

# sICAM-1 ІФА

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення розчинної ICAM-1 людини

**REF 30150495**

**Σ 96**

   **2-8°C**

Тільки для дослідницьких цілей.  
Не для використання в діагностичних процедурах.



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

Flughafenstrasse 52a  
D-22335 Hamburg, Germany

Phone: +49 (0)40-53 28 91-0  
Fax: +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](mailto:info@ivset.ua) [www.ivset.ua](http://www.ivset.ua)

## **ЗМІСТ**

1. Призначення
2. Загальна інформація
3. Принцип аналізу
4. Надані реагенти
5. Інструкція зі зберігання набору ІФА
6. Інструкції з збору та зберігання зразків
7. Матеріали, необхідні, але не надані
8. Запобіжні заходи щодо використання
9. Підготовка реагентів
10. Протокол аналізу
11. Розрахунок результатів
12. Обмеження
13. Характеристика виконання
14. Інформація про замовлення
15. Підсумок підготовки реагентів

### 1. Призначення

ІФА (ICAM-1) людини є імуноферментним аналізом для кількісного визначення ICAM-1 людини. ІФА ICAM-1 людини використовується тільки для досліджень.

**Не для діагностичних або терапевтичних процедур.**

### 2. Загальна інформація

Молекула міжклітинної адгезії-1 (ICAM-1) є членом імуноглобулінового супергенного сімейства і функціонує як ліганд для Антигену-1 (LFA-1), пов'язаний з функцією лімфоцитів, альфа – бета комплексом, що є членом сімейства лейкоцитарного інтегрину клітинної клітини і клітинно-матричних рецепторів. Ця сім'я складається з лейкоцитарної адгезії глікопротеїнів LFA-1, які опосередковують адгезію лімфоцитів, Mac-1, який опосередковує адгезію гранулоцитів і p150,95. ICAM-1 являє собою одноцепочечний глікопротеїн з поліпептидним ядром 55 кД, який може бути виражений на не-гематопоектичних клітинах багатьох ліній, таких як судинні ендотеліальні клітини, тимусні епітеліальні клітини, інші епітеліальні клітини фібробласти і на гемопоетичних клітинах, таких як тканини макрофаги, стимульовані митогеном Т- лімфобласти, зародковий центр В-cells і дендритні клітини мигдалинах, лімфатичних вузлах і Пейєрових пластирах.

ICAM-1 індукується на фібробластах і ендотеліальних клітинах шляхом запальних медіаторів, таких як IL-1, TNF і IFN гамма протягом декількох годин і корелює з інфільтрацією лімфоцитів у запальних ураженнях.

ICAM-1, здається, є початковим маркером запальних реакцій і виражений раніше і в більшій мірі, ніж це HLA-DR.

### 3. Принцип аналізу.

Анти - людський ICAM-1 покриття антитілами абсорбується на мікролунки.

Малюнок 1

Людський ICAM-1 присутній у зразку або стандарті зв'язується з антитілами, адсорбованими до мікролунки. HRP-кон'юговане анти-людське антитіло ICAM-1 додається і зв'язується з людським ICAM-1 захоплюється першим антитілом.

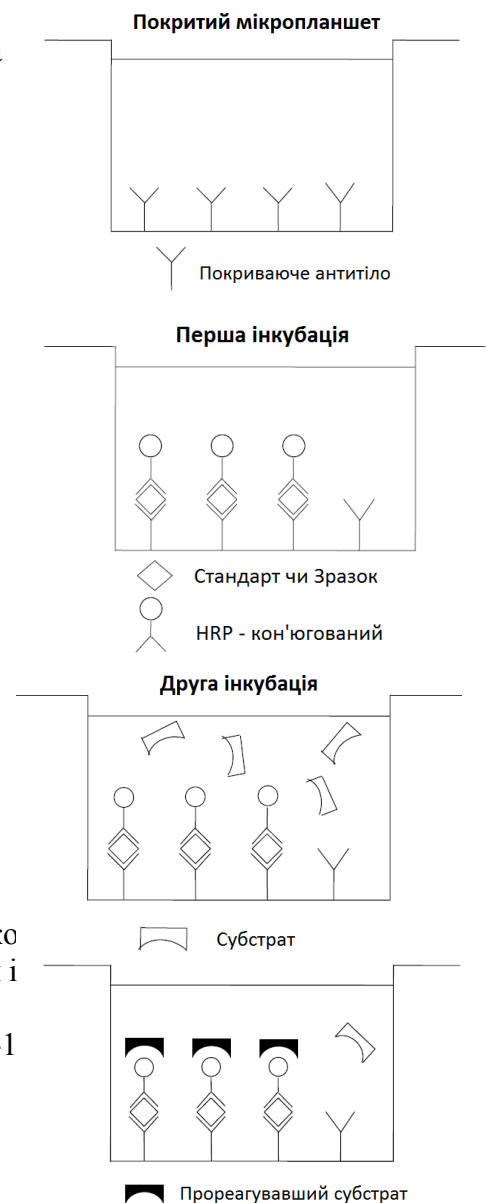
Малюнок 2

Після інкубації незв'язаний HRP кон'югований анти-людський ICAM-1 видаляють під час етапу промивання і розчин субстрату реакційного з HRP додають в лунки.

Малюнок 3

Кольоровий продукт формується пропорційно кількості людського зразку або стандарті. Реакцію припиняють додаванням кислоти і поглинання вимірюють при 450 нм. стандартну криву готують з 5 людських стандартних розведень ICAM-1 і людську ICAM-1 концентрацію визначають.

Малюнок 4



#### **4. Інструкція зі зберігання набору ІФА.**

Зберігати реагенти набору при температурі від 2 ° до 8 ° С за винятком контролів. Зберігати ліофілізовані контролі при -20 ° С. Відразу після використання залишкові реагенти повинні бути повернені до холодного зберігання (від 2 ° до 8 ° С) або -20 ° С відповідно. Термін експлуатації комплекту та реагентів вказаний на етикетках. Термін експлуатації компонентів набору може бути гарантованим тільки в тому випадку, якщо компоненти зберігаються належним чином, і якщо в разі повторного використання одного компонента цей реагент не забруднюється першим використанням.

#### **5. Інструкції зі збору та зберігання зразків.**

Супернатант культури клітин, сироватки і плазми (ЕДТА, цитрат, гепарин), амніотична рідина, спонтанна сеча і жовч були протестовані за допомогою цього аналізу. Інші біологічні зразки можуть бути придатними для використання в аналізі. Видаліть сироватку або плазму згустків або клітин так швидко, як це можливо після згортання та сепарації.

Зверніть увагу на можливий «Хук - ефект» через високі концентрації зразків (див. Розділ 11).

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

Зразки слід розділити, і вони повинні зберігатись замороженими при температурі -20 ° С, щоб уникнути втрати біологічно активного людського ІСАМ-1. Якщо зразки будуть прогнані протягом 24 годин, їх можна зберігати при температурі від 2 ° до 8 ° С (стабільність зразка див. 13.5).

Уникайте повторних циклів заморожування-розмороження. Перед аналізом заморожені зразки повинні бути повільно приведені до кімнатної температури та обережно змішані.

Для вимірювання ІСАМ-1 людини в спонтанній сечі використовують нерозбавлені зразки.

Живильні культуральні середовища для вирощування культур клітин без сироваткового компонента не придатні для визначення людського ІСАМ-1 за допомогою ІФА.

#### **6. Матеріали необхідні, але не надані.**

- 5 мл і 10 мл градуйовані піпетки
- 5 мкл до 1000 мкл регульовані одноканальні мікропіпетки з одноразовими наконечниками
- 50 мкл до 300 мкл регульовані багатоканальні мікропіпетки з одноразовими наконечниками
- Багатоканальний резервуар мікропіпеток
- Склянки, колби, циліндри, необхідні для підготовки реагентів
- пристрій для доставки розчину для промивки (багатоканальна промивна пляшка або автоматична система промивки)
- рідер мікропланшетів здатний до читання на 450 нм (620 нм як необов'язкова еталонна довжина хвилі)
- дистильована в склі або дейонізована вода
- статистичний калькулятор з програмою виконання регресійного аналізу.

#### **7. Запобіжні заходи щодо використання.**

Всі реагенти слід вважати потенційно небезпечними. Тому рекомендуємо використовувати цей продукт тільки тим особам, які пройшли навчання в лабораторних умовах та використовують відповідно до принципів належної лабораторної практики.

Використовуйте захисний одяг, наприклад лабораторний комбінезон, захисні окуляри та рукавички.

Необхідно дбати про те, щоб уникнути контакту зі шкірою або з очима. У разі контакту зі шкірою або очима промийте негайно водою. Див. дані безпеки

та / або заяви щодо безпеки для отримання конкретних порад.

- реагенти призначені тільки для дослідницьких цілей і не призначені для використання в терапевтичних процедурах

- Не змішуйте та не замінійте реагенти на ті, що містяться в інших партіях чи інших джерелах.

- Не використовуйте реактиви наборів після закінчення терміну придатності, вказаного на етикетці.
- Не піддавайте реактиви комплектів сильному освітленню під час зберігання або інкубації.
- Не прокапувати ротовою порожниною.
- Не їжте і не паліть в місцях, де використовуються реактиви або зразки.
- Уникайте контакту шкіри або слизових оболонок з реактивами набору або зразками
- Резинові або одноразові латексні рукавички повинні носитись під час роботи з реактивами набору або зразками.
- Уникати контакту розчину субстрату з окислювачами та металом.
- Уникайте бризок або утворення аерозолів.
- Щоб уникнути мікробного забруднення чи перехресного забруднення реактивів або зразків, які можуть призвести до недійсності випробувань, застосовувати одноразові наконечники піпетки та / або піпетки.
- Використовувати чисті спеціальні лотки для реактивів для дозування кон'югату та реактиву субстрату.
- Вплив на кислоту інактивує кон'югат.
- дистильована в склі вода або дейонізована вода повинна використовуватись для підготовки реактиву.
- Розчин субстрату повинен бути доведений до кімнатної температури перед використанням.

Знезаражувати і знешкоджувати зразки всі потенційно забруднені матеріали, оскільки вони можуть містити інфекційні агенти. Переважним способом знезараження є автоклавування протягом мінімум 1 години при 121,5 ° С.

- Рідкі відходи, що не містять кислоти та нейтралізовані відходи, можуть бути змішані з гіпохлоритом натрію в об'ємах таким чином, щоб остання суміш містила 1,0% гіпохлоритунатрію. Дозвольте 30 хвилин для ефективного знезараження. Рідкі відходи, що містять кислоти, повинні бути нейтралізовані при додаванні гіпохлориту натрію.

## 8. Підготовка реактивів

Концентрат буфера повинен бути доведений до кімнатної температури і повинен бути розбавлений перед початком процедури випробувань. Якщо кристали утворюються в буферних концентратах, нагрівайте їх поступово до тих пір, поки вони повністю не розчиняться.

### 8.1. Промивний буфер (1x)

Залити весь вміст (50 мл) промивного буферу концентрату (20x) у чистий 1000-мл градуйований циліндр. Доведіть до кінцевого об'єму 1000 мл з дистильованою в склі або дейонізованою водою. Обережно змішайте, щоб уникнути спінювання. Перемістіть до чистої промивної пляшки та зберігайте при температурі від 2 до 25 ° С. Будь - ласка, зверніть увагу, що промивний буфер (1x) стабільний протягом 30 днів.

Промивний буфер (1x) також може бути приготовлений у відповідності з наведеною нижче таблицею:

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

### 8.2. Буфер аналізу (1x)

Залити весь вміст (5 мл) концентрованого буферу для аналізу (20x) у чистий 100-мл градуйований циліндр. Довести до кінцевого об'єму 100 мл з дистильованою водою. Обережно змішайте, щоб уникнути піноутворення. Зберігайте при температурі від 2 ° до 8 ° С. Будь- ласка, зверніть увагу, що буфер для аналізу (1x) стабільний протягом 30 днів. Буфер аналізу (1x) також може бути приготований , якщо необхідно, згідно з наведеною нижче таблицею:

Кількість стріпів	Буфер аналізу концентрат (20x) мл	Дистильована вода (мл)
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

### 8.3. HRP-кон'югат

Пам'ятайте, що HRP-кон'югат повинен використовуватися протягом 30 хвилин після розбавлення.

Зробіть 1:100 розчин концентрованого HRP- кон'югату розчину з буфером аналізу (1x) у чистій пластиковій пробірці як необхідно відповідно до наведеної таблиці:

Кількість стріпів	HRP - кон'югат мл	Буфер аналізу (1x) (мл)
1-6	0,03	2.97
1-12	0,06	5.94

### 8.4. Стандарт ICAM-1 людини

**Стандартні розведення** можна одержувати безпосередньо на пластині мікропланшету (див.10с) або, як альтернатива, у пробірках (див. 9.4.1) .

#### 8.4.1. Зовнішнє стандартне розведення.

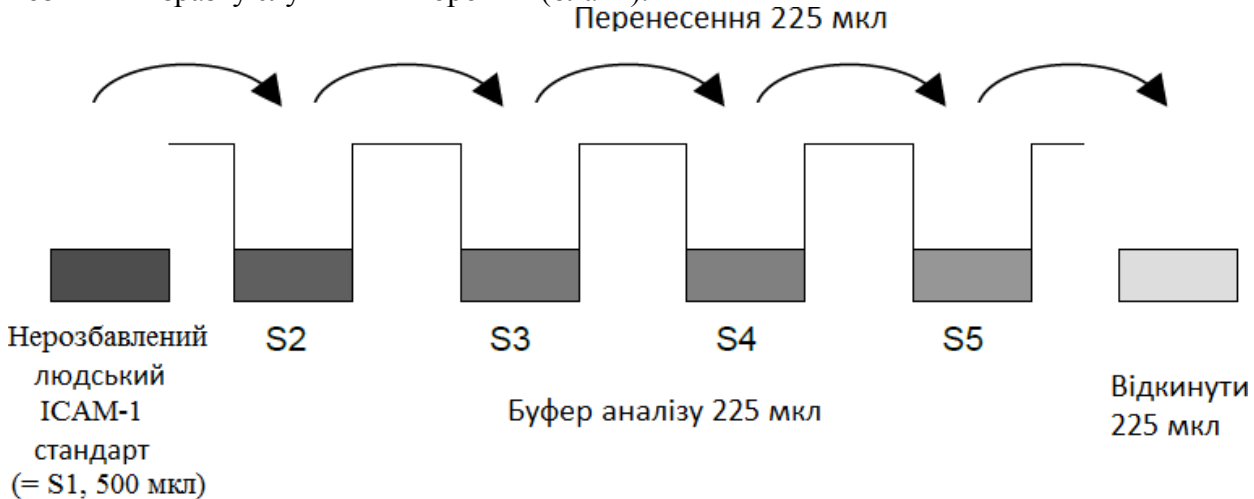
Позначте 4 пробірки, по одній для кожної стандартної точки. S2, S3, S4, S5

Потім готуйте 1;2 серійні розведення для стандартної кривої наступним чином: Прокапати 225 мкл розчинника зразка у пробірки S2-S5.

Прокапати 225 мкл нерозбавленого стандарту (служить найвищим стандартом S1, концентрація стандарту 1 = 100 нг / мл у першу пробірку, позначену S2, і змішати (концентрація стандарту 2 = 50 нг / мл).

Повторно повторюйте серійні розведення ще 3 рази, створюючи таким чином точки стандартної кривої (див. Мал. 5).

Розчинник зразку служить як порожня (бланк).



Малюнок 5 (див. оригінал інструкції)

## 9.5 Контролі

Відновити додаванням 100 мкл дистильованої води до ліофілізованого контролю (10-30 хвилин). Далі обробляйте контролі, як ваші зразки в аналізі. Для діапазону контролю див. Сертифікат аналізу або етикетку флакона.

Зберігати відновлені контролі аліквотованими при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Уникайте циклів заморозення/відтавання.

### 9. Протокол аналізу

а) визначити кількість стріпів мікропланшета необхідних для тестування потрібної кількості зразків плюс відповідну кількість лунок, необхідних для аналізу порожніх (бланк) лунок і стандартів. Кожен зразок, стандарт, порожня лунка (бланк) та необов'язковий контрольний зразок повинні бути проаналізовані в дублікатах. Видаліть надлишкові стріпи мікропланшета із тримача та зберігайте у щільно запечатаному пакеті з фольги з осушувачем при температурі  $2^{\circ}\text{C}$  -  $8^{\circ}\text{C}$  ретельно закритим.

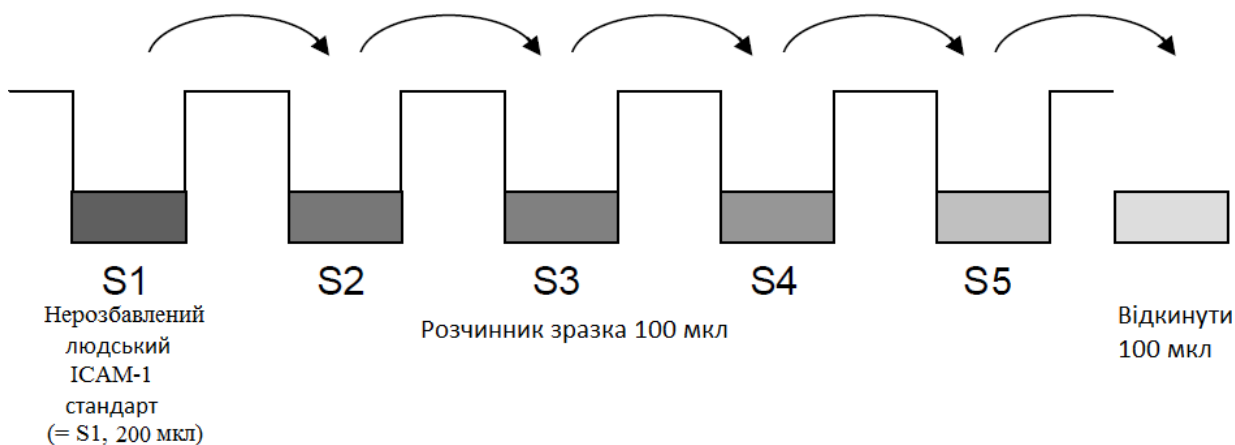
б) Промивайте стріпи мікропланшета двічі з приблизно 400 мкл промивного буфера на кожну лунку з повною аспірацією вмісту мікролунок між промиваннями. Додайте промивний буфер для находження в лунках приблизно 10 - 15 секунд перед аспірацією. Будьте обережні, не подряпайте поверхню мікропланшета.

Після останнього етапу промивки, опорожнити лунки та постукати стріпами мікропланшета на абсорбуючу подушку або паперовий рушник для видалення надлишкового промивного буфера. Використовуйте стріпи мікропланшета відразу після миття. Крім того, стріпи мікропланшета можуть бути розміщені догори дном на вологому абсорбентному папері протягом не більше 15 хвилин. **Не дозволяйте лункам висихати.**

с) Стандартне розведення на мікропланшеті (Альтернативно, стандартне розведення може бути отримане в пробірках - див. 9.4.1). Додати 100 мкл розчинника зразка у двох примірниках до лунок стандартів B1/2-E1/2, лишаючи A1/A2 порожньою. Прокапати 200 мкл нерозбавленого стандарту (концентрація =  $100,0\text{ нг / мл}$ ) у дублікатах у лунки A1 та A2 (див. Табл. 1). Перенесіть 100 мкл у лунки B1 та B2. Змішати вміст лунок B1 і B2 шляхом повторної аспірації і видалення, і перенести 100 мкл до лунок C1 і C2 відповідно (див. мал.6). Будьте обережні, щоб не подряпати внутрішню поверхню мікролунок. Продовжуйте цю процедуру 2 рази, створюючи два ряди людського стандарту ICAM-1 розведень в межах від  $100,00$  до  $6,3\text{ нг / мл}$ . Видаляють 100 мкл вміст з останніх використовуваних мікролунок (E1, E2).

Малюнок 6 (див. оригінал інструкції)

Перенесення 100 мкл



У разі зовнішнього стандартного розведення (див. 9.4.1) прокапати 100 мкл цих стандартних розчинів (S1 – S5) в стандартні лунки згідно табл.1.

	1	2	3	4
A	Стандарт 1 (100,00 нг/мл)	Стандарт 1 (10,00 нг/мл)	Зразок 3	Зразок 3
B	Стандарт 2 (50,00 нг/мл)	Стандарт 2 (5,00 нг/мл)	Зразок 4	Зразок 4
C	Стандарт 3 (25,0 нг/мл)	Стандарт 3 (2,50 нг/моль)	Зразок 5	Зразок 5
D	Стандарт 4 (12,5 нг/мл)	Стандарт 4 (12,5 нг/мл)	Зразок 6	Зразок 6
E	Стандарт 5 (6,3 нг/мл)	Стандарт 5 (6,3 нг/мл)	Зразок 7	Зразок 7
F	бланк	бланк	Зразок 8	Зразок 8
G	Зразок 1	Зразок 1	Зразок 9	Зразок 9
H	Зразок 2	Зразок 2	Зразок 10	Зразок 10

- d) Додайте 100 мкл розчинника зразка у двох примірниках до порожніх лунок (бланк)
- e) Додайте 90 мкл розріджувача проби до лунок зразка.
- f) Додають по 10 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) Накрийте клейкою плівкою та інкубуйте при кімнатній температурі (18-25 ° C) протягом 1 години, якщо доступний, на мікропланшетному шейкері, встановленому на 400 об / хв.
- j) Видалити 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 інкубують при кімнатній температурі (18-25 ° C) протягом около 10 хвилин. Уникайте впливу інтенсивного світла.

**Розвиток кольорів на пластині слід контролювати, а реакція субстрату зупиняється (див. Наступну статтю цього протоколу), перш ніж позитивні лунки більше не будуть правильно записуватися. Визначення ідеального періоду часу для розвитку кольору має здійснюватися індивідуально для кожного аналізу.**

Рекомендується додати стоп розчин, коли найвищий стандарт розвине темно-синій колір. Альтернативно, розвиток коліру можна контролювати рідером ІФА при 620 нм. Реакцію субстрату слід зупинити, як тільки Стандарт 1 досягне ОГ 0,9-0,95.

- l) Зупиніть реакцію ферменту, швидко піпетуючи 100 мкл стоп-розчину в кожен лунку . Цьважливо, щоб стоп розчин швидко і рівномірно поширювався по всьому мікропланшету, щоб повністю інактивувати фермент. Результати слід читати відразу після додавання стоп розчину або протягом однієї години, якщо стріпи мікропланшету зберігаються при температурі 2 - 8 ° C у темряві.
- m) зчитайте поглинання кожної мікролунки на спектрофотометрі, використовуючи 450 нм якості довжини первинної хвилі (необов'язково 620 нм як референтна довжина хвилі, 610 нм до 650 нм прийнятне). Налаштуйте рідер планшету згідно з інструкціями виробника, використовуючи лунки бланк. Визначити поглинання як зразків, так і стандартів. **Примітка: У разі інкубації без струшування отримані значення О.Г. можуть бути нижчі, ніж вказано нижче. Тим не менш результати все ще дійсні.**

## 10. Розрахунок результатів

обчислити середні значення поглинання для кожного набору дублікатів стандартів та зразків. Дублікати повинні бути не більше 20 відсотків від середнього значення.

- створіть стандартну криву шляхом нанесення середньої абсорбції для кожної стандартної концентрації на ординаті проти концентрації ІСАМ-1 людини на абсцисі. Намалуйте найкращу відповідну криву через точки графіка (рекомендується використовувати 5- параметрову криву).

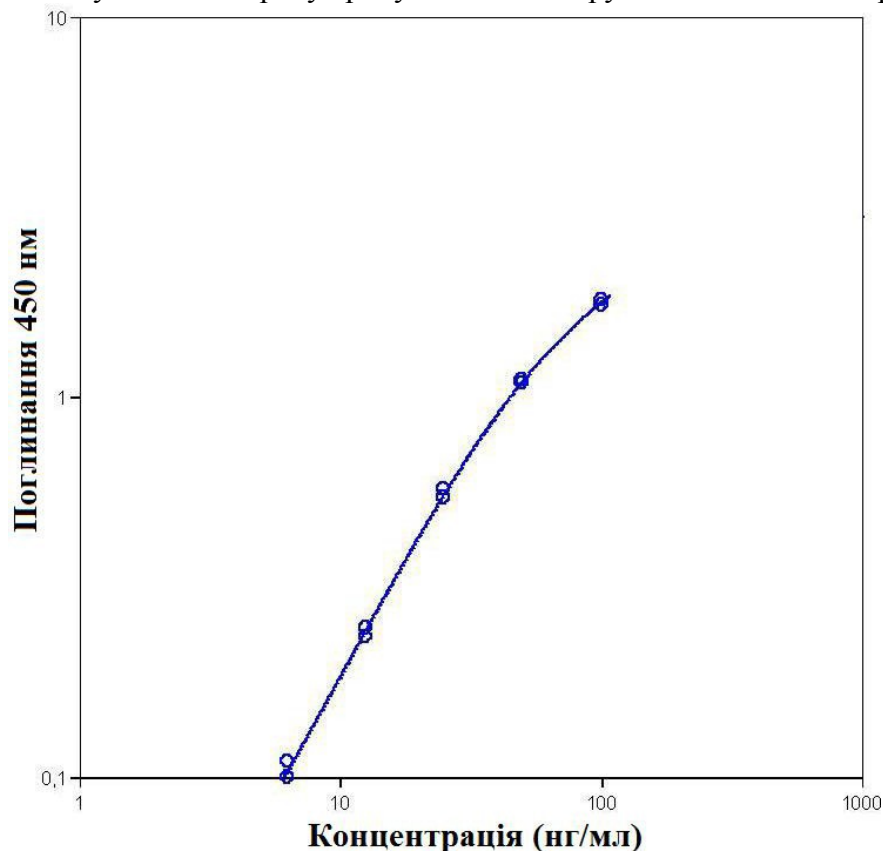
- щоб визначити концентрацію циркулюючого людського ІСАМ 1 для кожного зразка, спочатку знайдіть середню абсорбцію на ординаті і витягніть горизонтальну лінію до стандартної кривої. У точці перетину простягніть вертикальну лінію до абсциси та прочитайте відповідну концентрацію ІСАМ-1 людини.

- **Якщо інструкції в цьому протоколі були виконані, зразки були розведені 1: 10, і концентрація прочитана зі стандартної кривої повинна бути помножена на коефіцієнт розведення (x 10) .**

- **Розрахунок зразків з концентрацією, що перевищує стандарт 1, може призвести до некоректних, низьких рівнів людського ІСАМ-1 (Хук ефект). Такі зразки потребують додаткового зовнішнього попереднього розведення відповідно до очікуваних значень людського ІСАМ-1 з розчинником зразку для точного кількісного визначення фактичного рівня людського ІСАМ-1.**

- передбачається, що кожен з досліджуваних майданчиків встановлює контрольний зразок відомої концентрації ІСАМ-1 людини і проганяє цей додатковий контроль з кожним аналізом. Якщо отримані значення не знаходяться в межах очікуваного діапазону контролю, результати аналізу можуть бути недійсними.

- Репрезентативна стандартна крива показана на малюнку 7. Ця крива не може бути використана для отримання результатів тестування. Кожна лабораторія повинна підготувати стандартну криву для кожної групи аналізованих стріпів мікропланшету.



Малюнок 7 Стандартна крива

Репрезентативна стандартна крива для людського ІФА - аналізу ІСАМ-1. Людський ІСАМ-1 розбавили в серійних 2-кратних стадіях розчиннику зразка. Не використовуйте цю стандартну криву для отримання результатів тестування. Стандартна крива повинна виконуватися для кожної групи стріпів мікропланшету.

## Таблиця 2

Типові дані, що використовують ІСАМ-1 людини

ІФА. Вимірювана довжина хвилі: 450 нм

Референтна довжина хвилі: 620 нм

стандарт	Людський ІСАМ-1 концентрація (нг/мл)	ОГ при 450 нм	Середня ОЩ при 450 нм	С. V. (%)
1	100.00	1,737 1,808	1.772	2,8
2	50.00	1,114 1,087	1.101	1.7
3	25.0	0,570 0,546	0.558	3.0
4	12.5	0,247 0,235	0.241	3,5
5	6.3	0,110 0,100	0.105	6,7
бланк	0	0,004 0,006	0.005	20,0

Значення ОГ стандартної кривої можуть змінюватися залежно від умов проведення аналізу (наприклад, оператор, метод піпетування, техніка для промивки або температурні ефекти). Більше того, термін зберігання комплекту може впливати на ферментативну активність і, таким чином, на інтенсивність кольору. Вимірювані значення досі дійсні.

### 11. Обмеження

- Оскільки точні умови можуть відрізнятися від аналізу до аналізу, стандартна крива повинна бути встановлена для кожного пробігу.
- Бактеріальне або грибокве забруднення зразків екрану або реагентів або перехресне забруднення між реагентами може призвести до помилкових результатів.
- Одноразові наконечники піпетки, колби або склотари є переважними, скляна тара, що повторно використовується, повинна бути прополоскана та ретельно промита з усіма миючими засобами перед використанням.
- Неправильне або недостатнє промивання на будь-якому етапі процедури приводить до хибно-позитивних або хибно-негативних результатів. Опорожнити лунки повністю перед дозуванням свіжого миючого розчину, наповніть промивним буфером, як зазначено для кожного циклу промивки, і не дозволяйте лункам залишатись сухими протягом тривалого періоду часу.
- Застосування радіоімунотерапії значно збільшило кількість людей з людськими анти-мишачими IgG антитілами (НАМА). НАМА 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 таких аналізах, коли мишачі імуноглобуліни (сироватка, до зразка додають асцитичну рідину, або моноклональні антитіла з неактуальною специфічністю).

### 12. Характеристики виконання

#### 12.1. Чутливість.

Межа виявлення ІСАМ-1 людини, визначена як концентрація аналіту, внаслідок чого поглинання значно вище, ніж у середньому розведенні (середнє значення плюс 2 стандартних відхилення), було визначено 2,2 нг / мл (середнє значення 6 незалежних аналізів) .

## 12.2. Відтворюваність

### 12.2.1. В аналізі

Відтворюваність в аналізі оцінювали в 2 незалежних експериментах. Кожний аналіз проводили з бповторами з 8 сироваткових екземплярів, що містять різні концентрації людського ІСАМ-1. На кожній пластині запустили 2 стандартні криві. Дані нижче показують середню концентрацію ІСАМ-1 людини та коефіцієнт варіації для кожного прикладу (див. Табл. 3). Розрахований загальний коефіцієнт варіації в аналізі становив 4,1%. Таблиця 3. Середня концентрація ІСАМ-1 людини та коефіцієнт варіації для кожного зразка.

Зразок	експеримент	Середня концентрація людського ІСАМ-1 (нг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	1	330,1	7,8
	2	385,3	2,4
2	1	169,4	4,1
	2	187,3	3,4
3	1	518,9	7,2
	2	560,1	6,8
4	1	939,7	7,1
	2	1054,0	2,2
5	1	378,2	2,5
	2	404,1	4,2
6	1	318,3	2,1
	2	349,4	2,3
7	1	213,5	2,7
	2	231,3	3,3
8	1	149,6	3,4
	2	164,8	4,4

### 12.2.2. Між аналізами

Відтворюваність від аналізу до аналізу в межах однієї лабораторії оцінювали в 2 незалежних експериментах. Кожний аналіз проводили з 6 повторами з 8 сироваткових зразками, що містять різні концентрації ІСАМ-1 людини. 2 стандартні криві проганяли накожнім планшеті. Дані нижче показують, що середня концентрація ІСАМ-1 людини і коефіцієнт варіації розраховуються на 18 визначеннях кожного зразка (див. Табл. 4). Розрахунковий загальний коефіцієнт варіації між аналізами становив 7,7%.

Таблиця 4

Середня концентрація ІСАМ-1 людини та коефіцієнт варіації кожного зразка

Зразок	Середня концентрація ІСАМ-1 людини (пг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	378,3	11,1
2	184,6	7,2
3	529,1	5,1
4	934,7	8,2
5	363,2	9,6
6	323,4	7,5
7	217,7	5,8
8	154,2	6,8

### 12.3. Відновлення після збагачення.

Відновлення після збагачення оцінювалось збагаченням 4 рівнів ІСАМ-1 людини в розчиннику зразка (сироваткова матриця). Відновлення визначалося з 3 незалежними експериментами з 4 повтореннями кожен. Відновлення варіювалося від 82% до 109% при загальному середньому відновленні 99%.

### 13.4. Розведення паралелізм

Проаналізовано 4 зразка сироватки з різним рівнем ІСАМ-1 людини при послідовному 2-кратному розведенні з 4 повторами кожен.

Відновлення коливалося в межах від 80% до 120% з загальним відновленням 93% (див. Таблицю 5).

Таблиця 5

зразок	розведення	Очікувана концентрація людського ІСАМ-1 (нг/мл)	Спостерігаєма концентрація людського ІСАМ-1 (нг/мл)	Відновлення Очікуваної концентрації людського ІСАМ-1 (%)
1	1:10	-	368	-
	1:20	184	148	80
	1:40	92	82	89
	1:80	46	46	100
2	1:10	-	163	-
	1:20	82	76	93
	1:40	41	40	98
	1:80	21	17	85
3	1:10	-	530	-
	1:20	265	238	90
	1:40	133	125	94
	1:80	66	67	102
4	1:10	-	602	-
	1:20	301	296	98
	1:40	151	135	89
	1:80	75	74	99

### 13.5. Стабільність зразка

#### 13.5.1. Стабільність заморожування-відтавання.

Роздрібнені зразки сироватки (збагачені або незбагачені) зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  і відтавали 5 разів, і рівні ІСАМ-1 людини визначали. Не було виявлено істотне зниження імунореактивності людського ІСАМ-1 при заморожуванні/відтаванні.

#### 13.5.2. Стабільність зберігання

Роздрібнені зразки сироватки (збагачені або незбагачені) зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $2-8^{\circ}\text{C}$ , кімнатній температурі (КТ) і при  $37^{\circ}\text{C}$ , а рівень ІСАМ-1 людини визначався через 24, 48 і 96 год. Не спостерігалось значної втрати імунореактивності ІСАМ-1 людини, виявленої при зберіганні при вищезазначених умовах.

### 13.6 Порівняння сироватки та плазми

З 3 осіб, сироватки, а також ЕДТА, цитрат і гепарин плазми, отримані в той же час показники оцінювали. Рівні ІСАМ-1 людини істотно не відрізнялися і тому всі ці препаративні крові придатні для визначення ІСАМ-1 людини

### 13.7. Специфічність.

Вплив циркулюючих факторів імунної системи був оцінений шляхом збагачення цих білків фізіологічно релевантними концентраціями в людській позитивній сироватці ICAM-1. Не було виявлено перехресної реактивності з TNF-R (60 кДа), TNF-R (80 кДа), IL-8 / NAP-1, TNF-альфа, TNF-бета, IFN-гамма, IFN-альфа 2С, IFN омега, IL-6, IL-2R, ELAM-1 і L- селектином .

### 14 Інформація щодо замовлення

За замовленням, будь ласка,  
звертайтеся: Див останню сторінку  
Для технічної інформації звертайтеся:  
електронна адреса: [IBL@IBL-International.com](mailto:IBL@IBL-International.com)  
[www.IBL-International.com](http://www.IBL-International.com)

### 15. Підсумок підготовка реагентів

#### 15.1. Промивний буфер (1x)

Додати концентрат промивного буферу 20x (50мл) до 950мл 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 буфер аналізу концентрат 20x (5мл) до 95мл дистильованої води.

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

#### 15.3. HRP-кон'югат.

Зробіть 1: 60 розчин HRP-кон'югату в буфері аналізу (1x):

Кількість стріпів	Біотин - кон'югат (мл)	Буфер аналізу (1x) (мл)
1-6	0,03	2.97
1-12	0,06	5.94

#### 15.4 Контроль









Додайте 100 мкл дистильованої води до ліофілізованого контролю

## 16. Підсумок протокол випробувань

1. Визначте кількість необхідних стріпів мікропланшету..
2. Промийте стріпи мікропланшету двічі з промивним буфером.
3. Стандартне розведення на мікропланшеті: додайте 100мкл розчиннику зразку, у двох примірниках, до всіх стандартних лунок, залишаючи перші лунки порожніми. Прокапати по 200мкл підготовлених стандартів в перші лунки і створити стандартні розведення переносячи 100мкл з лунки в лунку. Видалити 100 мкл з останньої лунки.  
Альтернативно, зовнішнє стандартне розведення в пробірках (див. 9.4.1): прокапати 100 мкл стандартних розведень в стріпах мікропланшету.
4. Додайте 100 мкл розчинника зразків, у двох примірниках до порожніх лунок (бланк).
5. Додайте 90 мкл розріджувача зразків до лунок зразка.
6. Додають 10 мкл зразка в дублікаті, до призначених лунок зразка.
7. Приготувати HRP-кон'югат.
8. Додати 50 мкл HRP – кон'югату в усі лунки.
9. Покрийте стріпи мікропланшету і інкубуйте 2 години при кімнатній температурі (Від 18 ° до 25 ° С).
10. Опорожнити та промити стріпи мікропланшету 3 рази з промивним буфером. 11. Додайте 100 мкл ТМБ розчину субстрату в усі лунки.
11. Інкубуйте стріпи мікропланшету приблизно 10 хвилин при кімнатній температурі (від 18 до 25 ° С).
12. Додайте 100 мкл стоп розчину до всіх лунок.
13. Налаштуйте рідер мікропланшетів та вимірюйте інтенсивність кольору 450 нм.

**Примітка.** Якщо інструкції в цьому протоколі були дотримані, зразки були розведені 1: 10, концентрацію, прочитану зі стандартної кривої, потрібно помножити на Коефіцієнт розведення (x 10) .

## УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

<b>REF</b>	№ Кат.:
<b>LOT</b>	№ Партії:
	Використати до:
	Кількість тестів:
<b>CONC</b>	Концентрат
<b>LYO</b>	Ліофілізований
<b>IVD</b>	Медичний пристрій для діагностики in vitro
	Оціночний набір
	Прочитайте інструкцію перед використанням
	Зберігати подалі 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 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](mailto:info@ivset.ua) [www.ivset.ua](http://www.ivset.ua)