

Молекула адгезії судинного ендотелію **sVCAM-1 ІФА**

Імуноферментний аналіз для кількісного виявлення VCAM-1 людини

REF 30150479

 **96**

   **2-8°C**

Тільки для досліджень
Не використовується для діагностичних процедур



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

Flughafenstrasse 52a
D-22335 Гамбург, Німеччина

Телефон: +49 (0)40-53 28 91-0
Факс: +49 (0)40-53 28 91-11

IBL@IBL-International.com
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

1 ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

Набір ІФА sVCAM-1 - це імуноферментний аналіз для кількісного виявлення VCAM-1 людини. Тільки для досліджень. Не для діагностичних або терапевтичних процедур.

2 ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Молекула адгезії судинних клітин-1 (VCAM-1) або CD106 є членом надсімейства гена імуноглобуліну. Початкове молекулярне клонування VCAM-1 повідомило про шість позаклітинних Ig-подібних доменів (6D VCAM-1). Цей 6D VCAM-1 виникає внаслідок альтернативного сплайсингу із семидоменного VCAM-1 (7D VCAM-1). 7D VCAM-1 є домінуючою формою, що експресується культивованими ендотеліальними клітинами людини. Домени з 1 по 3 є дуже гомологічними до доменів з 4 по 6, що свідчить про те, що вони виникли шляхом дублювання генів. КДНК 7D VCAM-1 передбачає основний білок приблизно 81 кДа із семи потенційних сайтів N-пов'язаного глікозилювання. Після повного глікозилювання зрілий білок має молекулярну масу приблизно 102 кДа. Це спостереження загалом узгоджується з дослідженнями імунопреципітації, які показують білок приблизно 110 кДа на активованому цитокінами ендотелії. Миші та щури VCAM-1 були клоновані. На відміну від ICAM-1, VCAM-1, здається, був дуже консервативним шляхом еволюції. І VCAM-1, і щури, і миші дуже гомологічні на рівні білка людському VCAM-1 (77% та 76% відповідно). VCAM-1 підтримує адгезію лімфоцитів, моноцитів, природних клітин-кілерів, еозинофілів та базофілів завдяки своїй взаємодії з дуже пізнім лейкоцитом антигену-4 (VLA-4). Взаємодія VCAM-1 / VLA-4 опосередковує тверду адгезію циркулюючих ненейтрофільних лейкоцитів до ендотелію. VCAM-1 також бере участь у адгезії лейкоцитів за межами судин, опосередковуючи адгезію лімфоцитів-попередників до стромальних клітин кісткового мозку та зв'язування В-клітин з фолікулярними дендритними клітинами лімфовузлів. VCAM-1 конститутивно не експресується на ендотелії, але може регулюватися *in vitro* у відповідь на LPS, ФНП альфа та ІЛ-1, а також на гамма-інтерферон та ІЛ-4. VCAM-1 також присутній у тканинних макрофагах, дендритних клітинах, фібробластах кісткового мозку, міобластах та м'язових трубочках.

1 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

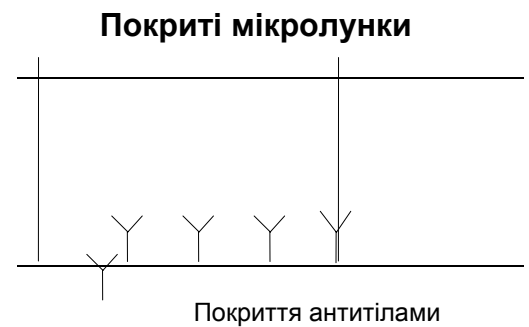
Покриття антитілами людини VCAM-1 наноситься на мікролунки.

VCAM-1 людини, присутній у зразку або в стандарті, пов'язується з антитілами, адсорбованими в мікролунках. Додають суміш кон'югатів (кон'юговане з біотином антитіло до людини VCAM-1 та Стрептавідин-HRP). Кон'юговане з біотином антитіло людини до VCAM-1 пов'язується з VCAM-1 людини, захопленим першим антитілом. Стрептавідин-HRP зв'язується з кон'югованим з біотином антитілом людини проти VCAM-1.

Після інкубації незв'язаний Стрептавідин-HRP видаляється на етапі промивання, а розчин субстрату реагує з HRP, доданим в лунки

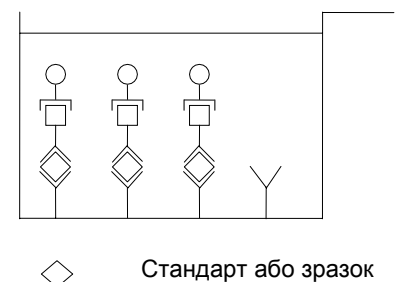
Кольоровий продукт утворюється пропорційно кількості VCAM-1 людини, присутнього у зразку або стандарті. Реакцію припиняють додаванням кислоти і вимірюють абсорбцію при 450 нм. Стандартну криву готують із 6 стандартних розведень VCAM-1 людини та визначають концентрацію зразка VCAM-1 людини.

Малюнок 1



Малюнок 2

Перша інкубація



Біотин кон'югат

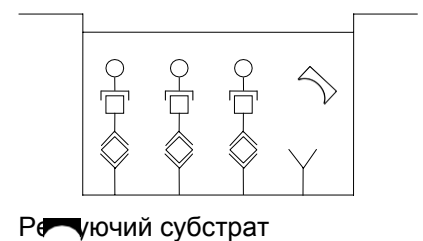
Стрептавідин-HRP

Малюнок 3

Друга інкубація



Малюнок 4



2 РЕАГЕНТИ НАДАНІ

MTP	1 алюмінієвий мішечок з мікропланшетом (12 стріпів з 8 лунками), покритий моноклональним антитілом до VCAM-1 людини
CONJMIX CONC	1 флакон (100 мкл) кон'югатної суміші, що містить біотін кон'юговане моноклональне антитіло VCAM-1 людини ,змішане з Стрептавідин HRP
CAL LYO	2 флак. VCAM-1 людини Стандарт ліофіліз., 200 нг/мл до відновлення
CONTROL H LYO	1флакон Контроль високий ліофілізований
CONTROL L LYO	1флакон Контроль низький, ліофілізований
ASSAYBUF CONC	1 флакон (5 мл) Буфер аналізу концентрат 20x (PBS з 1% Твін 20, 10% БСА)
WASHBUF CONC	1 пляшка (50 мл) Промивний буфер конц. 20x (PBS з 1% Твін 20)
SUBS	1флакон (15 мл) Розчин Субстрату
STOP	(тетраметилбензидин) 1флакон (15 мл) Стоп Розчин(1М фосф.кислоти)

3 клейові фольги

5.ІНСТРУКЦІЯ ЗІ ЗБЕРІГАННЯ ІФА НАБОРУ

Зберігайте набори реагентів при температурі від 2 ° С до 8 ° С, крім контролів. Зберігати ліофілізований контроль при -20 ° С. Відразу після використання залишки реагентів слід повернути в холодне зберігання (від 2 ° С до 8 ° С), контроль до -20 ° С, відповідно. Термін придатності набору та реагентів вказаний на етикетках. Термін придатності компонентів набору може бути гарантований лише за умови належного зберігання компонентів і якщо в разі багаторазового використання одного компонента цей реагент не забруднений при першій обробці.

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Супернатант культури клітин, сироватку, плазму (ЕДТА, цитрат, гепарин) та навколоплідні води випробовували 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. Зразки, що містять видимий осад, слід очистити перед використанням у дослідженні. Не використовуйте сильно гемолізовані або ліпемічні зразки. Зразки слід розподіляти аликвотами та зберігати замороженими при -20 ° С, щоб уникнути втрати біоактивного людського VCAM-1. Якщо зразки мають бути запущені протягом 24 годин, їх можна зберігати при температурі від 2 ° до 8 ° С (щодо стабільності зразка див. 13.5). Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Перед аналізом заморожений зразок слід повільно довести до кімнатної температури і обережно перемішати.

7. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ НАДАНІ

- Калібровані 5 мл та 10 мл градуйовані піпетки
- 5 мкл до 1000 мкл регульована одноканальна мікропіпетка з одноразовими наконечниками
- 50 мкл до 300 мкл регульована багатоканальна мікропіпетка з одноразовими наконечниками
- Багатоканальний резервуар для мікропіпеток
- Склянки, колби, балони, необхідні для приготування реагентів
- Пристрій для доставки мийного розчину (багатоканальна мийна пляшка або автоматична система миття) – Рідер для зчитування стріпів мікропланшетів, здатний зчитувати при 450 нм (620 нм як додаткова опорна довжина хвилі)
- дистильована в скляному посуді або дейонізована вода
- Статистичний калькулятор з програмою для проведення регресійного аналізу

– ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ПРИ ВИКОРИСТАННІ

Усі реагенти слід розглядати як потенційно небезпечні. Тому ми рекомендуємо, щоб цим продуктом користувались лише ті особи, які пройшли навчання лабораторних технік, і щоб він використовувався відповідно до принципів належної лабораторної практики. Носіть відповідний захисний одяг, такий як лабораторний комбінезон, захисні окуляри та рукавички. Слід обережно уникати контакту зі шкірою або очима. У разі потрапляння на шкіру або очі негайно промити водою. Див. Паспорт безпеки (матеріалів) та / або заяву (і) щодо безпеки, щоб отримати конкретні поради.

– Реагенти призначені лише для дослідницького використання і не використовуються в діагностичних або терапевтичних процедурах.

– Не змішуйте і не замінюйте реагенти з реактивами з інших партій або інших джерел.

– Не використовуйте набір реагентів після закінчення терміну придатності на етикетці.

– Не піддавайте реагенти набору сильному світлу під час зберігання або інкубації.

– Не піпетуйте через рот.

– Не їжте і не паліть у місцях, де працюють з реагентами або зразками.

– Уникайте контакту шкіри або слизових оболонок з реактивами або зразками.

– Під час роботи з реагентами або зразками набору слід носити гумові або одноразові латексні рукавички. --- Уникайте контакту розчину субстрату з окислювачами та металом. Уникайте бризок або утворення аерозолів.

– Щоб уникнути мікробного забруднення або перехресного забруднення реагентів або зразків, які можуть призвести до недійсності тесту, використовуйте одноразові наконечники піпеток та / або піпетки.

– Використовуйте чисті спеціальні лотки для реагентів для дозування кон'югату та субстрату.

– Вплив кислоти інактивує кон'югат. Для приготування реагентів слід використовувати скляну дистильовану воду або дейонізовану воду. Розчин субстрату перед використанням повинен мати кімнатну температуру.

– Знезаразити та утилізувати зразки та всі потенційно забруднені матеріали, оскільки вони можуть містити інфекційні агенти. Кращим методом знезараження є автоклавування протягом мінімум 1 години при 121,5 ° C. Рідкі відходи, що не містять кислоти та нейтралізовані відходи, можна змішувати з гіпохлоритом натрію в таких обсягах, щоб кінцева суміш містила 1,0% гіпохлориту натрію. Виділіть 30 хвилин для ефективного знезараження. Рідкі відходи, що містять кислоти, необхідно нейтралізувати перед додаванням гіпохлориту натрію.

9 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Концентрати буферів слід довести до кімнатної температури і розбавити перед початком процедури випробування.

2. Якщо в концентратах буферів утворилися кристали, обережно нагрійте їх до повного розчинення.

9.1. Промивний буфер (1x)

1. Налийте весь вміст (50 мл) концентрату промивного буфера (20 x) у чистий градуйований циліндр об'ємом 1000 мл. Доведіть до кінцевого об'єму 1000 мл скляною дистильованою або дейонізованою водою. 2. Акуратно перемішайте, щоб уникнути піноутворення.

3. Перекладіть у чисту мийну пляшку та зберігайте при температурі від 2 ° C до 25 ° C. Зверніть увагу, що буфер для промивання (1x) стабільний протягом 30 днів.

4. Буфер для промивання (1x) також може бути приготований за потреби згідно з наступною таблицею:

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

9.2. Буфер аналізу (1x)

1. Вилийте весь вміст (5 мл) концентрату буфера аналізу (20 x) у чистий градуйований циліндр на 100 мл. Доведіть до кінцевого об'єму 100 мл дистильованої води. Акуратно перемішайте, щоб уникнути піноутворення.

2. Зберігати при температурі від 2 ° C до 8 ° C. Зверніть увагу, що буфер аналізу (1x) стабільний протягом 30 днів.

3. Буфер аналізу (1x) також може бути підготовлений за потреби згідно з наступною

таблицею :

Кількість стріпів	Буфер аналізу концентрат (20x) (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

9.3. Кон'югатна суміш

Примітка: Кон'югатну суміш слід використовувати протягом 30 хвилин після розведення.

1. Кон'югатна суміш (біотин-кон'югат, змішаний із стрептавідином-HRP) повинна бути розведена 1: 100 буфером зразка (1x) безпосередньо перед використанням у чистій пластиковій пробірці.

2. Кон'югатна суміш може готуватися за потреби згідно з наступною таблицею :

Кількість стріпів	Кон'югатна суміш (мл)	Буфер аналізу (1x) (мл)
1 - 6	0.03	2.97
1 - 12	0.06	5.94

9.4. Стандарт VCAM-1 людини

1. Відновіть людський стандарт VCAM-1, додавши дистильовану воду. Об'єм розчинення вказаний на етикетці флакона стандарту. Обертайте або обережно перемішуйте, щоб забезпечити повну та однорідну солюбілізацію (концентрація відновленого стандарту = 200 нг / мл).

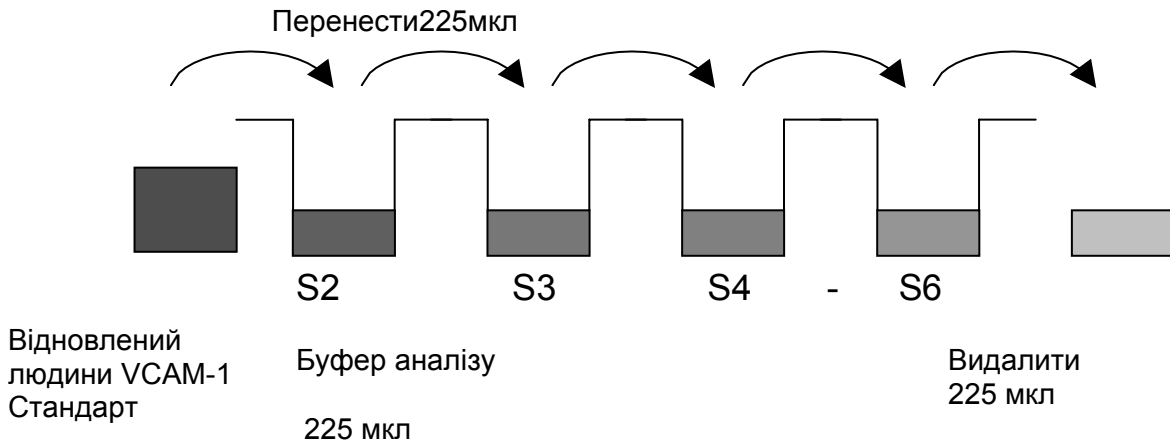
2. Дайте стандарту розчинитися протягом 10-30 хвилин. Добре перемішайте перед тим, як робити розведення.

3. Після використання залишковий стандарт не можна зберігати і його слід видалити.

4. Стандартні розведення можна приготувати безпосередньо на мікропланшеті (див. 10.d) або, як варіант, у пробірках (див. 9.4.1).

9.4.1 Зовнішнє розведення стандартів

1. Позначте 6 пробірок, по одній для кожної стандартної точки. S1, S2, S3, S4, S5, S6
2. Приготуйте послідовні розведення 1: 2 для стандартної кривої наступним чином:
Піпетуйте 225 мкл буфера аналізу (1x) у кожну пробірку.
3. Піпетуйте 225 мкл відновленого стандарту (концентрація = 200 нг / мл) у першу пробірку, позначену S1, і перемішайте (концентрація стандарту 1 = 100 нг / мл).
4. Піпетуйте 225 мкл цього розчину у другу пробірку, позначену S2, і ретельно перемішайте перед наступним перенесенням.
5. Повторіть послідовне розведення ще 4 рази, таким чином створюючи точки стандартної кривої (див. Малюнок 5). Буфер зразку (1x) служить порожнім (бланк).



9.4. Контролі

Відновіть, додаючи 150 мкл дистильованої води до ліофілізованого контролю (10-30 хвилин). Обертайте або обережно перемішуйте, щоб забезпечити повне і однорідне розчинення. Далі обробляйте контролі, як ваші зразки в аналізі. Діапазон контролю див. у сертифікаті аналізу або етикетці флакона. Зберігати відновлені контролі з розподілом на -20 ° С. Уникайте повторних циклів заморожування та відтавання.

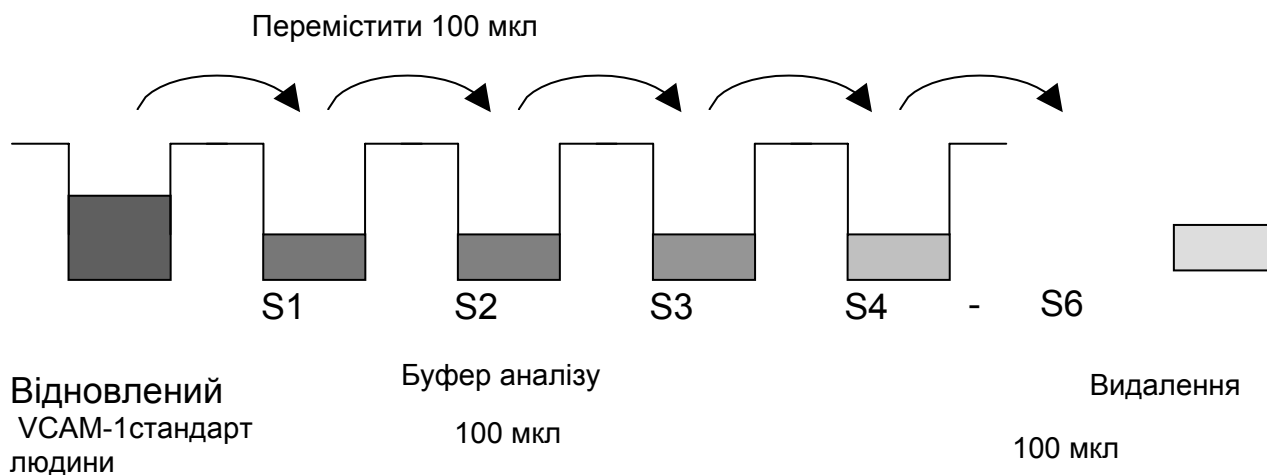
10. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

а. Перед початком процедури тестування попередньо розведіть зразки. Розведіть зразки сироватки та плазми 1:50 буфером для аналізу (1х) за такою схемою: 10 мкл зразка + 490 мкл буфера для аналізу (1х) б. Визначте кількість стріпів мікропланшетів, необхідних для випробування бажаної кількості зразків плюс відповідну кількість лунок, необхідних для запуску бланків та стандартів. Кожен зразок, стандарт, порожній (бланк) та необов'язковий контрольний зразок слід аналізувати у двох примірниках. Перемістіть зайві стріпи мікролунок з тримача та зберігайте у фольгованому мішку із герметиком, ретельно закритим при температурі 2 ° С - 8 ° С.

с. Промийте стріпи мікролунок двічі приблизно 400 мкл буфера для промивання на лунку, ретельно аспіруючи вміст мікролунок між промивками. Залиште буфер для промивання приблизно в 10 - 15 секундах перед аспірацією. Будьте обережні, щоб не подряпати поверхню мікролунок. Після останнього етапу промивання спорожніть лунки та постукайте стріпами мікролунок по абсорбуючій прокладці або паперовому рушнику, щоб видалити зайвий буфер для промивання. Використовуйте стріпи мікролунок відразу після промивання. Як варіант, стріпи мікролунок можна класти догори дном на мокрий абсорбуючий папір не довше ніж на 15 хвилин. Не дозволяйте лункам висохнути.

д. Стандартне розведення на мікропланшеті (В якості альтернативи стандартне розведення можна приготувати у пробірках - див. 9.4.1.): Додайте 100 мкл буфера для аналізу (1х) у двох примірниках до всіх стандартних лунок. Піпетують 100 мкл приготовленого стандарту (див. Приготування стандарту 9.4, концентрація = 200,0 нг / мл) у двох примірниках у лунки A1 та A2 (див. Таблицю 1). Змішайте вміст лунок A1 та A2 шляхом повторної аспірації та видалення (концентрація стандарту 1, S1 = 100,0 нг / мл) та перенесіть 100 мкл у лунки B1 та B2 відповідно (див. Малюнок 6). Будьте обережні, щоб не подряпати внутрішню поверхню мікролунок. Продовжуйте цю процедуру 4 рази, створюючи два ряди розведень стандартів VCAM-1 людини в діапазоні від 100,0 до 3,1 нг / мл. Видаліть 100 мкл вмісту з останніх використаних мікролунок (F1, F2).

Рисунок 6 Норми розведення - мікропланшет.



У разі зовнішнього розведення стандартів (див. 9.4.1.) піпетуйте 100 мкл цих розведень стандартів (S1 - S6) у лунки стандартів згідно з таблицею 1.

Таблиця 1

Таблиця, що зображує приклад розташування бланків, стандартів та зразків у стріпах мікропланшетів:

	1	2	3	4
A	Стандарт 1 (100.0 нг/мл)	Стандарт 1 (100.0 нг/мл)	Зразок 2	Sample 2
B	Стандарт 2 (50.0 нг/мл)	Стандарт 2 (50.0 нг/мл)	Зразок 3	Sample 3
C	Стандарт 3 (25.0 нг/мл)	Стандарт 3 (25.0 нг/мл)	Зразок 4	Sample 4
D	Стандарт 4 (12.5 нг/мл)	Стандарт 4 (12.5 нг/мл)	Зразок 5	Sample 5
E	Стандарт 5 (6.3 нг/мл)	Стандарт 5 (6.3 нг/мл)	Зразок 6	Sample 6
F	Стандарт 6 (3.1 нг/мл)	Стандарт 6 (3.1 нг/мл)	Зразок 7	Sample 7
G	Бланк	Бланк	Зразок 8	Sample 8
H	Зразок 1	Зразок 1	Зразок 9	Sample 9

- е. Додайте 100 мкл буферу для аналізу (1х) у двох примірниках у порожні лунки (бланк)
 - ф. Додайте 100 мкл кожного попередньо розведеного зразка у двох примірниках у лунки для зразків.
 - г. Приготувати кон'югатну суміш (див. Розділ «Приготування кон'югатної суміші реагентів 9.3.»)
 - h. Додайте 50 мкл розведеної суміші кон'югатів у всі лунки, включаючи порожні лунки.
 - і. Покрити клейкою плівкою та інкубувати при кімнатній температурі (від 18 до 25 ° C) протягом 2 годин, якщо це можливо на шейкері для мікропланшетів, встановленому на 400 об / хв.
 - j. Видаліть клейку плівку та опорожніть лунки. Промийте стріпи мікропланшетів 3 рази відповідно до пункту с. протоколу випробування. негайно перейдіть до наступного кроку.
 - к. Піпетуйте 100 мкл розчину субстрату ТМБ у всі лунки.
 - l. Інкубуйте стріпи мікропланшетів при кімнатній температурі (від 18 ° до 25 ° C) протягом приблизно 10 хвилин. Уникайте прямого впливу сильного світла. Слід контролювати розвиток кольору на планшеті і зупиняти реакцію субстрату (див. Наступний пункт цього протоколу), перш ніж позитивні лунки більше не будуть записані належним чином. Визначення ідеального періоду для розвитку кольору має проводитися індивідуально для кожного аналізу. Рекомендується додавати стоп розчин , коли найвищий стандарт має темно-синій колір. В якості альтернативи розвиток кольорів можна контролювати за допомогою рідера ІФА при 620 нм. Реакцію субстрату слід припинити, як тільки стандарт 1 досягне ОГ 0,9 - 0,95.
 - м. Зупиніть ферментативну реакцію, швидко піпетуючи 100 мкл стоп-розчину в кожну лунку. Важливо, щоб стоп-розчин швидко і рівномірно розподілявся по мікролунках, щоб повністю інактивувати фермент. Результати слід зчитувати негайно після додавання стоп-розчину або протягом однієї години, якщо стріпи мікропланшетів зберігаються при температурі 2 - 8 ° C у темряві.
 - п. Зчитайте поглинання кожної мікролунки на спектрофотометрі, використовуючи 450 нм як первинну довжину хвилі (необов'язково 620 нм як референтну довжину хвилі; прийнятно від 610 нм до 650 нм). Налаштуйте на нуль рідер мікропланшетів відповідно до інструкцій виробника, використовуючи порожні лунки бланк. Визначте поглинання як зразків, так і стандартів.
- Примітка: У разі інкубації без струшування отримані О.Г. значення можуть бути нижчими, ніж вказані нижче. Проте результати все ще діють.

11. РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Обчисліть середні значення поглинання для кожного набору стандартів та зразків в дублікатах. Дублікати повинні бути в межах 20 відсотків середнього значення.

– Створіть стандартну криву, побудувавши середнє поглинання для кожної стандартної концентрації на ординаті проти концентрації людини VCAM-1 на абсцисі. Накресліть криву найкращого прилягання через точки графіку (рекомендується відповідність кривої з 5 параметрами).

– Щоб визначити концентрацію циркулюючого VCAM-1 людини для кожного зразка, спочатку знайдіть середнє значення поглинання на ординаті та продовжте горизонтальну лінію до стандартної кривої. У точці перетину протягніть вертикальну лінію до абсциси та зчитайте відповідну концентрацію VCAM-1 людини.

– Якщо дотримувались інструкцій цього протоколу, зразки сироватки та плазми розбавляли 1:50 (10 мкл зразка + 490 мкл досліджувального буфера (1x)), а концентрацію, прочитану зі стандартної кривої, слід помножити на коефіцієнт розведення (x 50).

– Розрахунок зразків з концентрацією, що перевищує стандарт 1, може призвести до неправильних, низьких рівнів VCAM-1 для людини. Такі зразки вимагають подальшого зовнішнього попереднього розведення згідно з очікуваними значеннями VCAM-1 людини за допомогою буфера аналізу (1x), щоб точно визначити фактичний рівень VCAM-1 людини.

– Пропонується, щоб кожна лабораторія для випробувань встановила контрольний зразок відомої концентрації людини VCAM-1 і запускала цей додатковий контроль з кожним аналізом. Якщо отримані значення не входять в очікуваний діапазон контролю, результати аналізу можуть бути невірними.

– Типова стандартна крива зображена на рисунку 7.

Примітка: Не використовуйте цю стандартну криву для отримання результатів випробувань. Кожна лабораторія повинна підготувати стандартну криву для кожної групи досліджуваних стріпів мікропланшетів.

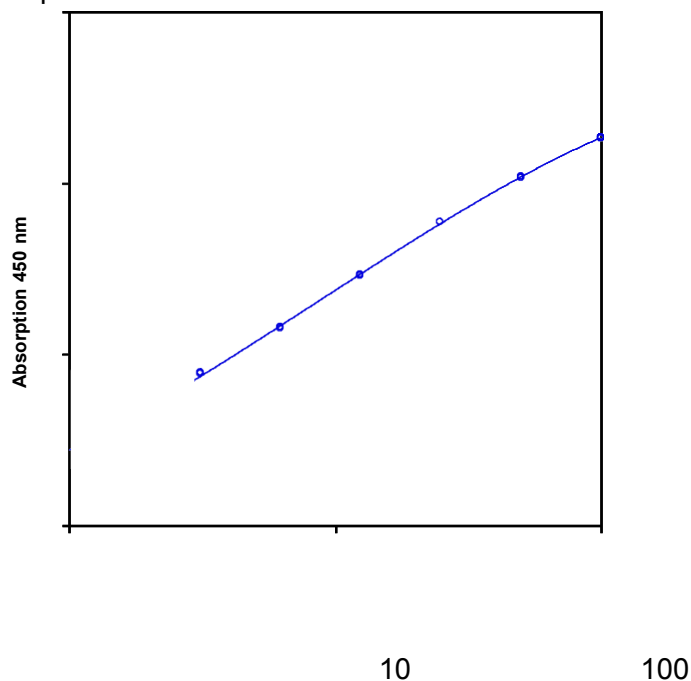
Рисунок 7 Репрезентативна стандартна крива для ІФА VCAM-1 людини. VCAM-1 людини розводили послідовними двократними етапами в буфері аналізу (1x). Не використовуйте цю стандартну криву для отримання результатів випробувань. Стандартна крива повинна бути проведена для кожної групи досліджуваних стріпів мікропланшетів.

10

1

0.1

0.01



Концентрація (нг/мл)

Таблиця 2

Типові дані із використанням sVCAM-1 ІФА

Вимірювальна довжина хвилі: 450 нм

Референтна довжина хвилі: 620 нм

Стандарт	САМ-1 людини концентрація (нг/мл)	О.Г. при 450 нм	Середня О.Г. при 450 нм	C.V. (%)
1	100.0	1.808 1.837	1.823	0.8
2	50.0	1.080 1.058	1.069	1.0
3	25.0	0.582 0.583	0.583	0.1
4	12.5	0.284 0.288	0.286	0.7
5	6.3	0.144 0.141	0.142	1.1
6	3.1	0.077 0.078	0.078	0.6
Бланк	0	0.032 0.028	0.030	6.7

Значення ОГ на стандартній кривій можуть змінюватися залежно від умов проведення аналізу (наприклад, оператор, техніка піпетування, техніка промивання або температурний вплив). Крім того, термін придатності набору може впливати на ферментативну активність і, отже, на інтенсивність кольору. Виміряні значення залишаються дійсними.

12. ОБМЕЖЕННЯ

- Оскільки точні умови можуть відрізнятися від аналізу до аналізу, для кожного циклу повинна бути встановлена стандартна крива.

-Бактеріальне або грибкове забруднення скринінгових зразків або реагентів або перехресне забруднення між реагентами може спричинити помилкові результати.

- Надають перевагу одноразовим наконечникам піпеток, колбам або скляному посуду, посуд для багаторазового використання потрібно вимити та ретельно промити від усіх мийючих засобів.

- Неправильне або недостатнє миття на будь-якому етапі процедури призведе до помилково позитивних чи помилково негативних результатів. Перед розподілом свіжого промивного розчину спорожніть лунки повністю, заповніть буфером для промивання, як зазначено для кожного циклу промивання, і не дозволяйте лункам знаходитись непокритими або сухими протягом тривалого часу. Застосування радіоімунотерапії суттєво збільшило кількість зразків з людськими антимишачими антитілами IgG (НАМА). НАМА може впливати на аналізи з використанням мишачих моноклональних антитіл, що призводить до хибних результатів. Зразки сироватки, що містять антитіла до мишачих імуноглобулінів, все ще можуть бути проаналізовані в таких аналізах, коли до зразка додають мишачі імуноглобуліни (сироватка, асцитична рідина або моноклональні антитіла, що не мають значення).

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

а. Чутливість

Межа виявлення VCAM-1 людини, визначена як концентрація аналіту, що призводить до поглинання, значно вищого за поглинання середовища розведення (середнє плюс 2 стандартні відхилення), була визначена як 0,6 нг / мл (середнє значення для 6 незалежних аналізів).

13.2 Відновлення

13.2.1 В аналізі

Відновлення в рамках аналізу оцінювали в 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повторами 8 зразків сироватки, що містять різні концентрації VCAM-1 людини. На кожному планшеті проводили 2 стандартні криві. Дані нижче показують середню концентрацію VCAM-1 у людини та коефіцієнт варіації для кожного зразку (див. Таблицю 3). Розрахований загальний коефіцієнт варіації в межах аналізу становив 3,1%.

Таблиця 3 Середня концентрація VCAM-1 у людини та коефіцієнт варіації для кожного зразку

зразок	експеримент	Середня VCAM-1 концентрація (нг/мл)	CV (%)
1	1	1550.5	1.9
	2	1429.1	1.7
	3	1397.5	0.3
2	1	689.2	1.4
	2	698.3	2.6
	3	660.6	3.0
3	1	781.8	3.2
	2	808.7	1.5
	3	732.5	1.3
4	1	543.2	6.1
	2	575.5	2.4
	3	500.3	2.7
5	1	395.4	3.4
	2	461.1	7.4
	3	430.4	8.3
6	1	435.3	1.4
	2	458.4	3.3
	3	431.5	2.5
7	1	384.7	6.0
	2	412.1	2.0
	3	368.1	0.6
8	1	460.0	3.2
	2	498.6	2.8
	3	458.8	4.5

13.2.1 Між аналізами

Відтворюваність між аналізами в одній лабораторії оцінювали в 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повторностями 8 зразків сироватки, що містять різні концентрації VCAM-1 людини. На кожному планшеті проводили 2 стандартні криві. Дані нижче показують середню концентрацію VCAM-1 у людини та коефіцієнт варіації, розрахований на 18 визначень кожного зразку (див. Таблицю 4). Розрахований загальний коефіцієнт варіації між тестами становив 5,2%.

Таблиця 4 Середня концентрація VCAM-1 у людини та коефіцієнт варіації кожного зразку

зразок	середнє VCAM-1 людини концентрація (нг/мл)	CV(%)
1	1459.0	5.5
2	682.7	2.9
3	774.3	5.0
4	539.7	7.0
5	428.9	7.7
6	441.7	3.3
7	388.3	5.7
8	472.5	4.8

13.3 Відновлення збагаченням

Відновлення збагаченням оцінювали шляхом додавання 7 рівнів VCAM-1 людини до об'єднаних нормальних зразків сироватки. Відновлення визначали в 3 незалежних експериментах з 6 повторами в кожному. Кількість ендogenous VCAM-1 людини у сировинковій сироватці віднімали із пікових значень . Відновлення становило від 85% до 104% із загальним середнім відновленням 89%.

13.3. Паралельні розведення

Чотири зразки сироватки з різним рівнем VCAM-1 людини аналізували у послідовних двократних розведеннях з 4 повторностями у кожному. Відновлення становило від 87% до 120% із загальним відновленням 100% (див. Таблицю 5).Table 5

Table 5

зразок	розведення	очікувана VCAM-1 людини конц. (нг/мл)	спостерігаєма VCAM-1C людини конц. (нг/мл)	Відновлення очікуваної VCAM-1 людини концентрації (%)
1	1:50	--	1409.3	--
	1:100	704.6	639.5	91
	1:200	352.3	306.0	87
	1:400	176.2	166.2	94
2	1:50	--	639.1	--
	1:100	319.5	308.3	97
	1:200	159.8	174.2	109
	1:400	79.9	86.9	109
3	1:50	--	795.3	--
	1:100	397.7	368.2	93
	1:200	198.8	189.5	95
	1:400	99.4	94.5	95
4	1:50	--	508.8	--
	1:100	254.4	244.8	96
	1:200	127.2	152.7	120
	1: 400	63,6	70,1	110

13.5. Стабільність зразку

13.5.1 Стабільність заморожування-відтавання

Аліквоти зразків сироватки (збагачені або без збагачення) зберігали при -20°C і розморожували 5 разів, і визначали рівень VCAM-1 у людини. Суттєвої втрати імунореактивності людини VCAM-1 не виявлено при заморожуванні та розморожуванні.

13.5.2 Стабільність зберігання

Аліквоти зразків сироватки (збагачені або без збагачення) зберігали при -20°C , $2-8^{\circ}\text{C}$, кімнатній температурі (КТ) та при 37°C , а рівень VCAM-1 людини визначали через 24 години. Під час зберігання при -20°C , $2-8^{\circ}\text{C}$ і КТ не було виявлено значної втрати імунореактивності VCAM-1 людини. Значну втрату імунореактивності VCAM-1 людини (20%) було виявлено під час зберігання при температурі 37°C через 24 години.

13.2 Порівняння сироватки та плазми

Із двох осіб одночасно отримували сироватку, а також ЕДТА, цитрат та гепаринову плазму та тестували на VCAM-1 людини. Концентрації суттєво не відрізнялись, і тому всі ці препарати крові придатні для використання в аналізі. Проте настійно рекомендується забезпечити однорідність препаратів крові.

13.3 Специфічність

Аналіз виявляє як природний, так і рекомбінантний VCAM-1 людини. Взаємодія циркулюючих факторів імунної системи оцінювали шляхом додавання цих білків у фізіологічно значущих концентраціях у позитивну сироватку крові VCAM-1 людини. Не було виявлено перехресної реактивності, особливо не з іншими членами надсімейства гена імуноглобуліну.

14. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

а. Промивний буфер (1x)

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

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

б. Буфер аналізу (1x)

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

Кількість стріпів	Буфер аналізу конц. (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

14.3. Кон'югатна суміш

Зробіть розведення суміші кон'югатів (біотин-кон'югат, змішаний зі стрептавідином-HRP) у розведенні 1: 100 безпосередньо перед використанням

Кількість стріпів	Кон'югатна суміш (Мл)	Буфер аналізу (1x) (мл)
1 - 6	0.03	2.97
1 - 12	0.06	5.94

14.4.Контролі.

Додайте 150 мкл дистильованої води до ліофілізованого контролю.

13. РЕЗЮМЕ ПРОТОКОЛУ АНАЛІЗУ

1. Попередньо розведіть зразки сироватки та плазми за допомогою буфера для аналізу (1х) 1:50.
 2. Визначте кількість потрібних стріпів мікропланшетів.
 3. Промийте стріпи мікропланшетів двічі промивним буфером.
 4. Стандартне розведення на мікропланшеті: додайте 100 мкл буфера для аналізу у двох примірниках до всіх стандартних лунок. Прокачайте 100 мкл підготовленого стандарту в перші лунки та створіть стандартні розведення, переносячи 100 мкл з лунки в лунку. Видаліть 100 мкл з останніх лунок. В якості альтернативи зовнішнє стандартне розведення у пробірках (див. 9.4.1): Внесіть 100 мкл цих стандартних розведень у стріпи мікролунок.
 5. Додайте 100 мкл буфера для аналізу (1х), у двох примірниках, до порожніх лунок (бланк).
 6. Додайте 100 мкл попередньо розведених зразків у двох примірниках у призначені лунки для зразків.
 7. Приготувати кон'югатну суміш.
 8. Додайте 50 мкл кон'югатної суміші у всі лунки.
 9. Накрийте стріпи мікролунок та інкубуйте 2 години при кімнатній температурі (від 18 ° до 25 ° C).
 10. Опорожніть і промийте стріпи мікролунок 3 рази за допомогою буфера для промивання.
 11. Додайте 100 мкл розчину субстрату ТМБ у всі лунки.
 12. Інкубуйте стріпи мікролунок близько 10 хвилин при кімнатній температурі (від 18 ° до 25 ° C).
 13. Додайте 100 мкл стоп-розчину у всі лунки.
 14. Налаштуйте на «нуль» рідер мікролунок і виміряйте інтенсивність кольору при 450 нм.
- Примітка: Якщо дотримувались інструкцій цього протоколу, зразки сироватки та плазми розбавлялися 1:50 (10 мкл зразка + 490 мкл досліджувального буфера (1х)), а концентрацію, прочитану зі стандартної кривої, слід помножити на коефіцієнт розведення (x 50).

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 ВКАЗАНОВОГО (-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