Українська

Інструкція з використання

Інтерферон-альфа ІФА

Імуноферментний аналіз для кількісного виявлення людського IFN-альфа.

REF **30150434**

Σ **96**

2-8°C

Тільки для дослідницьких цілей.
Не використовувати для діагностики.

I B L I N T E R N A T I O N A L G M B H

Flughafenstrasse 52a **Phone: +49 (0)40-53 28 91-0** **IBL@IBL-International.com**
D-22335 Hamburg, Germany **Fax: +49 (0)40-53 28 91-11** **www.IBL-International.com**

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua

ЗМІСТ

1 Призначення 1
2 Загальна інформація 1
3 Принципи аналізу 2
4 Надані реагенти 3
5 Інструкції з зберігання - набір ІФА 3
6 Інструкції щодо збору та зберігання зразків 3
7 Необхідні, але не забезпечені матеріали 3
8 Заходи безпеки 4
9 Підготовка реагентів 4
10 Протокол випробувань 6
11 Розрахунок результатів 9
12 Обмеження 10
13 Характеристики експлуатації 10
14 Інформація для замовлення 13
15 Узагальнення підготовка реагентів 14
16 Узагальнення протокол випробувань 14

1 Призначення

Інтерферон – альфа - ІФА являє собою імуноферментний аналіз для кількісного визначення людського ІФН - альфа. **ІФН альфа - ІФА людини використовується тільки для досліджень. Не для діагностики або терапевтичних процедур.**

2 Загальна інформація

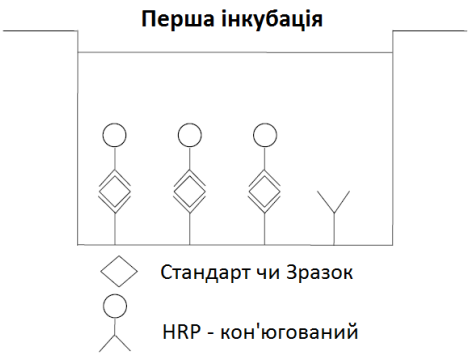
Інтерферони являють собою білки з противірусною активністю, секретуються з клітин у відповідь на різноманітні стимули. У ссавців гени інтерферону класу I (IFN) утворюють суперсімейство , що складається з трьох генів сімейств, альфа-інтерферон (IFN альфа), бета-інтерферон (IFN-бета) і інтерферон омега (IFN) омега) гени (1). У людях сім'я IFN альфа містить більше 20 генів і псевдогенів породжують 15 різних функціональних генних продуктів. Існують різні види людського IFN-альфа
тісно пов'язані в амінокислотних послідовностях з гомологіями в діапазоні від 80 до 100%. Молекулярна вага рекомбінантного людського IFN альфа-виду становить близько 19 кДа, що складається з 166 (165 для IFN альфа-2) амінокислотних залишків, які не мають N- глікозилювання (альфа-14 має N-глікозилювання). Цистин опосередковані дисульфидні зв'язки є істотними для біологічної активності IFN альфа. Середню структуру IFN альфа визначали переважно як альфа-спіральну. Цільовий аналіз альфа-IFN людини припускає, що функціональна одиниця є мономером. Гени, що кодують всі відомі інтерферони класу I,були розташовані до хромосом 9, кодують послідовності (кДНК) субклоновані і охарактеризовані. Високий рівень експресії інтерферонів досягався в E. coli, що дає зростання білку по суті ідентичне природному білку.
Інтерферони виявляють величезну кількість біологічних ефектів. Антивірусна активність призвела до назви інтерферону і служить для визначення одиниці активності інтерферону. Про очищення природної людини інтерферонів лейкоцитів (IFN альфа), було виявлено, що всі фракції, які проявляли противірусну активність, також проявляли анти-зростання активність. Це спостереження було підтверджено очищеними рекомбінантними інтерферонами і поширюється на інші види діяльності, такі як: стимулювання цитотоксичної активності лімфоцитів і макрофаги, активність природних клітин – кілерів , а також збільшення експресії деяких асоційованих з пухлиною антигенів.
Основним ефектом інтерферонів є їх модуляція антигенів основного комплексу гістосумісності (ОГС). Всі інтерферони індукують збільшення поверхневої експресії антигенів ОГС класу I. Вираз Fc-рецепторів також стимулюється інтерфероном. Зміни в поверхневих антигенах можуть бути важливим механізмом, за

допомогою якого інтерферон може модулювати клітинні взаємодії. Взаємодія інтерферонів з їх рецепторами визначають біохімічні події та їх модуляцію клітинної
функції. Це складний процес, який спочатку розкривається.

3 Принципи аналізу

Антитіло до анти-людського IFN-альфа-покриття
адсорбується на мікро лунки. Малюнок 1

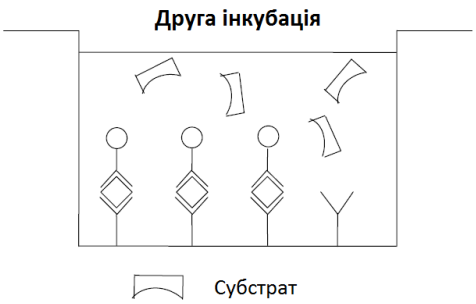
Людський IFN альфа, присутній у зразку або стандарті зв'язується з антитілами, адсорбованими на мікролунках. HRP-кон'юговане
людське IFN-альфа-антитіло додають і зв'язується з людським IFN альфа, захопленим першим антитілом. Малюнок 2



анти-

Перша інкубація
інкубації незв'язаний HRP-кон'югований анти людський IFN видаляють під час етапу промивання, і розчин субстрату, реактивний з HRP, додається до лунок.

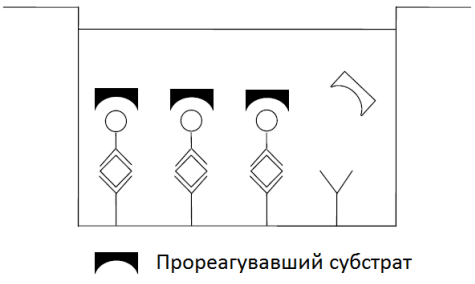
Малюнок 3



Після альфа

Кольоровий виріб формується пропорційно до кількості людського IFN альфа, присутнього в зразку або стандарті. припиняють додаванням кислоти і абсорбцію вимірюють нм. Стандартна крива,
приготовану з 7 людських стандартних розведень IFN концентрацію IFN - альфа людини визначають.

Малюнок 4



Реакцію при 450

альфа і

4. Реагенти надані

MTP 1 Алюмінієвий пакет з мікропланшетом , покритий моноклональним антитілом людського IFN альфа
ENZCONJ CONC 1 флакон (200 мкл) HRP-кон'югат анти-людський IFN альфа - моноклональне антитіло
CAL LYO 2 флакони людського IFN альфа Стандартний ліофілізований, 1000 пг / мл після відновлення
ASSAYBUF CONC 1 флакон (5 мл) **Концентрат буферного аналізу** 20x(PBS з 1% Tween 20, 10% BSA)
WASHBUF CONC Концентрат 1 флакон (50 мл) Концентрат буфера для промивання 20x
(PBS з 1% Tween 20)

SUBS 1 флакон (15 мл) Розчин субстрату (тетраметилбензидин)
STOP 1 флакон (15 мл) Стоп-розчин (1М фосфорна кислота) 2 клейкі плівки

5 Інструкції з зберігання - Набір ІФА

Зберігайте реактиви від 2 до 8 ° С.
Відразу після використання решту реагентів слід повернути в холодне зберігання (від 2 ° до 8 ° С). Закінчення терміну придатності набору і реагентів вказані на етикетках.
Термін придатності компонентів набору може бути гарантований лише в тому випадку, якщо компоненти зберігаються належним чином, і якщо, в разі повторного використання одного компонента цей реагент не забруднюється першою обробкою.

6 Інструкції щодо збору та зберігання зразків

Супернатант клітинної культури, сироватки і плазми (EDTA, цитрат і гепарин) тестували за допомогою цього аналізу.
Для тестування можуть бути придатні інші рідини організму. Видаліть сироватку з згустку, як тільки буде можливо після згортання.
Зразки, що містять видимий осад, повинні бути очищені перед використанням в аналізі. Не використовуйте грубо гемолізовані або ліпемічні зразки.
Зразки повинні бути аліквотовані і повинні зберігатися замороженими при -20 ° С, щоб уникнути втрати біоактивного людського IFN альфа. Якщо зразки повинні бути прогнані протягом 24 годин, вони можуть зберігатися при температурі від 2 ° до 8 ° С (стабільність зразка див. 13.5).
Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Перед аналізом заморожений зразок повинен бути приведений до кімнатної температури, повільно і обережно перемішаний.

7 Матеріали необхідні, але не надані

- 5 мл і 10 мл градуйовані піпетки
- 5 мкл до 1000 мкл регульованих одноканальних мікропіпеток з одноразовими наконечниками
- 50 мкл до 300 мкл регульованої багатоканальної мікропіпетки з одноразовими наконечниками
– Багатоканальний резервуар для мікропіпеток
- Мензурки, колби, балони, необхідні для приготування реагентів
- Пристрій для доставки миючого розчину (багатоканальна промивна пляшка або автоматична промивна система)
– рідер мікропланшетів, здатний до читання при 450 нм (620 нм як необов'язкова довжина референтної хвилі)
– дистильована в склі або дейонізована вода
- Статистичний калькулятор з програмою для регресійного аналізу

8 Заходи безпеки

Усі хімікати слід розглядати як потенційно небезпечні. Тому ми рекомендуємо цей продукт обробляти тільки тими особами, які пройшли підготовку з лабораторних методів і хімікати повинні використовуватися у відповідності з принципами належної лабораторної практики. Носіть відповідний захисний одяг, наприклад, лабораторний комбінезон, захисні окуляри та рукавички. Слід бути обережним щоб уникнути контакту з шкірою або очима. У разі контакту з шкірою або очима негайно промити з водою. Ознайомтеся з інформаційним паспортом (ами) безпеки та / або заявою (и) про безпеку для конкретної консультації.
- Реагенти призначені тільки для досліджень і не призначені для використання в діагностичних або терапевтичних процедурах.

- Не змішуйте і не замінюйте реагенти з реагентами з інших партій або інших джерел.
– Не використовуйте реагенти набору після закінчення терміну придатності на етикетці.
– Уникайте впливу сильного світла на реагенти під час зберігання або інкубації.
- Не піпетуйте ротом.
- Не їжте і не курите в місцях, де обробляються реагенти або зразки набору.
- Уникайте контакту шкіри або слизових оболонок з реагентами або зразками набору.
При роботі з реагентами або зразками комплекту слід носити гумові або одноразові латексні рукавички.
- Уникайте контакту розчину субстрату з окислювачами та металом.
- Уникайте розбризкування або утворення аерозолів.
- Щоб уникнути мікробного забруднення або перехресного забруднення реагентів або зразків, які можуть призвести до недійсності тестування , використовуйте одноразові наконечники і / або піпетки.
- Використовуйте чисті, спеціальні лотки для реагентів для дозування реагенту-кон'югату та субстрату.
- Вплив кислоти інактивує кон'югат.
- Для приготування реагенту необхідно використовувати дистильовану в склі або дейонізовану воду.
- Розчин субстрату перед використанням повинен бути доведений до кімнатної температури.
- Дезактивувати та утилізувати зразки та всі потенційно забруднені матеріали, так ,якби вони можуть містять інфекційні агенти. Кращим способом дезактивації є автоклавування мінімум 1 год при 121,5 ° С.
- Рідкі відходи, що не містять кислоти та нейтралізовані відходи, можуть змішуватися з гіпохлоритом натрію у об'ємах таким чином, що кінцева суміш містить 1,0% гіпохлориту натрію. Дозвольте 30 хвилин для ефективної дезактивації. Рідкі відходи, що містять кислоту, повинні бути нейтралізовані до додавання гіпохлориту натрію.

9 Підготовка реагентів

Буферні концентрати необхідно довести до кімнатної температури і розбавити перед початком процедури аналізу.
Якщо в буферних концентратах утворилися кристали, обережно підігрійте їх, поки вони повністю не будуть розчинені.

9.1 Буфер для промивання

Залийте весь вміст (50 мл) концентрованого буфера для промивання (20х) у чистий 1000 мл градуйований циліндр. Доводять до кінцевого об'єму 1000 мл з дистильованою в склі або дейонізованою водою . Обережно перемішати, щоб уникнути піноутворення.
Перенести в чисту промивну пляшку і зберігайте при температурі від 2 до 25 ° С. Зверніть увагу, що буфер для промивання (1х) стабільний 30 днів.
Буфер для промивання (1х) також може бути приготований за необхідністю згідно з наступною таблицею:

Кількість стріпів	Промивний буфер концентрат (20х) мл	Дистильована вода (мл)
1-6	25	475
1-12	50	950

9,2 Буфер аналізу (1х)

Влийте весь вміст (5 мл) концентрату буферного аналізу (20х) в чистий 100 мл градуйований циліндр. Доводять до кінцевого об'єму 100 мл дистильованою водою. Обережно перемішати, щоб уникнути піноутворення.
Зберігати при температурі від 2 ° до 8 ° С. Зверніть увагу, що буфер для аналізу (1х) стабільний протягом 30 днів.
Буфер для аналізу (1х) також може бути приготований за необхідністю згідно з наступною таблицею:

Кількість стрипів	буфер аналізу концентрат (20х) мл	Дистильована вода (мл)
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

9.3 HRP-кон'югат

Зверніть увагу, що HRP-кон'югат слід використовувати протягом 30 хвилин після розведення.

Зробити 1: 100 розведення концентрованого розчину HRP-кон'югату з буфером для аналізу (1х) у чисту пластикову пробірку за необхідності згідно з наступною таблицею:

Кількість стріпів	HRP-кон’югат мл	Буфер аналізу 1х (мл)
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

9.4 Людський стандарт IFN альфа

Відтворюють людський стандарт IFN альфа додаванням дистильованої води. Об'єм відтворення зазначений на етикетці стандартного флакона. Прокрутіть або обережно перемішайте, щоб забезпечити повну і однорідну солюбілізацію (концентрація відтвореного стандарту = 1000,0 пг / мл). Дозвольте стандарту відновитися протягом 10-30 хвилин. Добре перемішують перед внесенням розведень.

Після використання стандарт , який залишився, не може бути збережений і його потрібно видалити.

Стандартні розведення можуть бути приготовані безпосередньо на мікропланшеті (див. 10.c) або альтернативно в пробірках (див.9.4.1)

9.4.1 Зовнішнє стандартне розведення

Позначте 7 пробірок, по одній для кожної стандартної точки.

S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7

Потім готують 1: 2 серійні розведення для стандартної кривої наступним чином:

Внесіть 225 мкл буфера для аналізу (1х) у пробірки S1 - S7.

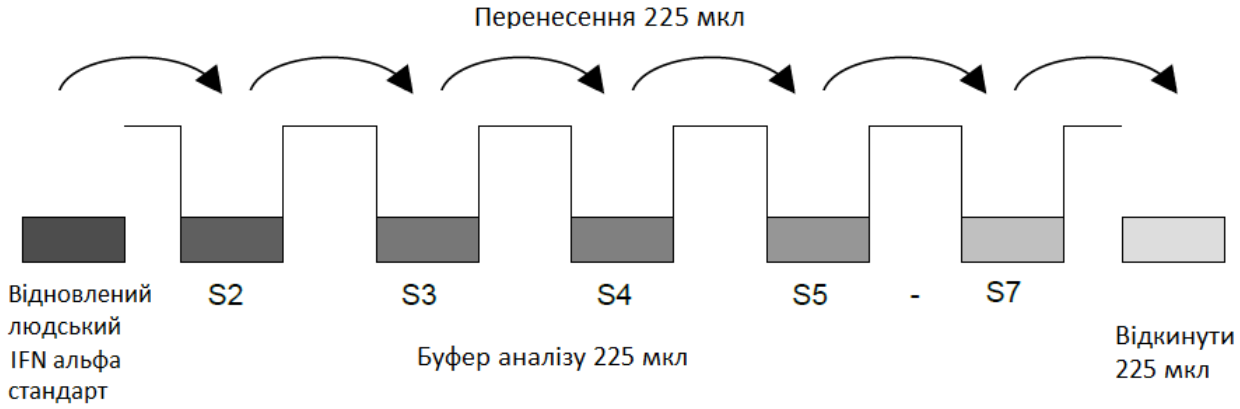
Внесіть 225 мкл розведеного стандарту (концентрація = 1000 пг / мл) у першу пробірку, позначену S1, і змішують (концентрація стандарту 1 = 500 пг / мл).

Внесіть 225 мкл цього розведення у другу пробірку, позначену S2, і ретельно перемішайте до наступної передачі.

Повторюйте серійні розведення ще 5 разів, створюючи, таким чином, точки стандартної кривої (див. Рис. 5).

Буфер аналізу (1х) служить порожньою (бланк).

Малюнок 5.



10 Протокол аналізу

а. Визначити кількість мікростріпів , необхідних для аналізування необхідної кількості зразків плюс відповідну кількість лунок, необхідних для прогону порожніх (бланк) і стандартів. Кожен зразок,

стандарт,порожній і необов'язковий контрольний зразок повинні бути проаналізовані у двох примірниках. Зніміть надлишкові мікростріпи з тримача і зберігайте в плівковому мішку з наданим осушувачем при 2 ° -8 ° C герметично закритим.

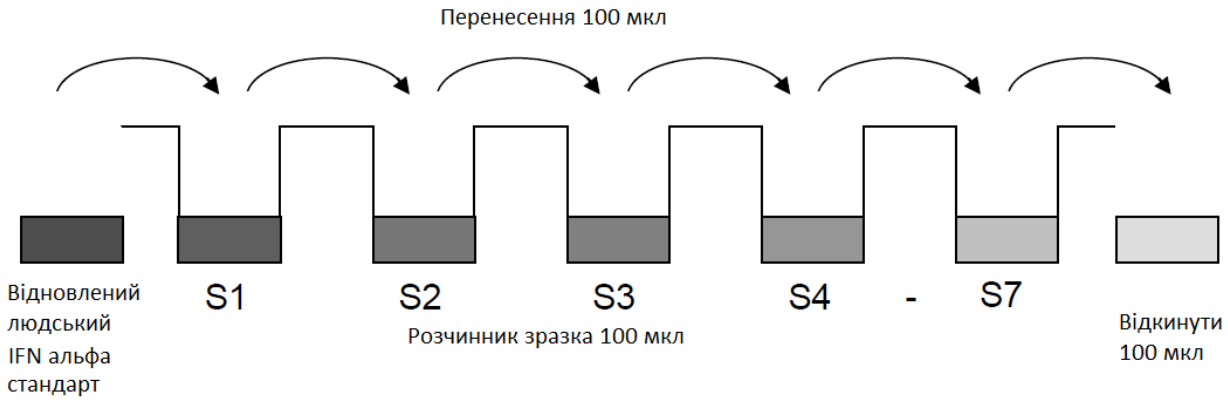
b. Промийте мікролунки стріпів двічі приблизно 400 мкл буфера для промивання на лунку з ретельною аспірацією вмісту мікролунок між промивками. Дозвольте буферу для промивання знаходитись в лунках приблизно 10 - 15 секунд перед аспірацією. Будьте обережні, щоб не подряпати поверхню мікролунок. Після останнього етапу промивання опорожнити лунки та постукати стріпами мікропланшету об абсорбуючу прокладку або паперовий рушник для видалення надлишку буфера. Використовуйте стріпи мікропланшету відразу після миття. Альтернативно стріпи мікролунок можуть бути розміщені догори ногами на вологому абсорбуючому папері не довше ніж 15 хвилин. **Не допускайте висихання лунок.**

c. Стандартне розведення на мікропланшеті.

(Альтернативно стандартне розведення можна приготувати в пробірках - див. 9.4.1):

Додають по 100 мкл буфера для аналізу (1х) у дублікатах до всіх лунок стандартів. Прокапати 100 мкл стандартів (див. Підготовка стандарту 9.4, концентрація = 1000 пг / мл) у дублікатах у лунку A1 і A2 (див. таблицю). Змішати вміст лунок A1 і A2 шляхом повторної аспірації та видалення (концентрація стандарту 1 S1 = 500,0 пг / мл), і перенесення 100 мкл в лунки B1 і B2, відповідно (див. малюнок 6). Будьте обережні, щоб не подряпати внутрішню поверхню мікролунок. Продовжити цю процедуру 5 разів, створюючи два ряди людських IFN альфа-стандартних розведень, починаючи від 500,0 до 7,8 пг / мл. Видаляють 100 мкл вмісту з останніх використовуваних мікролунок (G1, G2)

Малюнок 6 (див. оригінал інструкції)



У разі **зовнішнього стандартного розведення** (див. 9.4.1), прокапайте 100 мкл цих стандартних розведень (S1 - S7) в стандартних лунках згідно Таблиці 1.

Таблиця 1

Таблиця, що зображає приклад розташування порожніх (бланк), стандартів і зразків в мікролунках стріпів :

	1	2	3	4
A	**Стандарт 1 (500,0 пг/мл)**	**Стандарт 1 (500,0 пг/мл)**	**Зразок 1**	**Зразок 1**
B	**Стандарт 2 (250,0 пг/мл)**	**Стандарт 2 (250,0 пг/мл)**	**Зразок 2**	**Зразок 2**
C	**Стандарт 3 (125,0 пг/мл)**	**Стандарт 3 (125,0 пг/мл)**	**Зразок 3**	**Зразок 3**
D	**Стандарт 4 (62,5 пг/мл)**	**Стандарт 4 (62,5 пг/мл)**	**Зразок 4**	**Зразок 4**
E	**Стандарт 5 (31,3 пг/мл)**	**Стандарт 5 (31,3 пг/мл)**	**Зразок 5**	**Зразок 5**
F	**Стандарт 6 (15,6 пг/мл)**	**Стандарт 6 (15,6 пг/мл)**	**Зразок 6**	**Зразок 6**

G	**Стандарт 7 (7,8 пг/мл)**	**Стандарт 7 (7,8 пг/мл)**	**Зразок 7**	**Зразок 7**
H	**Порожня(бланк)**	**Порожня (бланк)**	**Зразок 8**	**Зразок 8**

d. Додають по 100 мкл буфера аналізу (1х) у дублікатах до порожньої лунки (бланк).
e. Додайте 80 мкл буфера для аналізу (1х) до лунок зразка.
f. Додають по 20 мкл кожного зразка в дублікаті до лунок зразка.
g. Готують HRP-кон'югат (див. Підготовка HRP-кон'югату 9.3).
h. Додайте 50 мкл HRP-кон'югату до всіх лунок.
i. Накривають клейкою плівкою і інкубують при кімнатній температурі (18 до 25 ° C) протягом 2 годин, якщо він є на шейкері для мікропланшетів, встановленому на 400 об / хв.
j. Зняти клейку плівку і опорожнити лунки. Промийте мікролунки стріпів 3 рази відповідно до пункту b. Протоколу аналізу. Негайно перейдіть до наступного кроку.
k. Введіть 100 мкл субстратного розчину ТМБ у всі лунки.
l. Інкубуйте мікролунки стріпів при кімнатній температурі (від 18 ° до 25 ° C) протягом приблизно 10 хв. Уникайте прямого впливу інтенсивного світла.
Розвиток кольору на пластині слід контролювати і реакцію субстрату зупинити (див. наступну точку цього протоколу) до того, як позитивні лунки більше не записувані належним чином.
Визначення ідеального періоду часу для розвитку кольору має бути зроблено індивідуально для кожного аналізу.
Рекомендується додати стоп-розчин, коли найвищий стандарт розвив темно-синій колір колір. Альтернативно, розвиток кольору можна контролювати з допомогою рідера ІФА при 620 нм. Реакцію субстрату слід припинити, як тільки стандарт 1 досягне ОГ 0,9 - 0,95.
m. Зупиніть реакцію ферменту, швидко ввівши по 100 мкл стоп-розчину в кожну лунку. Це важливо, щоб стоп-розчин розповсюджувався швидко і рівномірно по всіх мікролунках до повної інактивації ферменту. Результати повинні бути прочитані відразу після того, як стоп-розчин буде додано або протягом однієї години, якщо мікролунки стріпів зберігаються при температурі 2-8 ° C у темряві.
n. Зчитуємо абсорбцію кожної мікролунки на спектрофотометрі, використовуючи 450 нм як первинну довжину хвилі (необов'язково 620 нм як еталонна довжина хвилі; 610 нм - 650 нм є прийнятною). Налаштуйте рідер мікропланшетів на «нуль» згідно інструкцій виробника, використовуючи порожні лунки (бланк). Визначте абсорбцію як зразків, так і стандартів.
Примітка: У разі інкубації без струшування отримані значення О.Г. можуть бути нижчими, ніж зазначено нижче. Проте результати все ще дійсні.

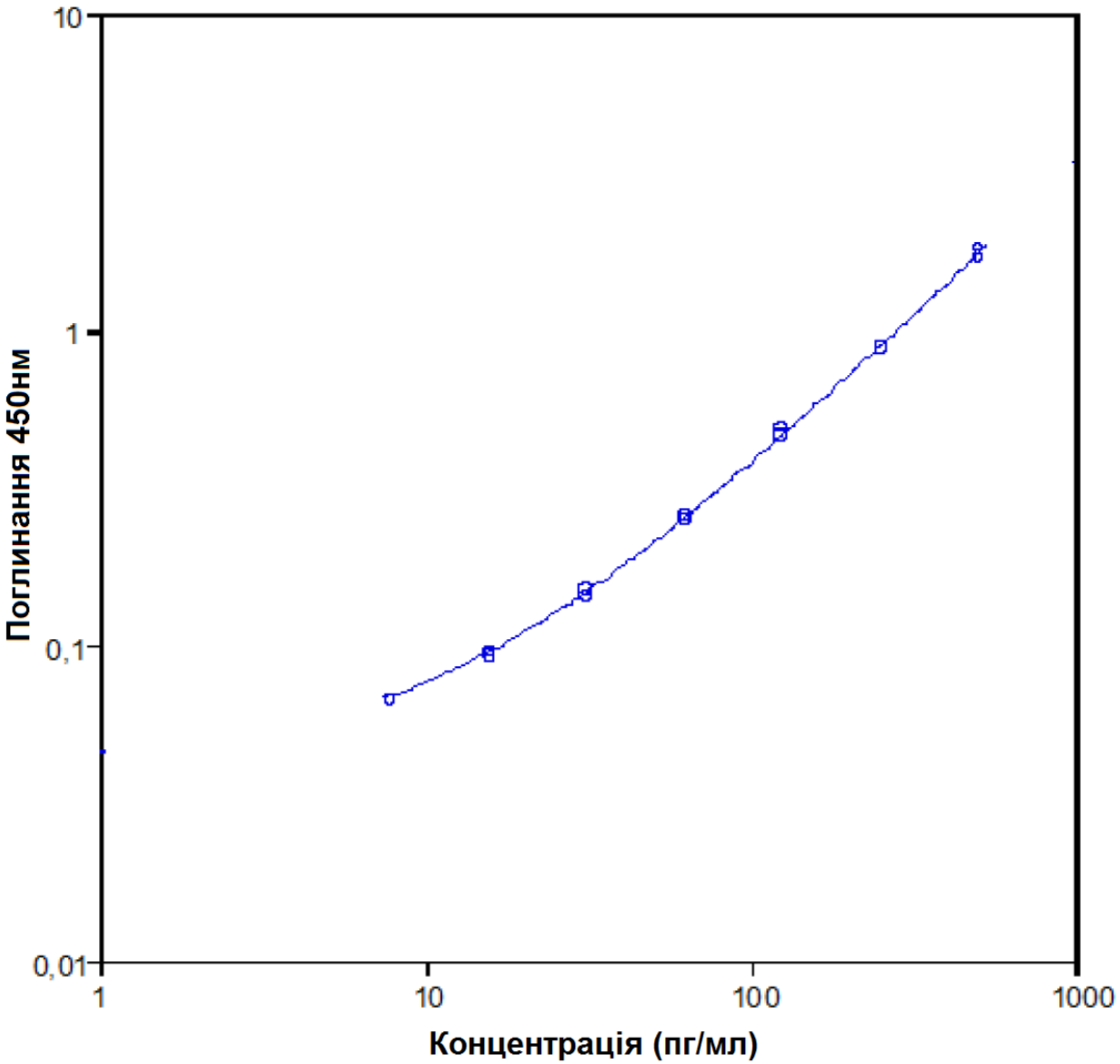
11. Розрахунок результатів

- Розрахувати середні значення абсорбції для кожного набору стандартів і зразків в дублікатах. Дублікати повинні бути в межах 20 відсотків від середнього значення.
- Створіть стандартну криву нанесенням середньої абсорбції для кожної стандартної концентрації на ординаті проти альфа-концентрації IFN людини на абсцисі. Намалюйте криву найкращої відповідності через точки графіка (рекомендована крива 5-параметрів).
- Щоб визначити концентрацію циркулюючого людського IFN альфа для кожного зразка, спочатку знайдіть середнє значення абсорбції на ординаті і подовжують горизонтальну лінію до стандартної кривої. Біля точки перетину, протягують вертикальну лінію до абсциси і зчитують відповідну концентрацію людського IFN альфа.
- Якщо дотримуватися інструкції в цьому протоколі, зразки розбавляли 1: 5 (20 мкл зразок + 80 мкл буфера для аналізу (1х)) і концентрацію зчитують зі стандартної кривої необхідно помножити на коефіцієнт розведення (х 5).
- Розрахунок зразків з концентрацією, що перевищує стандарт 1, може призвести до неправильних низьких рівнів людського IFN альфа. Такі зразки вимагають додаткового зовнішнього розведення відповідно до до очікуваних значень альфа-IFN людини з буфером для аналізу (1х) для точного кількісного визначення

фактичного людського IFN альфа рівня.
- Пропонується, щоб кожен випробувальний центр встановив контрольний зразок відомого людського IFN-альфа концентрації і виконував цей додатковий контроль з кожним аналізом. Якщо отримані значення не є в межах очікуваного діапазону контролю, результати аналізу можуть бути недійсними.
- Репрезентативна стандартна крива показана на малюнку 7. Ця крива не може бути використана для результатів аналізу. Кожна лабораторія повинна підготувати стандартну криву для кожної групи проаналізованих мікролунок стріпів.

Малюнок 7

Репрезентативна стандартна крива для людського IFN – альфа -ІФА. Людський альфа-IFN розбавляли в послідовних 2- кратних кроках в буфері для аналізу (1х). Не використовуйте цю стандартну криву для отримання результатів аналізу. Стандартна крива повинна бути запущена для кожної групи мікролунок аналізованих.



Таблиця 2

Типові дані з використанням людського IFN-альфа-ІФА

Вимірювання довжини хвилі: 450 нм

Референтна довжина хвилі: 620 нм

стандарт	Людський IFN альфа концентрація	ОГ при 450 нм	Значення ОГ при 450 нм	C.V. (%)
1	500,0	1,701 1,790	1,746	3,0
2	250,0	0,881 0,876	0,879	0,4
3	125,0	0,462 0,495	0,479	4,9
4	62,5	0,252 0,258	0,255	1,7
5	31,3	0,144 0,149	0,147	2,4
6	15,6	0,093 0,096	0,095	2,2
7	7,8	0,067 0,067	0,067	4,4
порожня	0	0,031 0,028	0,030	7,2

Значення ОГ стандартної кривої можуть змінюватися в залежності від умов виконання аналізу (наприклад, оператор, технологія піпетування, техніка промивання або температурні ефекти). Крім того, термін зберігання набору може впливати на ферментативну активність і, отже, на інтенсивність кольору. Виміряні значення залишаються дійсними.

12 Обмеження

- Оскільки точні умови можуть змінюватися від аналізу до аналізу, необхідно встановити стандартну криву для кожного прогону.
- Бактеріальне або грибкове забруднення зразків або реагентів або перехресне забруднення між реагентами можуть призвести до помилкових результатів.
- Переважними є одноразові наконечники для піпеток, колби або скляні вироби, посуд для багаторазового використання повинен бути промитий,ретельно промити всі миючі засоби перед використанням.
- Неправильне чи недостатнє промивання на будь-якій стадії процедури призведе до помилкових результатів. Опорожнити лунки повністю перед розподілом свіжого миючого розчину, повністю заливають лунки, заповнюють буфером для промивання, як вказано для кожного з циклів промивання і не дозволяють лункам знаходитись непокритими або сухими протягом тривалого часу.
- Застосування радіоімунотерапії значно збільшило кількість людей з людськими анти-мишачими IgG антитілами (HAMA). HAMA може впливати на аналізи з використанням мишачого моноклонального антитіла, що призводять до помилкових результатів. Зразки сироватки, що містять антитіла до мишачих імуноглобулінів все ще можуть бути проаналізовані в таких аналізах, коли мишачі імуноглобуліни (сироватка, до зразка додають асцитичну рідину, або моноклональні антитіла з неактуальною специфічністю).

13 Характеристики продуктивності

13.1 Чутливість

Межа виявлення людського IFN-альфа визначається як концентрація аналіту, що призводить до а абсорбції значно вище, ніж у середнє розведення (середнє плюс 2 стандартні відхилення) визначали, що він становить 3,2 пг / мл (середнє значення 6 незалежних аналізів).

13.2 Відтворюваність

13.2.1 В аналізі

Відтворюваність в тесті оцінювали в 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повторами 8 зразків сироватки, що містять різні концентрації людського IFN альфа. На кожному планшеті виконували 2 стандартні криві. Дані нижче показують концентрацію середнього людського IFN альфа і коефіцієнт варіації для кожного зразка (див. таблицю 3).

Таблиця 3

Середня концентрація –IFN альфа людини і коефіцієнт варіації для кожного зразка

зразок	експеримент	Середнє людський IFN альфа концентрація	Коефіцієнт варіації
1	1 2 3	2299 2343 2333	2,2 6,6 1,6
2	1 2 3	2192 2265 2470	1,7 2,2 4,6
3	1 2 3	1576 1645 1429	4,6 2,0 1,4
4	1 2 3	324 317 317	4,3 2,2 4,3
5	1 2 3	192 250 283	3,7 3,3 1,5
6	1 2 3	538 541 425	6,2 8,6 1,8
7	1 2 3	135 146 140	9,7 8,3 7,9
8	1 2 3	439 403 440	2,1 3,0 1,1

13.2.2 Між аналізами

Тест на відтворюваність аналізу в одній лабораторії оцінювали в 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повторами 8 зразків сироватки, що містять різні концентрації людського IFN-альфа. На кожному планшеті виконували 2 стандартні криві. Наведені нижче дані показують середню концентрацію людського альфа-IFN і коефіцієнт варіації розрахований на 18 визначень кожного зразку (див. таблицю 4). Розрахований загальний коефіцієнт варіативності між обчисленнями становив 7,2%.

Таблиця 4

Середня концентрація IFN альфа людини і коефіцієнт варіації кожного зразка

зразок	Середня концентрація IFN альфа людини (пг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	2345	2,0
2	2309	6,2
3	1550	7,1
4	319	1,2
5	242	19,1
6	501	13,1
7	141	3,9
8	428	4,9

13.3 Відновлення збагачення

Відновлення збагачення оцінювали за допомогою 4 рівнів людського IFN альфа в сироватку. Відновлення визначали у 3 незалежних експериментах з 6 повторами кожен.

У цих експериментах в якості порожніх використовували незбагачену сироватку.

Відновлення коливалося в межах від 85% до 98% з загальним середнім відновленням 92 %.

13.4 Паралелізм розведення

Зразки сироватки з різними рівнями людського IFN-альфа аналізували при серійних двократних розведеннях з 4 повторами кожен.

Відновлення коливалося в межах від 88% до 123% з загальним відновленням 108% (див. Таблицю 5).

зразок	**розведення**	Очікувана людська IFN альфа Концентрація (пг / мл)	Спостерігаєма людська IFN альфа Концентрація (пг / мл)	**Відновлення очікуваної концентрації (%)**
1	**1:5** **1:10** **1:20** **1:40**	**-** **406** **203** **101**	**812** **459** **225** **125**	**-** **113** **111** **123**
2	**1:5** **1:10** **1:20** **1:40**	**-** **1056** **528** **264**	2113 1280 599 322	**-** **121** **113** **122**
3	**1:5** **1:10** **1:20** **1:40**	**-** **1322** **661** **330**	**2644** **1203** **596** **289**	**-** **91** **80** **88**
4	**1:5** **1:10** **1:20** **1:40**	**-** **1124** **562** **281**	**2248** **1237** **603** **301**	**-** **110** **107** **107**

13.5 Стабільність зразків

Стабільність замерзання-відтавання

Аліквоти зразків сироватки (незбагачені або збагачені) зберігали при -20 ° C і розморожували 5 разів, і рівні людського альфа-IFN визначали. Не було значних втрат імунореактивності людського IFN-альфа, виявленого шляхом заморожування і відтавання.

13.5.2 Стабільність зберігання

Аліквоти зразків сироватки (незбагачені або збагачені) зберігали при -20 ° C, 2-8 ° C, кімнатній температурі (КТ) і при 37 ° C, і рівень IFN-альфа-1 людини визначали через 24 год. Не було виявлено значних втрат людського IFN альфа - імунореактивності при зберіганні при зазначених вище умовах.

13.6 Специфічність

Аналіз виявляє як природний, так і рекомбінантний людський IFN альфа.

Інтерференцію циркулюючих факторів імунної системи оцінювали шляхом збагачення цих білків у фізіологічно значущих концентраціях в людську IFN альфа-позитивну сироватку.

Перехресна реактивність була показана з природним людським лейкоцитом IFN альфа , IFN альфа 2a, IFN альфа 2b і IFN альфа 2c.

Не було виявлено перехресної реактивності з людським IFN альфа 1, бета - IFN (фібробласт IFN),IFN гамма, IFN омега, TNF альфа, TNF бета, IL-2, IL-6, IL-8 і IL-10.

14 Інформація про замовлення

Для замовлень звертайтеся: Дивіться останню сторінку

Для отримання технічної інформації звертайтеся: e-mail: IBL@IBL-International.com

www.IBL-International.com

15 Загальна інформація підготовка реагентів

15.1 Буфер для промивання (1x)

Додають концентрат промивного буфера 20x (50 мл) до 950 мл дистильованої води.

Кількість стріпів	Промивний буфер концентрат (мл)	Дистильована вода (мл)
1-6	25	475
1-12	50	950

15.2 Буфер аналізу (1x)
Додають концентрат буферного аналізу 20x (5 мл) до 95 мл дистильованої води.

Кількість стріпів	Буфер концентрат аналізу (мл)	Дистильована вода (мл)
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

15.3 HRP-кон'югат
Зробити 1:100 розведення HRP-кон'югату в буфері аналізу (1x)

Кількість стріпів	HRP-Кон'югат (мл)	Буфер аналізу (1x) мл
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

15.4 Людський стандарт IFN альфа
Відтворити ліофілізований людський стандарт IFN альфа з дистильованою водою. (Об'єм відтворювання - на етикетці стандартного флакона.)

16 Узагальнення протокол аналізу
1. Визначте необхідну кількість мікролунок стріпів.
2. Двічі промити мікролунки стріпів буфером для промивання.
3. Стандартне розведення на мікропланшеті: додати 100 мкл буфера для аналізу (1x), у двох примірниках, до всіх лунок стандартів. Прокапати 100 мкл відтворених стандартів в перші лунки і створити стандартне розведення шляхом перенесення 100 мкл з лунки в лунку. Видаліть 100 мкл з останніх лунок.
Альтернативно зовнішнє стандартне розведення в пробірках (див. 9.4.1): Прокапати 100 мкл цих стандартних розведень в мікролунки стріпів.
4. Додають 100 мкл буфера для аналізу (1x), у двох примірниках, до лунки порожньої (бланк).
5. Додайте 80 мкл буфера для аналізу (1x) до лунок зразка.
6. Додати 20 мкл зразка в дублікатах, до призначених лунок зразка.
7. Готують HRP-кон'югат.
8. Додають 50 мкл HRP-кон'югату до всіх лунок.
9. Накрийте мікролунки стріпів та інкубуйте 2 години при кімнатній температурі (18 ° до 25 ° C).
10. Опорожніть та промийте мікролунки 3 рази буфером для миття.
11. Додайте 100 мкл субстратного розчину ТМБ у всі лунки.
12. Інкубуйте мікролунки стріпів протягом приблизно 10 хвилин при кімнатній температурі (18 ° до 25 ° C).
13. Додайте 100 мкл стоп-розчину у всі лунки.
14.Налаштуйте на «нуль» рідер мікропланшетів і вимірюйте інтенсивність кольору при 450 нм.
Примітка: Якщо дотримувалися інструкції в цьому протоколі, зразки були розведені 1: 5 (20 мкл зразка + 80 мкл буфера для аналізу (1x)) і концентрацію, зчитану зі стандартної кривої необхідно помножити на коефіцієнт розведення (x 5)

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

REF	№ Кат.:
LOT	№ Партії:
	Використати до:
	Кількість тестів:
CONC	Концентрат
LYO	Ліофілізований
IVD	Медичний пристрій для діагностики in vitro
	Оціночний набір
	Прочитайте інструкцію перед використанням
	Зберігати поодаль від джерел тепла і прямого сонячного світла.
	Зберігати при температурі:
	Виробник:
	Увага!
Умовні позначення компонентів див. у розділі «Матеріали, що входять до набору».	

СКАРГИ: Первинно скарги можна пред’явити в письмовому вигляді або усно. Згодом необхідно подати їх, включаючи хід дослідження та отримані результати, в письмовому вигляді, з аналітичних міркувань.

ГАРАНТІЯ: Гарантується відсутність у продукті дефектних матеріалів у межах відповідного терміну придатності, а також дотримання специфікацій, поданих разом із продуктом. Продукт слід використовувати за призначенням, відповідно до всіх інструкцій, наведених в інструкції з використання та в межах відповідного терміну придатності продукту. Будь-яка модифікація процедури аналізу, або обміну, або змішування компонентів різних партій може негативно вплинути на результати. Ці випадки анулюють будь-які вимоги про заміну.

ОБМЕЖЕННЯ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ: ЗА БУДЬ-ЯКИХ ОБСТАВИН РІВЕНЬ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ВИРОБНИКА ОБМЕЖУЄТЬСЯ ЗАКУПІВЕЛЬНОЮ ВАРТІСТЮ ВКАЗАНОГО (-ИХ)НАБОРУ(ІВ) . ЗА ЖОДНИХ УМОВ ВИРОБНИК НЕ МАЄ НЕСТИ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ ЗА ВИПАДКОВІ ЧИ ПОБІЧНІ ЗБИТКИ, У ТОМУ ЧИСЛІ ВТРАТУ ПРИБУТКУ, ВТРАТУ ПРОДАЖ, ТРАВМИ ЛЮДЕЙ ЧИ ПОШКОДЖЕННЯ ВЛАСНОСТІ АБО ІНШІ ВИПАДКОВІ ЧИ НЕПРЯМІ ЗБИТКИ.

IBL International GmbH
Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург, Німеччина

Тел .: + 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11
E-MAIL: IBL@IBL-International.com
WEB: http://www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1,тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua