</b>	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.
<b>Низкая чувствительность</b>	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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)