IBL International GmbH
Flughafenstraße 52 a
D-22335 Гамбург

Тел. +49 (0) 40 53 28 91-0
Факс +49 (0) 40 53 28 91-11

IBL@tecan.com
www.tecan.com/ibl

Інструкція з використання

MCP-1 ІФА

**Імуноферментний аналіз для
кількісне виявлення MCP-1 людини в супернатанті клітинної культури, сироватці, плазмі (EDTA, гепарин) і амніотичній рідині.**



30150435



96



**Тільки для дослідницького використання.
Не для використання в діагностичних процедурах.**

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



IBL International GmbH
Flughafenstrasse 52a
D-22335 Гамбург, Німеччина

Always there for you

1. Передбачуване використання

MCP-1 людини ІФА — це твердофазний імуноферментний аналіз для кількісного виявлення MCP-1 людини. MCP-1 людини ІФА призначений лише для дослідницького використання. Не для діагностичних чи терапевтичних процедур.

2. Загальна інформація

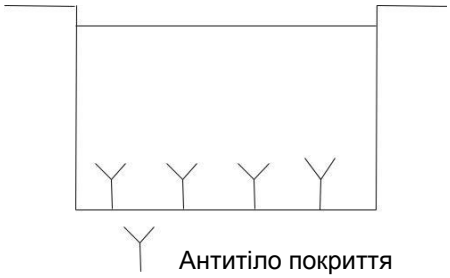
Хемокіни (цитокіни-хемоаттрактанти) представляють суперсімейство малих секретованих білків, які функціонують як міжклітинні месенджери для контролю міграції та активації лейкоцитів, які беруть участь у запальних реакціях та імунітеті.
Білок хемоаттрактанта моноцитів CC-хемокіну 1 (MCP-1), також відомий як фактор хемотаксису та активації моноцитів (MCAF), був охарактеризований як моноцит-специфічний хемоаттрактант, який пізніше було показано, що приваблює також Т-лімфоцити та NK-клітини.
Зрілий білок MCP-1 людини складається з 76 амінокислот, отриманих шляхом розщеплення гідрофобного сигнального пептиду з білка-попередника 99 амінокислот. MCP-1 в основному експресується макрофагами у відповідь на широкий спектр цитокінів, таких як ІЛ-6, ФНП альфа та ІЛ-1 бета, але може, після стимуляції, також вироблятися різними клітинами та тканинами, такими як фібробласти. ендотеліальні клітини або певні пухлинні клітини.

3. Принципи тесту

Антитіло проти людського MCP-1 адсорбується на покритті
мікролунки.

Фігура 1

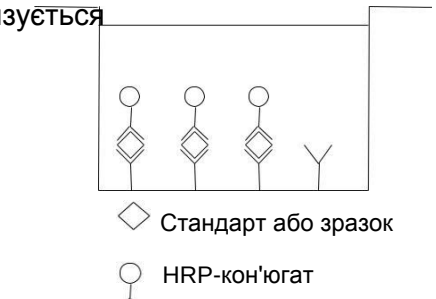
Мікролунка з покриттям



малюнок 2

MCP-1 людини, присутній у зразку або стандарті, зв’язується з антитілами, адсорбованими на мікролунках і HRP-кон'юговане антитіло людини анти MCP-1 додається і зв'язується до MCP-1 людини, захопленого першим антитілом.

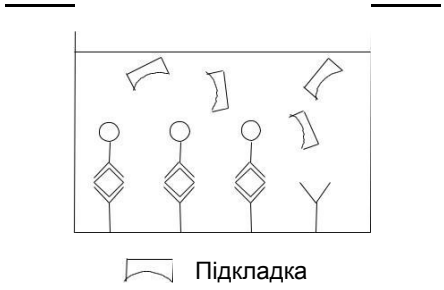
Перша інкубація



малюнок 3

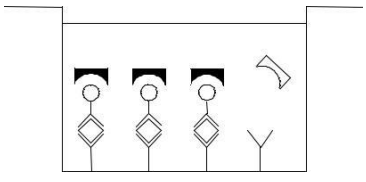
Після інкубації незв'язаний HRP-кон'югований анти-MCP-1 людини видаляють під час етапу промивання, і розчин субстрату, який реагує на HRP, додається в лунки.

Друга інкубація



малюнок 4

Кольоровий продукт утворюється пропорційно до кількості людського MCP-1, присутнього в зразку або стандарті. Реакцію припиняють додаванням кислоти та вимірюють абсорбцію при 450 нм. Стандартну криву готують із 7 стандартних розведень MCP-1 людини та визначають концентрацію MCP-1 людини.



4. Реагенти в наборі

MTP	1 алюмінієвий пакет із планшетом для мікролунок (12 стрипів по 8 лунок у кожному), покритих моноклональне антитіло до MCP-1 людини
ENZCONJ CONC	1 флакон (70 мкл) моноклональних антитіл людини до MCP-1, кон'югату HRP
CAL LYO	2 флакони стандартного ліофілізованого людського MCP-1, 2 нг/мл після розчинення
CONTROL H LYO	1 флакон Контроль високий, ліофілізований
CONTROL L LYO	1 флакон Контроль низький, ліофілізований
ASSAYBUF CONC	1 флакон (5 мл) концентрату буфера для аналізу 20x (PBS з 1% Tween 20, 10% BSA)
WASHBUF CONC	1 пляшка (50 мл) концентрату промивного буфера 20x (PBS з 1% Tween 20)
SUBS	1 флакон (15 мл) розчину субстрату (тетраметилбензидин)
STOP	1 флакон (15 мл) стоп-розчину (1M фосфорної кислоти)
	2 Клейкі плівки

5. Інструкції щодо зберігання – ІФА набір

Зберігайте реагенти набору при температурі від 2°C до 8°C, крім контролів. Зберігайте ліофілізовані контролі при -20°C. Одразу після використання реагенти, що залишилися, слід повернути в холодне зберігання (від 2°C до 8°C) або до -20°C відповідно. Термін придатності набору та реагентів вказано на етикетках.

Термін придатності компонентів набору може бути гарантований, лише якщо компоненти зберігаються належним чином і якщо, у разі повторного використання одного компонента, цей реагент не забруднений під час першого використання.

6. Інструкції щодо збору та зберігання зразків

Супернатант клітинної культури, сироватку, плазму (EDTA, гепарин) і амніотичну рідину перевіряли за допомогою цього аналізу. Інші біологічні зразки можуть бути придатними для використання в аналізі. Видаліть сироватку або плазму із згустку або клітин якомога швидше після згортання та відділення.

Зверніть увагу на можливий «Хук ефект » через високі концентрації зразка (див. розділ 11).

Зразки, що містять видимий осад, повинні бути освітлені перед використанням в аналізі. Не використовуйте сильно гемолізовані або ліпемічні зразки.

Зразки слід розділити на аліквоти та зберігати в замороженому стані при -20°C, щоб уникнути втрати біологічно активного MCP-1 людини. Якщо зразки повинні бути досліджені протягом 24 годин, їх можна зберігати при температурі від 2°C до 8°C (щодо стабільності зразка див. 13.5.)

Уникайте повторних циклів заморожування-розморожування. Перед аналізом заморожений зразок слід повільно довести до кімнатної температури та обережно перемішати.

7. Необхідні матеріали, але не надаються

- Градуйовані піпетки на 5 мл і 10 мл
- Одноканальні регульовані мікропіпетки від 5 мкл до 1000 мкл з одноразовими наконечниками
- Регульована багатоканальна мікропіпетка від 50 мкл до 300 мкл з одноразовими наконечниками
- Багатоканальний резервуар мікропіпетки

- Стакани, колби, циліндри, необхідні для приготування реактивів
- Пристрій для подачі промивного розчину (багатоканальний промивний флакон або автоматична промивна система)
- Рідер мікролункових стріпів, здатний зчитувати при 450 нм (620 нм як додаткова еталонна довжина хвилі)
- Скляна дистильована або дейонізована вода
- Статистичний калькулятор із програмою для виконання регресійного аналізу

8. Застереження щодо використання

- Усі реагенти слід розглядати як потенційно небезпечні. Тому ми рекомендуємо, щоб цей продукт використовувався лише тими особами, які пройшли навчання щодо лабораторних методів, і щоб він використовувався відповідно до принципів належної лабораторної практики. Одягайте відповідний захисний одяг, такий як лабораторний комбінезон, захисні окуляри та рукавички. Слід бути обережним, щоб уникнути контакту зі шкірою або очима. У разі потрапляння на шкіру або в очі негайно промити водою. Перегляньте паспорт(и) безпеки матеріалу та/або заяву(и) безпеки для отримання конкретних порад.
- Реагенти призначені лише для дослідницького використання і не призначені для використання в діагностичних або терапевтичних процедурах.
- Не змішуйте та не замінюйте реагенти реагентами з інших партій або інших джерел.
- Не використовуйте реагенти набору після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
- Не піддавайте реагенти набору впливу сильного світла під час зберігання або інкубації.
- Не піпетуйте ротом.
- Не їжте та не куріть у місцях, де працюють із реагентами або зразками.
- Уникайте контакту шкіри або слизових оболонок із реагентами або зразками набору.
- Під час роботи з реагентами або зразками з набору слід надягати гумові або одноразові латексні рукавички.
- Уникайте контакту розчину субстрату з окислювачами та металом.
- Уникайте бризок або утворення аерозолів.
- Щоб уникнути мікробного або перехресного забруднення реагентів або зразків, яке може зробити тест недійсним, використовуйте одноразові наконечники та/або піпетки.
- Використовуйте чисті спеціальні лотки для реагентів для дозування кон’югату та реагенту субстрату.
- Вплив кислоти інактивує кон'югат.
- Для приготування реагентів необхідно використовувати дистильовану або дейонізовану воду.
- Перед використанням розчин субстрату повинен бути кімнатної температури.
- Знезаражувати та утилізувати зразки та всі потенційно заражені матеріали так, ніби вони можуть містити інфекційні агенти. Переважним методом дезактивації є автоклавування протягом мінімум 1 години при 121,5°C.
- Рідкі відходи, що не містять кислоти, і нейтралізовані відходи можна змішувати з гіпохлоритом натрію в таких обсягах, щоб кінцева суміш містила 1,0% гіпохлориту натрію. Зачекайте 30 хвилин для ефективного знезараження. Рідкі відходи, що містять кислоту, необхідно нейтралізувати перед додаванням гіпохлориту натрію.

9. Приготування реагентів

1. Буферні концентрати слід довести до кімнатної температури та розбавити перед початком процедури тестування.
2. Якщо в буферних концентратах утворилися кристали, обережно нагрійте їх, поки вони повністю не розчиняться.

9.1. Промивний буфер (1x)

1. Перелийте весь вміст (50 мл) концентрату промивного буфера (20 разів) у чистий градуйований циліндр на 1000 мл. Доведіть до кінцевого об’єму 1000 мл скляною дистильованою або дейонізованою водою.
2. Акуратно перемішайте, щоб уникнути утворення піни.
3. Перемістіть у чисту пляшку для промивання та зберігайте при температурі від 2°C до 25°C. Зверніть увагу, що промивний буфер (1x) стабільний протягом 30 днів.
4. Промивний буфер (1x) також можна приготувати за потреби відповідно до наступної таблиці:

Кількість стріпів	Концентрат промивного буфера (20x) (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

9.2. Буфер для аналізу (1x)

1. Перелийте весь вміст (5 мл) концентрату буфера для аналізу (20 разів) у чистий градуйований циліндр на 100 мл. Доведіть дистильованою водою до кінцевого об’єму 100 мл. Акуратно перемішайте, щоб уникнути утворення піни.
2. Зберігати при температурі від 2°C до 8°C. Зверніть увагу, що буфер для аналізу (1x) стабільний протягом 30 днів.
3. Буфер для аналізу (1x) також можна приготувати за потреби відповідно до наступної таблиці:

Кількість стріпів	Буферний концентрат (20x) (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95,0

9.3. HRP-кон'югат

Примітка: HRP-кон’югат слід використати протягом 30 хвилин після розведення.

Зробіть 1:100 розведення концентрованого розчину HRP-кон’югату з буфером для аналізу (1x) у чистій пластиковій пробірці за потреби відповідно до наступної таблиці:

Кількість стріпів	HRP-кон'югат (мл)	Буфер для аналізу (1x) (мл)
1 - 6	0,03	2,97
1 - 12	0,06	5.94

9.4. Стандарт MCP-1 людини

1. Відновіть стандарт MCP-1 людини, додавши дистильовану воду.
2. Обсяг розчинення вказано на етикетці стандартного флакона. Покрутіть або обережно перемішайте, щоб забезпечити повну та однорідну солюбілізацію (концентрація відновленого стандарту = 2 нг/мл).
3. Дайте стандарту відновитися протягом 10-30 хвилин. Добре перемішайте перед приготуванням розчинів.

   Стандарт необхідно використати відразу після відновлення і не підлягає зберіганню.

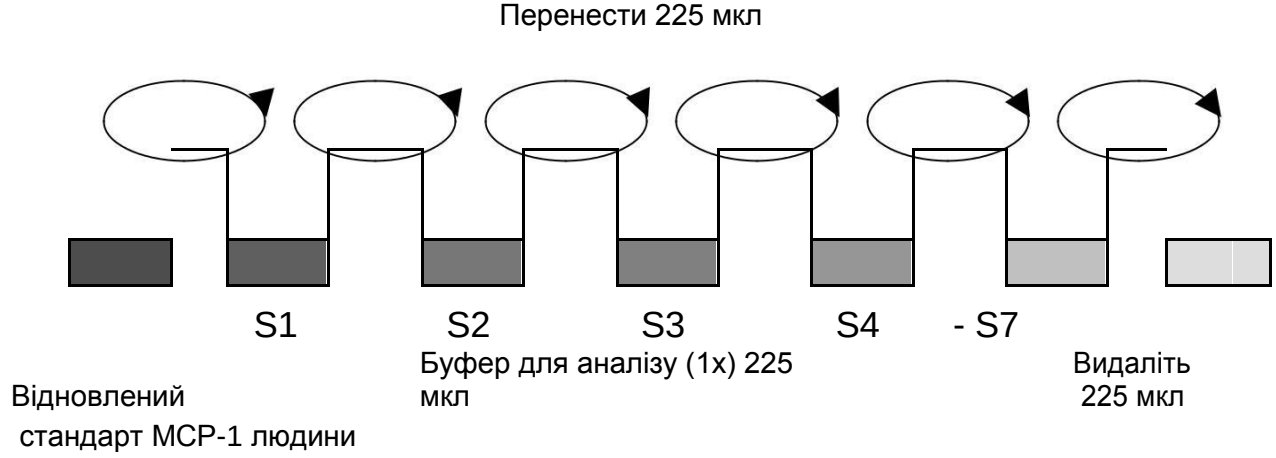
9.4.1. Зовнішнє стандартне розведення

1. Позначте 7 пробірок, по одній для кожної стандартної точки. S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7
2. Потім приготуйте серійні розведення 1:2 для стандартної кривої наступним чином: Внесіть 225 мкл буфера для аналізу (1x) у кожну пробірку.
3. Внесіть піпеткою 225 мкл відновленого стандарту (концентрація стандарту = 2 нг/мл) у першу пробірку, позначену S1, і перемішайте (концентрація стандарту 1 = 1 нг/мл).

4. Внесіть 225 мкл цього розчину в другу пробірку, позначену S2, і ретельно перемішайте перед наступним перенесенням.
5. Повторіть серійні розведення ще 5 разів, таким чином створивши точки стандартної кривої

(див. Малюнок 5). Буфер для аналізу (1x) використовується як Бланк.

малюнок 5



9.5. Контролі

Розчиніть ліофілізовані контролі, додавши дистильовану воду (10-30 хвилин). Обсяг розчинення вказано на етикетці контрольного флакона. Покрутіть або обережно перемішайте, щоб забезпечити повну та однорідну солюбілізацію. Подальше обробляйте контролі як ваші зразки в аналізі. Діапазон контролю див. у сертифікаті аналізу. Зберігайте відновлені контрольні аліквоти при -20°C.

Уникайте повторних циклів заморожування та розморожування.

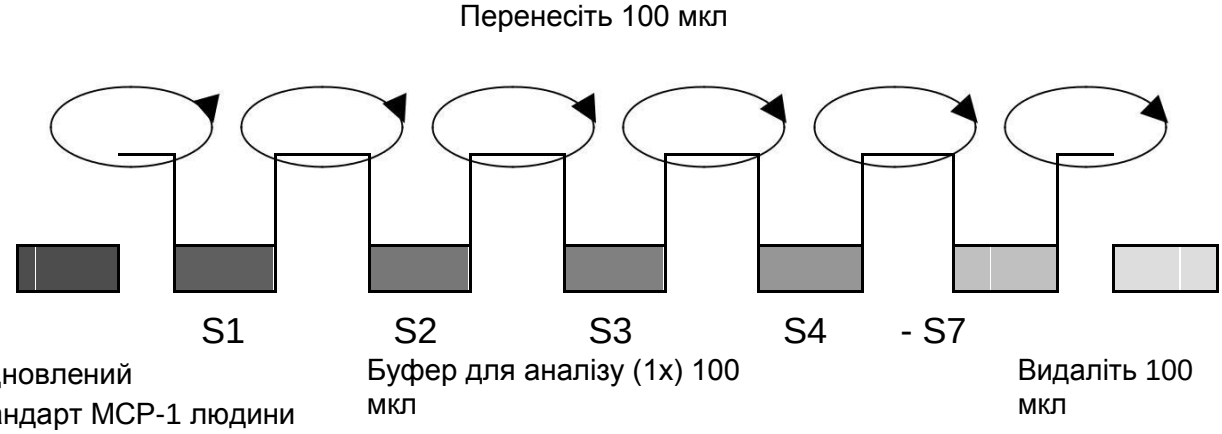
10. Протокол тестування

a. Визначте кількість мікролуночних стрипів, необхідних для тестування бажаної кількості зразків, плюс відповідну кількість лунок, необхідних для проведення бланків і стандартів. Кожен зразок, стандарт, бланк і необов'язковий контрольний зразок слід аналізувати в двох примірниках. Вийміть додаткові мікролункові стріпи з тримача та зберігайте в герметично закритому пакеті з фольги з осушувачем при температурі від 2°C до 8°C.

b. Двічі промийте стріпи мікролунок приблизно 400 мкл промивного буфера на лунку, ретельно відсмоктуючи вміст мікролунок між промиваннями. Дайте промивному буферу постояти в лунках приблизно 10 хвилин – за 15 секунд до аспірації. Будьте обережні, щоб не подряпати поверхню мікролунок. Після останнього етапу промивання спорожніть лунки та постукайте стріпами мікролунок по абсорбентній подушечці або паперовому рушнику, щоб видалити надлишок промивного буфера. Використовуйте стріпи для мікролунок одразу після промивання. Крім того, стріпи мікролунок можна покласти догори дном на вологий абсорбуючий папір не довше ніж на 15 хвилин. Не допускати пересихання лунки.

c. Стандартне розведення на мікропланшеті (Альтернативно, стандартний розчин можна приготувати в пробірках - див9.4.1.):Додайте 100 мкл буфера для аналізу (1x) у двох примірниках до всіх лунок стандартів. Внесіть 100 мкл готового стандарту (див. Приготування стандарту 9.4,концентрація = 2000,0 пг/мл) у двох примірниках в лунки A1 і A2 (див.Таблиця 1). Змішайте вміст лунок A1 і A2 шляхом повторної аспірації та видалення (концентрація стандарту 1, S1 = 1000,0 пг/мл) і перенесіть 100 мкл в лунки B1 і B2 відповідно (див.малюнок 6). Будьте обережні, щоб не подряпати внутрішню поверхню мікролунок. Продовжуйте цю процедуру 5 разів, створюючи два ряди стандартних розведень MCP-1 людини в діапазоні від 1000,0 до 15,6 пг/мл. Видаліть 100 мкл вмісту останніх використаних мікролунок (G1, G2).

Малюнок 6



У разі зовнішнього стандартного розведення (див9.4.1),внесіть 100 мкл цих стандартних розведень (S1 - S7) у лунки стандартів відповідно до Таблиці 1.

Таблиця 1. Приклад розташування бланків, стандартів і зразків у стріпах мікролунок.

	1	2	3	4
A	Стандарт 1 1000,0 пг/мл	Стандарт 1 1000,0 пг/мл	Зразок 1	Зразок 1
B	Стандарт 2 500,0 пг/мл	Стандарт 2 500,0 пг/мл	Зразок 2	Зразок 2
C	Стандарт 3 250,0 пг/мл	Стандарт 3 250,0 пг/мл	Зразок 3	Зразок 3
D	Стандарт 4 125,0 пг/мл	Стандарт 4 125,0 пг/мл	Зразок 4	Зразок 4
E	Стандарт 5 62,5 пг/мл	Стандарт 5 62,5 пг/мл	Зразок 5	Зразок 5
F	Стандарт 6 31,3 пг/мл	Стандарт 6 31,3 пг/мл	Зразок 6	Зразок 6
G	Стандарт 7 15,6 пг/мл	Стандарт 7 15,6 пг/мл	Зразок 7	Зразок 7
H	Бланк	Бланк	Зразок 8	Зразок 8

d. Додайте 100 мкл буфера для аналізу (1x) у двох примірниках до лунок Бланк.
e. Додайте 80 мкл буфера для аналізу (1x) до лунок зразка.
f. Додайте 20 мкл кожного зразка в двох примірниках до лунок для зразків.
g. Приготуйте кон'югат HRP (див. Приготування кон'югату HRP9.3).
h. Додайте 50 мкл HRP-кон'югату в усі лунки.
i. Накрийте клейкою плівкою та інкубуйте при кімнатній температурі (18–25°C) протягом 2 годин на шейкері для мікропланшетів.
j. Видалити клейку плівку та спорожнити лунки. Промийте стрипи мікролунок 3 рази відповідно до пункту b.протоколу випробування. Негайно перейдіть до наступного кроку.
k. Внесіть 100 мкл розчину субстрату ТМБ в усі лунки.
l. Інкубуйте мікролункові стріпи при кімнатній температурі (18–25 °C) приблизно 10 хвилин. Уникайте прямого впливу інтенсивного світла.

Слід відстежувати розвиток кольору на планшеті та зупиняти реакцію субстрату (див. наступний пункт цього протоколу) до того, як позитивні лунки перестануть належним чином реєструватися. Визначення ідеального періоду часу для розвитку забарвлення має проводитися індивідуально для кожного аналізу. Рекомендується додавати стоп-розчин, коли найвищий стандарт набув темно-синього кольору. Альтернативно розвиток кольору можна відстежувати за допомогою пристрою для зчитування ІФА при 620 нм. Реакцію субстрату слід зупинити, як тільки стандарт 1 досягне ОГ 0,9–0,95.

m. Зупиніть реакцію ферменту, швидко додавши піпеткою 100 мкл стоп-розчину в кожну лунку. Важливо, щоб стоп-розчин швидко та рівномірно розподілявся по мікролунках, щоб повністю інактивувати фермент. Результати слід зчитувати відразу після додавання стоп-розчину або протягом однієї години, якщо мікролункові стріпи зберігаються при температурі від 2 до 8 °C у темряві.

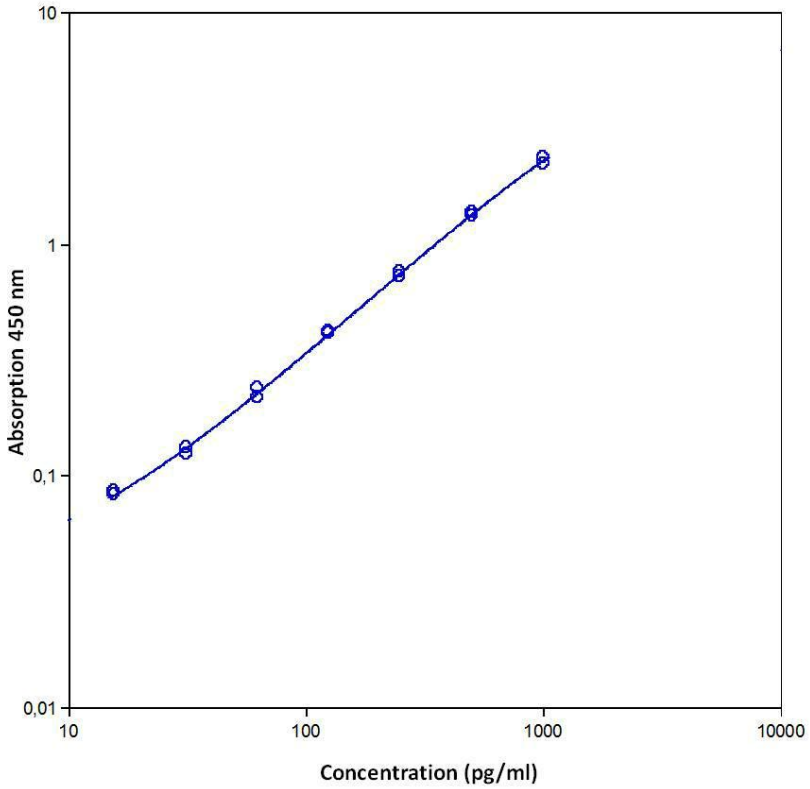
n. Зчитайте поглинання кожної мікролунки на спектрофотометрі, використовуючи 450 нм як основну довжину хвилі (необов'язково 620 нм як еталонну довжину хвилі; прийнятно від 610 нм до 650 нм). Очистіть планшет-рідер згідно з інструкціями виробника, використовуючи лунки Бланк. Визначте абсорбцію як зразків, так і стандартів.

Примітка: У разі інкубації без струшування отримані значення ОГ можуть бути нижчими, ніж зазначено нижче. Тим не менш, результати все ще дійсні.

11. Підрахунок результатів

- Обчисліть середні значення абсорбції для кожного набору дублікатів стандартів і зразків. Дублікати повинні бути в межах 20 % від середнього значення.
- Побудуйте стандартну криву, відклавши середнє значення абсорбції для кожної стандартної концентрації на ординаті проти концентрації MCP-1 людини на осі абсцис. Намалюйте криву найкращого підбору через точки графіка (рекомендовано підгонку кривої з 5 параметрами).
- Щоб визначити концентрацію циркулюючого MCP-1 людини для кожного зразка, спочатку знайдіть середнє значення абсорбції на осі ординат і продовжіть горизонтальну лінію до стандартної кривої. У точці перетину продовжіть вертикальну лінію до осі абсцис і прочитайте відповідну концентрацію MCP-1 людини.
- Якщо дотримувалися інструкцій у цьому протоколі, зразки були розведені у співвідношенні 1:5 (20 мкл зразка + 80 мкл буфера для аналізу (1x)), а концентрація, зчитана зі стандартної кривої, повинна бути помножена на коефіцієнт розведення (x 5).
- Розрахунок зразків із концентрацією, що перевищує стандарт 1, призведе до неправильних низьких рівнів MCP-1 для людини (ефект Хука). Такі зразки вимагають подальшого зовнішнього попереднього розведення відповідно до очікуваних значень MCP-1 людини за допомогою буфера для аналізу (1x), щоб точно визначити фактичний рівень MCP-1 людини.
- Рекомендується, щоб кожна лабораторія створювала контрольний зразок відомої концентрації MCP-1 людини та запускала цей додатковий контроль з кожним аналізом. Якщо отримані значення виходять за межі очікуваного діапазону контролю, результати аналізу можуть бути недійсними.
- Типова стандартна крива показана на малюнку 7. Цю криву не можна використовувати для отримання результатів тестування. Кожна лабораторія повинна підготувати стандартну криву для кожної досліджуваної групи стріпів мікролунок.

Малюнок 7
Репрезентативна стандартна крива для MCP-1 людини ІФА. Людський MCP-1 розбавляли серійними 2-кратними етапами в буфері для аналізу (1x). Не використовуйте цю стандартну криву для отримання результатів тесту. Для кожної досліджуваної групи стрипів мікролунок необхідно провести стандартну криву.



Таблиця 2
Типові дані з використанням людського MCP-1 ІФА
Довжина хвилі вимірювання: 450 нм
Референтна довжина хвилі: 620 нм

Стандарт	MCP-1 людини Концентрація (пг/мл)	ОГ при 450 нм	Середній ОГ при 450 нм	CV(%)
1	1000,0	2.226 2,359	2,292	2.9
2	500,0	1,322 1,360	1,341	1.4
3	250,0	0,722 0,758	0,740	2.4
4	125,0	0,411 0,417	0,414	0,8
5	62.5	0,216 0,239	0,227	5.0
6	31.3	0,123 0,131	0,127	2.9
7	15.6	0,083 0,085	0,084	0,8
Бланк	0	0,022 0,022	0,022	0,2

Значення ОГ стандартної кривої можуть змінюватися залежно від умов виконання аналізу (наприклад, оператор, техніка піпетування, техніка миття або вплив температури). Крім того, термін придатності набору може впливати на ферментативну активність і, таким чином, на інтенсивність кольору. Виміряні значення все ще дійсні.

12. Обмеження

- Оскільки точні умови можуть відрізнятися від аналізу до аналізу, стандартна крива повинна бути встановлена для кожного циклу.
- Бактеріальне або грибкове забруднення зразків або реагентів або перехресне забруднення між реагентами може призвести до помилкових результатів.
- Перевага надається одноразовим наконечникам для піпеток, колбам або скляному посуду, багаторазовий скляний посуд необхідно вимити та ретельно промити від усіх миючих засобів перед використанням.
- Неправильне або недостатнє миття на будь-якому етапі процедури призведе до помилкових результатів. Повністю спустошіть лунки, перш ніж вводити свіжий розчин для промивання, заповніть промивним буфером, як зазначено для кожного циклу промивання, і не дозволяйте лункам залишатися непокритими або висихати протягом тривалого часу.
- Застосування радіоімунотерапії значно збільшило кількість людей з людськими антитілами проти мишачого IgG (HAMA). HAMA може заважати аналізам, у яких використовуються мишачі моноклональні антитіла, що призводить до хибних результатів. Зразки сироватки, що містять антитіла до мишачих імуноглобулінів, все ще можна аналізувати в таких аналізах, коли до зразка додають мишачі імуноглобуліни (сироватка, асцитична рідина або моноклональні антитіла нерелевантної специфічності).

13. Експлуатаційні характеристики

13.1. Чутливість

Межа виявлення MCP-1 людини, визначена як концентрація аналіту, що призводить до абсорбції, значно більшої, ніж у середовища розведення (середнє значення плюс 2 стандартних відхилення), було визначено як 2,3 пг/мл (середнє значення з 6 незалежних аналізів).

13.2. Відтворюваність

13.2.1. В аналізі

Відтворюваність в межах аналізу оцінювали в 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повторами 8 зразків сироватки, що містили різні концентрації MCP-1 людини. На кожному планшеті проводили 2 стандартні криві. Дані нижче показують середню концентрацію MCP-1 людини та коефіцієнт варіації для кожного зразка (див
Таблиця 3). Розрахований загальний коефіцієнт варіації в аналізі становив 4,7%.

Таблиця 3
Середня концентрація MCP-1 людини та коефіцієнт варіації для кожного зразка

Зразок	Експеримент	Середнє MCP-1 людини Концентрація (пг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	1	1074	3.2
	2	965	4.3
	3	923	3.6
2	1	256	9.7
	2	233	9.1
	3	205	7.3
3	1	393	1.7
	2	354	8.3
	3	357	2.8
4	1	1194	3.2
	2	1177	7.6
	3	1037	2.6
5	1	118	4.3
	2	129	2.8
	3	137	1.6
6	1	562	4.6
	2	630	8.7
	3	494	0,9
7	1	949	6.5
	2	1112	9.1
	3	910	1.4
8	1	131	2.8
	2	137	4.7
	3	120	2.6

13.2.2. Між аналізами

Відтворюваність аналізу в одній лабораторії оцінювали в 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повторами 8 зразків сироватки, що містили різні концентрації MCP-1 людини. На кожному планшеті проводили 2 стандартні криві. Наведені нижче дані показують середню концентрацію MCP-1 людини та коефіцієнт варіації, розрахований на основі 18 визначень кожного зразка (див.Таблиця 4). Розрахований загальний міжтестовий коефіцієнт варіації становив 8,7%.

Таблиця 4
Середня концентрація MCP-1 людини та коефіцієнт варіації кожного зразка

Зразок	Середнє MCP-1 людини Концентрація (пг/мл)	Коефіцієнт Варіація (%)
1	987	7.9
2	231	11.1
3	368	5.9
4	1136	7.6
5	128	7.5
6	562	12.1
7	991	10.8
8	129	6.8

13.3. Відновлення збагаченням

Відновлення збагаченням оцінювали шляхом введення 4 рівнів людського MCP-1 у сироватку.
Відновлення визначали в 3 незалежних експериментах з 6 повторами в кожному.
Кількість ендогенного людського MCP-1 у сироватці без добавки була віднята від значень збагачення.
Відновлення коливалося від 84% до 98% із загальним середнім відновленням 92%.

13.4. Паралелізм розведення

Чотири зразки сироватки з різними рівнями MCP-1 людини аналізували в серійних 2-кратних розведеннях з 4 повторами кожен.
Відновлення коливалося від 93% до 117% із загальним відновленням 105% (див. таблицю 5).

Таблиця 5

Зразок	Розведення	Очікувана MCP-1 людини Концентрація (пг/мл)	Спостережена MCP-1 людини Концентрація (пг/мл)	Очікуване відновлення MCP-1 людини Концентрація (%)
1	1:5	--	3320	--
	1:10	1660	1731	104
	1:20	830	901	109
	1:40	415	441	106
2	1:5	--	2983	--
	1:10	1491	1503	101
	1:20	746	763	102
	1:40	73	364	98
3	1:5	--	3287	--
	1:10	1643	1811	110
	1:20	822	949	116
	1:40	411	481	117
4	1:5	--	3521	--
	1:10	1760	1787	102
	1:20	880	889	101
	1:40	440	409	93

13.5. Стабільність зразка

13.5.1. Стабільність при заморожуванні та відтаванні

Аліквоти зразків сироватки (з додаванням або без додавання) зберігали при -20°C і розморожували 5 разів, і визначали рівні MCP-1 людини. Не було виявлено значної втрати імунореактивності MCP-1 людини при заморожуванні та розморожуванні.

13.5.2. Стабільність зберігання

Аліквоти зразків сироватки (з додаванням або без нього) зберігали при -20°C, від 2°C до 8°C, кімнатній температурі та 37°C, а рівень MCP-1 людини визначали через 24 години. Не було виявлено значної втрати імунореактивності MCP-1 людини під час зазначених вище умов.

13.6. Специфічність

Аналіз виявляє як природний, так і рекомбінантний людський MCP-1.
Перехресну реактивність циркулюючих факторів імунної системи оцінювали шляхом додавання цих білків у фізіологічно відповідних концентраціях у позитивну сироватку людини за MCP-1.
Не було виявлено перехресної реактивності, а саме не з MCP-3.

14. Підсумок приготування реагентів

15.1. Промивний буфер (1x)

Додайте концентрат промивного буфера 20 разів (50 мл) до 950 мл дистильованої води.

Кількість стріпів	Концентрат промивного буфера (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

15.2. Буфер для аналізу (1x)

Додайте буферний концентрат 20x (5 мл) до 95 мл дистильованої води.

Кількість стріпів	Буферний концентрат (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95,0

15.3. HRP-кон'югат

Зробіть 1:100 розведення HRP-кон’югату в буфері для аналізу (1x):

Кількість стріпів	HRP-кон'югат (мл)	Буфер для аналізу (1x) (мл)
1 - 6	0,03	2,97
1 - 12	0,06	5.94

15.4. Стандарт MCP-1 людини

Розчиніть ліофілізований стандарт MCP-1 людини дистильованою водою. (Обсяг розчинення вказано на етикетці флакона стандарту.)

15.5. Контролі

Розчиніть ліофілізовані контролі, додавши дистильовану воду (10-30 хвилин). Обсяг розчинення вказано на етикетці контрольного флакона.

15. Резюме протоколу тестування

1. Визначте необхідну кількість стріпів для мікролунок.
2. Двічі промийте стрипи мікролунок промивним буфером.
3. Як альтернатива зовнішнє стандартне розведення в пробірках (див9.4.1):Внесіть 100 мкл цих стандартних розведень у стрипи мікролунок.
4. Додайте 100 мкл буфера для аналізу (1x) у двох примірниках до лунок Бланк.
5. Додайте 80 мкл буфера для аналізу (1x) до лунок зразка.
6. Додайте 20 мкл зразка в двох примірниках у призначені лунки для зразків.
7. Приготуйте кон'югат HRP.
8. Додайте 50 мкл HRP-кон’югату в усі лунки.
9. Закрийте стріпи мікролунками та інкубуйте 2 години при кімнатній температурі (18–25 °C).
10. Спорожніть і промийте стріпи мікролунок 3 рази промивним буфером.
11. Додайте 100 мкл розчину субстрату ТМБ в усі лунки.
12. Інкубуйте стрипи з мікролунками приблизно 10 хвилин при кімнатній температурі (18–25 °C).
13. Додайте 100 мкл стоп-розчину в усі лунки.
14. Налаштуйте рідер мікролунок і виміряйте інтенсивність кольору при 450 нм.

Примітка. Якщо дотримувались інструкцій у цьому протоколі, зразки були розведені 1:5 (20 мкл зразка + 80 мкл буфера для аналізу (1x)), а концентрація, зчитана зі стандартної кривої, повинна бути помножена 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!
	Містить біологічний матеріал людського походження
	Містить біологічний матеріал тваринного походження
UDI	Унікальна ідентифікація пристрою
	Дистриб'ютор
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

Always there for you