Інструкція для використання

IBL International GmbH
Флюгхафенштрассе
52 Гамбург D-22335

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

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

Інтерлейкін-17A ІФА

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення ІЛ-17A у сироватці та плазмі крові (цитрат, гепарин) людини, супернатанті клітинних культур.

REF **BE53171**

Σ **96**

2°C 8°C

Тільки для досліджень.
Не для використання в діагностичних процедурах.

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

Always there for you

1 Використання за призначенням

Набір для кількісного визначення ІЛ-17А людини методом твердофазного імуноферментного аналізу. Призначений тільки для дослідження. Не призначений для діагностики або терапевтичних процедур.

2 Загальна інформація

Як було нещодавно визначено, Інтерлейкін 17 належить до нового сімейства цитокінів, що має окрему систему для реалізації сигналу за ліганд-рецепторної взаємодії. Існують переконливі докази участі цитокіну в регуляції імунних реакцій.

Спочатку було охарактеризовано ІЛ-17А, а згодом описані шість членів сімейства ІЛ-17 (IL-17A-F). ІЛ-17А це гомодимерний білок ~32 кD, який в основному продукується активованими Т-лімфоцитами пам'яті, стимулює вроджений імунітет та захист організму. ІЛ-17А і ІЛ-17F мобілізують та подовжують виживання нейтрофілів, частково за рахунок стимуляції гранулопоезу та індукції хемокіну CXC. Продукування Т-лімфоцитами ІЛ-17А та ІЛ-17F регулюється шляхом активації рецепторів Т клітин, незалежним від ІЛ-23.

Класифікація Т клітин за типами Th1 і Th2 донедавна слугувала основою для розуміння біології CD4 (+)Т клітинної взаємодії між вродженим та набутим імунітетом. Недавні дослідження визначили раніше невідому ефекторну відповідь CD4(+)Т клітин, як Th17 за походженням. Існує популяція Т клітин, що виробляє ІЛ-17, який стимулює запалення і викликає розвиток важких автоімунних реакцій. Тоді як ІЛ-23 збільшує популяцію диференційованих Т(Н)-17 клітин, саме IL-6 і трансформуючий фактор росту бета (TGF-β) викликають перетворення клітин-попередників у Т(Н)-17 клітини.

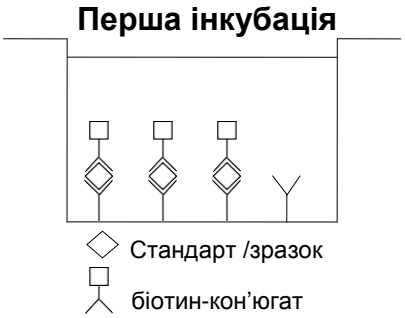
3 Принципи аналізу

Мікролунки, які вкриті адсорбованими антитілами до ІЛ-17A людини.

Рис. 1

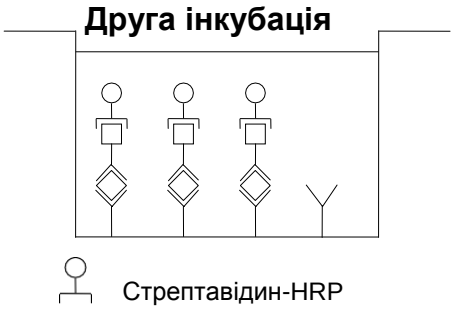
ІЛ-17A людини, присутній у зразках або стандартах, зв'язується з антитілами, які адсорбовані у мікролунках. Антитіла до ІЛ-17A людини, які кон'юговані з біотином, додаються у мікролунки і зв'язуються з білком, захопленим першими антитілами.

Рис. 2



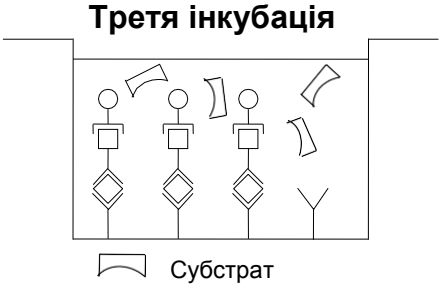
Після інкубації залишки антитіл до ІЛ-17A, кон'юговані з біотином, видаляються під час промивання. Комплекс стрептавідин-пероксидаза хрону (HRP) додається і зв'язується з біотином на антитілах до ІЛ-17A.

Рис. 3



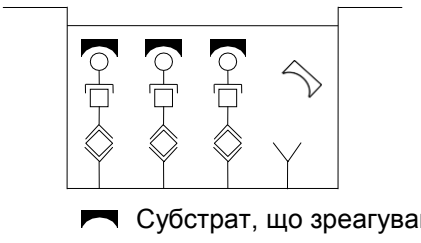
Після інкубації залишки комплексу стрептавідин-HRP видаляються під час промивання і додається розчин з субстратом для пероксидази хрону.

Рис. 4



Кольоровий продукт утворюється пропорційно кількості ІЛ-17A людини, що присутній у зразку або стандарті. Реакція зупиняється додаванням кислоти, а оптична густина вимірюється при 450 нм. Калібрувальна крива будується за допомогою 7 стандартних розведень і використовується для визначення концентрації ІЛ-17A.

Рис. 5



4 Надані реагенти

MTP	1 алюмінієвий пакет з **мікропланшетом** (12 стріпів на 8 лунок кожен), який вкритий моноклональними антитілами до ІЛ-17A людини
BIOTIN **CONC**	1 флакон (70 мкл), **Біотин-кон'югат** моноклональні антитіла до ІЛ-17A, концентрат
ENZCONJ **CONC**	1 флакон (150 мкл), **Стрептавідин-HRP,** концентрат
CAL **LYO**	2 флакона, **Стандарт** ІЛ-17A, ліофілізований, 200 пг/мл після розчинення
CONT L **LYO**	1 флакон, **Контроль Низький**, ліофілізований
CONT H **LYO**	1 флакон, **Контроль Високий**, ліофілізований
SUB	1 флакон (15 мл), **Розчин Субстрату** (ТМБ)
WASHBUF **CONC**	1 флакон (50 мл), Концентрат **Буфера для миття**, 20x (PBS з 1% Твін 20)
ASSAYBUF **CONC**	1 флакон (5мл), Концентрат **Буфера для аналізу** (на 5 мл) 20x (PBS з 1% Твін 20, 10% BSA)
STOP	1 флакон (15 мл), **Стоп розчин** (1M Фосфорна кислота)
SAMPLEDIL	1 флакон (12 мл), **Буфер для** розведення **зразків**
	4 **Клейових плівки**

5 Інструкції щодо зберігання - ІФА набору

Зберігати реагенти при 2-8 °C, за винятком контролів. Зберігайте ліофілізовані контролі при -20 °C.

Негайно після постановки аналізу, невикористані реагенти повинні бути повернуті на зберігання при 2-8 °C, або -20 °C, відповідно. Термін придатності набору і реагентів вказано на етикетках.

Термін придатності реагентів у наборі може бути гарантовано, якщо усі компоненти зберігалися належним чином, а в разі повторного використання реагенти не були забруднені при попередній постановці.

6 Збір і зберігання зразків

Супернатант клітинних культур, сироватка і плазма крові (цитрат, гепарин) були протестовані за допомогою цього набору. Інші біологічні зразки також можуть бути придатними для аналізу. Видаліть сироватку від згустку або плазму від клітин якомога швидше після приготування зразків крові. Зразки треба очистити від видимого осаду перед аналізом. Не використовуйте надто гемолізовані або ліпідемічні зразки.

Для тривалого зберігання зразки необхідно розділити на аліквоти і заморозити при -20 °C, що дозволить уникнути втрати біоактивного ІЛ-17A. Якщо зразки потрібно аналізувати протягом 24 годин, їх можна зберігати при 2-8 °C (дивіться також «13,5 Стабільність зразків»).

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

7 Необхідні додаткові матеріали

- калібровані піпетки на 5 мл і 10 мл
- одноканальні мікропіпетки від 5 мкл до 1000 мкл, з одноразовими наконечниками
- багатоканальні мікропіпетки від 50 мкл до 300 мкл, з одноразовими наконечниками
- Мензурки, колби і циліндри, необхідні для підготовки реагентів
- Пристрій для миття мікропланшетів (багатоканальна пляшка для миття або автоматична мийка)
- Рідер мікропланшетів для вимірювання оптичної густини при 450 нм (620 нм як додаткової)
- Дистильована в склі або дейонізована вода
- Статистичний калькулятор з програмою для виконання регресійного аналізу

8 Запобіжні заходи для використання

- Всі реагенти потрібно розглядати як потенційно небезпечні. Тому ми рекомендуємо, щоб цей набір використовували працівники, яки навчені лабораторним методам, і відповідно до принципів належної лабораторної практики. Використовуйте захисний одяг, такий як лабораторний костюм, окуляри і рукавички. Необхідно дотримуватися обережності, щоб уникнути контакту зі шкірою або очима. У разі потрапляння на шкіру або в очі, негайно промити місце контакту водою. Для отримання конкретних рекомендацій дивіться лист(и) безпеки на матеріали з набору.
- Реагенти призначені тільки для дослідження, не використовувати для діагностичних або терапевтичних процедур.
- Не змішуйте та не використовуйте реагенти з різних партій або інших джерел.
- Не використовуйте реагенти з набору після закінчення строку придатності, що вказаний на етикетці.
- Уникайте впливу яскравого світла на реагенти з набору під час зберігання або інкубації.
- Не піпетуйте ротом.
- Не їжте і не паліть там, де обробляються реагенти або зразки.
- Уникайте контакту реагентів з набору або зразків зі шкірою або слизовими оболонками.
- Гумові або одноразові латексні рукавички потрібно використовувати для роботи з реагентами або зразками.
- Уникайте контакту розчину субстрату з окислювачами та металом.
- Уникайте бризок або утворення аерозолів.
- Уникати мікробного зараження або перехресного забруднення реагентів або зразків, це може призвести до неправильних результатів аналізу, використовуйте одноразові наконечники для піпеток.
- Використовуйте чисті, спеціальні ємності для реагентів та дозування кон’югату і субстрату.
- Вплив кислоти інактивує кон’югат.
- Дистильована в склі або дейонізована вода повинні використовуватися для розведення реагентів.
- Розчин субстрату повинен бути кімнатної температури перед використанням.
- Дезактивуйте та утилізуйте зразки як потенційно заражені матеріали, оскільки вони можуть містити збудники інфекції. Кращий спосіб дезактивації є автоклавування 1 год при 121.5 °C.
- Рідкі відходи, що не містять кислоту і нейтралізовані відходи, можуть бути змішані з гіпохлоритом натрію таким чином, щоб суміш містила до 1,0 % гіпохлориту натрію. Достатньо витримати суміш 30 хв для ефективної дезінфекції. Рідкі відходи, які містять кислоту, потрібно нейтралізувати перед додаванням гіпохлориту натрію.

9 Підготовка реагентів

1. Концентрати буферних розчинів треба довести до кімнатної температури і розбавляти на початку процедури аналізу.
2. Якщо у Концентратах буферних розчинів утворилися кристали, їх необхідно трохи підігріти до повного розчинення.

9.1 Буфер для миття (1x)

1. Налийте весь вміст (50 мл) Концентрату Буфера для миття (20x) у чисту градуйовану колбу на 1000 мл. Доведіть дистильованою в склі або дейонізованою водою загальний об'єм у колбі до 1000 мл.
2. Змішуйте поволі, щоб уникнути піноутворення.
3. Перенесіть Буфер для миття до чистої ємності і зберігайте при температурі 2-25 °C. Буфер для миття (1x) стабільний протягом 30 днів.
4. Буфер для миття (1x) можна також готувати по мірі необхідності, згідно наступної таблиці:

Кількість стрипів	Концентрат буфера для миття (20x) (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

9.2 Буфер для аналізу (1x)

1. Налийте весь вміст (5 мл) Концентрату Буфера для аналізу (20x) у чисту градуйовану колбу на 100 мл. Розведіть дистильованою водою до кінцевого об'єму 100 мл.
2. Змішуйте поволі, щоб уникнути піноутворення.
3. Зберігайте при температурі 2-8 °C. Буфер для аналізу (1x) стабільний протягом 30 днів.
4. Буфер для аналізу (1x) можна також готувати по мірі необхідності, згідно наступної таблиці:

Кількість стрипів	Концентрат Буфера для аналізу (20x) (мл)	Дистильована вода (mL)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

- **Біотин – кон'югат**

Примітка: Біотин-кон'югат має бути використаний протягом 30 хвилин після розбавлення.

Зробіть розбавлення, 1:100, концентрату Біотин-кон'югату, використовуючи Буфер для аналізу (1x), в чистій пластиковій пробірці по мірі необхідності, згідно наступної таблиці:

Кількість стріпів	Біотин-кон'югат (мл)	Буфер для аналізу (1x) (мл)
1 - 6	0.03	2.97
1 - 12	0.06	5.94

- **Стрептавідін-HRP**

Примітка: Стрептавідін-HRP має бути використаний протягом 30 хвилин після розбавлення.

Зробіть розбавлення, 1:200, концентрату Стрептавідін-HRP, використовуючи Буфер для аналізу (1x) у чистій пластиковій пробірці по мірі необхідності, згідно наступної таблиці:

Кількість стріпів	Стрептавідін-HRP (мл)	Буфер для аналізу (1x) (мл)
1 - 6	0.03	5.97
1 - 12	0.06	11.94

- **Стандарт ІЛ-17A людини**

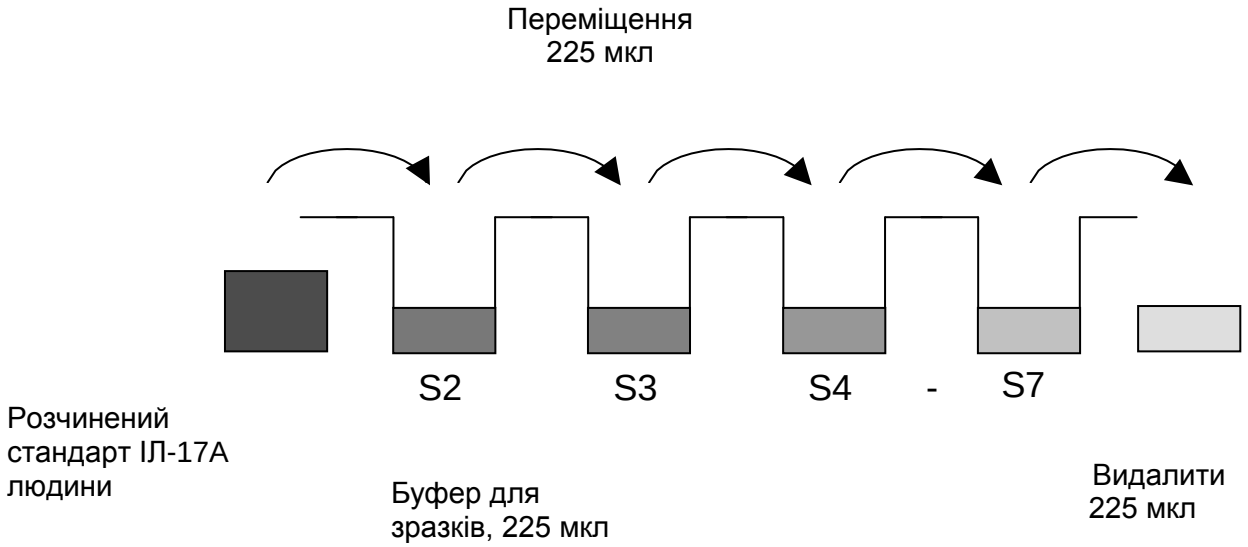
1. Розчиніть стандарт IL-17A людини після додавання дистильованої води.
2. Кінцевий обєм вказано на етикетці флакону. Обережно перемішуйте розчин у флаконі до повного розчинення (концентрація розчиненого стандарту IL-17A людини = 200 пг/мл).
3. Витримайте розчинений стандарт протягом 10-30 хв. Перемішайте додатково перед наступним розбавленням.

Стандарт має бути негайно використаний після розчинення і не може зберігатися.

9.5.1 Зовнішнє стандартне розведення

1. Промаркуйте 7 пробірок, по одній для кожного розбавлення: S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7.
2. Проведіть серійні розведення, 1:2, для побудови калібрувальної кривої, наступним чином: Внесіть по 225 мкл Буфера для зразків у кожну пробірку.
3. Внесіть 225 мкл розчиненого стандарту (концентрація = 200 пг/мл) у першу пробірку, яка маркована S1 і перемішайте (концентрація стандарту 1 в S1 = 100 пг/мл).
4. Перенесіть 225 мкл з цього розбавлення у другу пробірку, яка маркована S2, і перемішайте перед наступним переміщенням.
5. Повторіть серійні розведення 5 разів, щоб отримати усі точки калібрувальної кривої (дивіться на Рис. 6). Розчинник Буфер для зразків є бланком.

Рис. 6



- **Контролі**

Розчиніть ліофілізовані контролі шляхом додавання дистильованої води (10-30 хвилин). Кінцевий об’єм вказано на етикетці флакона. Обережно перемішайте, щоб гарантувати повне розчинення. Далі використовуйте контролі як зразки для аналізу.
Для уточнення значення діапазону контроля, будь ласка, зверніться до сертифікату аналізу. Зберігайте розчинені контролі в аліквотах при -20 °C. Уникайте повторного заморожування-розморожування контролів.

10 Протокол аналізу

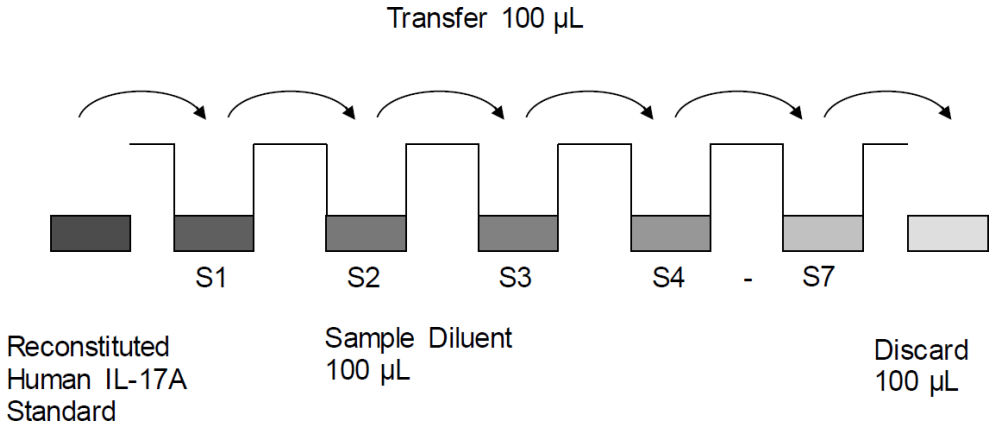
Примітка: У разі інкубації без струшування отримані значення оптичної густини (ОГ) можуть бути нижче, ніж зазначено. Тим не менш, результати аналізу залишаються дійсними.

a. Визначте кількість стріпів з мікролунками, які потрібні для аналізу бажаної кількості зразків, а також бланків, стандартів і контролів. Кожен зразок, стандарт, бланк і контролі повинні аналізуватися у дублікатах. Видаліть зайві стріпи з тримача та зберігайте їх у щільно закритому пакеті з осушувачем при температурі 2-8 °C.

b. Промийте мікролунки двічі Буфером для миття, приблизно по 400 мкл на лунку, з повною аспірацією рідини після промивання. Витримуйте лунки з Буфером для миття приблизно 10-15 сек до аспірації. Будьте обережні, щоб не подряпати поверхню мікролунок. Після останнього кроку миття, опорожніть лунки і притуліть їх до абсорбуючої поверхні паперу, щоб видалити залишки Буфера для миття. Використовуйте мікролунки негайно після миття. Крім того, стріпи з мікролунками можна розмістити догори дном на вологому гігроскопічному папері, але не довше ніж на 15 хвилин. Не дозволяйте лункам висихати.

c. Серійне розведення стандартів у мікропланшеті (альтернатива розведенню у пробірках, див. «Зовнішнє стандартне розведення».):
Додайте по 100 мкл Буфера для зразків у дублікатах в усі лунки для стандартів. Внесіть 100 мкл розчиненого стандарту (див. «Стандарт ІЛ-17A людини», концентрація = 200,0 пг/мл), у дублікатах у лунки A1 і A2 (див. Таблицю 1). Перемішайте вміст лунок A1 і A2 шляхом повторної аспірації і заповненням (концентрація стандарту 1, S1 = 100,0 пг/мл). Перемістить по 100 мкл до лунок B1 і B2, відповідно (дивиться на Рис. 7). Будьте обережні, щоб не подряпати внутрішню поверхню лунок. Продовжуйте процедуру 5 разів, щоб отримати два ряди лунок з розведеннями стандарту ІЛ-17A людини в межах від 100,0 до 1,6 пг/мл. Видаліть по 100 мкл з останніх використаних лунок (G1, G2).

Рис. 7. Розведення стандартів у мікропланшеті.



У разі зовнішнього стандартного розведення ("9.5.1. Зовнішнє стандартне розведення"), перенесіть по 100 мкл стандартних розведень (S1-S7) у лунки для стандартів, згідно Таблиці 1.

Таблиця 1: Приклад розміщення бланків, стандартів і зразків у стріпах з мікролунками.

	1	2	3	4
A	Стандарт 1 100,0 пг/мл	Стандарт 1 100,0 пг/мл	Зразок 1	Зразок 1
B	Стандарт 2 50,0 пг/мл	Стандарт 2 50,0 пг/мл	Зразок 2	Зразок 2
C	Стандарт 3 25,0 пг/мл	Стандарт 3 25,0 пг/мл	Зразок 3	Зразок 3
D	Стандарт 4 12,5 пг/мл	Стандарт 4 12,5 пг/мл	Зразок 4	Зразок 4
E	Стандарт 5 6,3 пг/мл	Стандарт 5 6,3 пг/мл	Зразок 5	Зразок 5
F	Стандарт 6 3,1 пг/мл	Стандарт 6 3,1 пг/мл	Зразок 6	Зразок 6
G	Стандарт 7 1,6 пг/мл	Стандарт 7 1,6 пг/мл	Зразок 7	Зразок 7
H	Бланк	Бланк	Зразок 8	Зразок 8

d. Додайте 100 мкл Буфера для зразків у лунки бланків.

e. Додайте 50 мкл Буфера для зразків у лунки зразків.

f. Додайте 50 мкл кожного зразка у дублікатах у лунки зразків.

g. Приготуйте розчин Біотин-кон'югату (див. "9.3. Біотин-кон'югат ").

h. Додайте 50 мкл розчину Біотин-кон'югату в усі лунки.

i. Накрийте заповнені лунки клейовою плівкою і інкубуйте при кімнатній температурі (18-25 °C) протягом 2 год, струшувати на шейкері для мікропланшетів.

j. Підготуйте Стрептавідин-HRP (див. "9.4. Стрептавідін-HRP ").

k. Видаліть клейову плівку і опорожніть лунки. Промийте лунки 4 рази. Продовжуйте рухатися до наступного кроку, без затримок.

l. Додайте 100 мкл розбавленого Стрептавідіна-HRP в усі лунки, включно з лунками для бланків.

m. Накрийте лунки клейовою плівкою і інкубуйте при кімнатній температурі (18-25 °C) протягом 1 год, струшувати на шейкері для мікропланшетів.

n. Видаліть клейову плівку і опорожніть лунки. Промийте лунки 4 рази. Продовжуйте рухатися до наступного кроку, без затримок.

o. Додайте 100 мкл Розчину субстрату (ТМБ) в усі лунки.

p. Інкубуйте мікропланшет при кімнатній температурі (18-25 °C) протягом приблизно 10 хв. Уникайте впливу прямого інтенсивного світла.

   Розвиток забарвлення в лунках можна перевіряти, а реакція повинна бути зупинена (див. наступний крок цього протоколу), перш ніж позитивні лунки стають занадто забарвлені. Визначення достатнього періоду часу для розвитку забарвлення необхідно робити індивідуально для кожної постановки аналізу.

   Рекомендується додавати Стоп розчин тоді, коли найвищий Стандарт набуває темно-синього кольору. Крім того, розвиток забарвлення можна перевіряти на рідері для мікропланшет при 620 нм. Реакція повинна бути зупинена, як тільки ОГ Стандарту 1 досягне 0.9 - 0.95.

q. Зупиніть ферментну реакцію шляхом додавання 100 мкл Стоп розчину у кожну лунку. Важливо, щоб Стоп розчин був внесений швидко і однаково в усі лунки для повної інактивації ферменту. Результати можна прочитати негайно після того, як додали Стоп розчин, або протягом 1 год, якщо мікропланшет зберігати при температурі 2-8 °C у темряві.

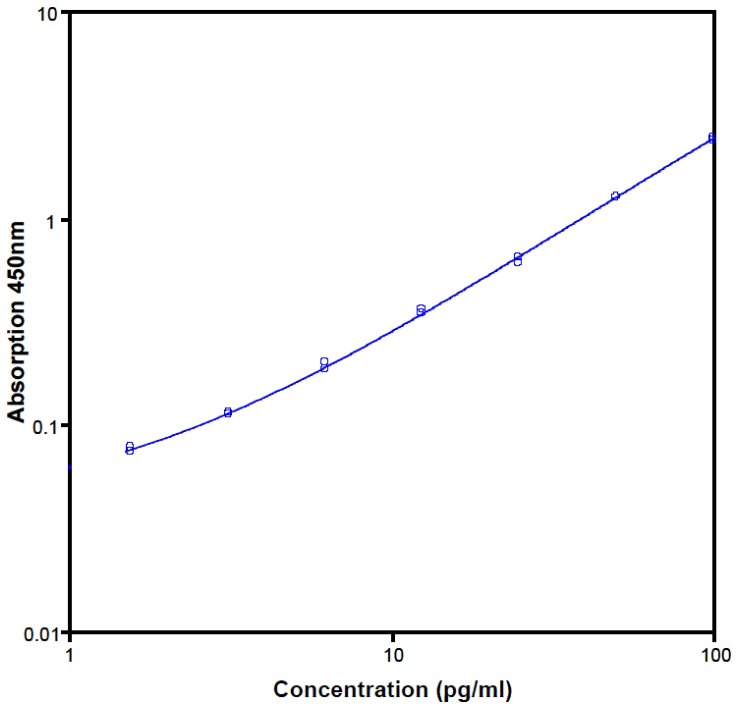
r. Поміряйте оптичну густину у кожній лунці на спектрофотометрі при 450 нм в якості основної довжини хвилі (використовуйте 620 нм як референтну довжину хвилі; прийнятний інтервал 610 - 650 нм). За допомогою лунок «бланк» налаштуйте показник «нуля» на рідере для мікропланшетів, згідно з інструкціями виробника. Визначте поглинання усіх зразків і стандартів.

11 Обчислення результатів

- Вирахуйте середні значення ОГ для всього набору стандартів і зразків. Дублікати не повинні відрізнятися більш ніж на 20% від середнього значення.
- Побудуйте калібрувальну криву шляхом нанесення середніх значень ОГ для кожної стандартної концентрації на осі ординат (Y), а концентрації ІЛ-17А людини на осі абсцисс (X). Проведіть криву через отримані точки на графіку (для проведення компьютерних розрахунків рекомендується застосовувати криву з 5 параметрами, 5 PL).
- Щоб визначити концентрацію ІЛ-17А людини у кожному зразку, спочатку знайдіть середнє значення ОГ на осі ординат і проведіть горизонтальну лінію до перетину з калібрувальною кривою. У точці перетину прокладіть вертикальну лінію до осі абсцис і визначте відповідну концентрацію ІЛ-17А.
- Якщо слідувати інструкціям цього протоколу треба враховувати, що зразки були розбавлені 1:2 (50 мкл зразку + 50 мкл Буфер для зразків), тому концентрація, яка визначена за допомогою калібрувальної кривої, повинна бути помножена на коефіцієнт розведення (x 2).
- Обчислення концентрації у зразках, ОГ яких перевищує Стандарт 1 може призвести до неправильних результатів, низького рівня ІЛ-17А. Такі зразки потребують додаткового попереднього розведення Буфером для зразків.
- Кількісно визначте фактичний рівень ІЛ-17А людини.
- Пропонуємо, на початку тестування кожного набору самостійно долучити окремий контрольний зразок з відомою концентрацію ІЛ-17А та використовувати цей додатковий контроль у кожній наступній постановці аналізу. Якщо значення цього контролю виходить за межи очікуваного діапазону, результати аналізу можуть бути недійсними.
- Типову калібрувальну криву показано на Рис. 8.
- Примітка: Не використовуйте цю калібрувальну криву, для розрахунків результатів. Кожна лабораторія повинна власноруч підготувати калібрувальну криву до кожного ІФА набору.

Рис. 8

Типова калібрувальна крива для визначення концентрації ІЛ-17А людини. Стандарт ІЛ-17А людини був послідовно розбавлений Буфером для зразків (серійне 2-кратне розведення).



Таблиця 2
Типові дані, які отримані при використанні ІФА набору для ІЛ-17А людини.
Вимірювання проводили на довжині хвилі: 450 нм
Додаткова довжина хвилі: 620 нм

Стандарт	Концентрація ІЛ-17А людини (пг/мл)	ОГ при 450 нм	Середня ОГ при 450 нм	C.V. (%)
1	100.0 100.0	2.362 2.458	2.377	2.0
2	50.0 50.0	1.263 1.260	1.228	0.1
3	25.0 25.0	0.644 0.610	0.594	2.7
4	12.5 12.5	0.364 0.345	0.321	2.8
5	6.3 6.3	0.198 0.185	0.159	3.6
6	3.1 3.1	0.112 0.115	0.080	1.3
7	1.6 1.6	0.074 0.078	0.043	2.2
Бланк	0.0 0.0	0.034 0.035	0.035	1.2

Значення ОГ і параметри калібрувальної кривої можуть змінитися згідно з умовами аналізу (наприклад, оператор, техніка дозування, техніка промивання або температурні ефекти). Крім того, на ферментативну активність і відповідно інтенсивність забарвлення, може впливати термін придатності набору. Значення вимірювання залишаються дійсними.

12 Обмеження

- Оскільки умови проведення тестування можуть змінюватися від аналізу до аналізу, калібрувальна крива повинна бути побудована для кожної постановки.
- Бактеріальне або грибкове забруднення зразків або реагентів, а також перехресне забруднення реагентів може викликати помилкові результати.
- Надають перевагу одноразовим наконечникам і посуду. Скляний посуд багаторазового використання неохідно вимити і ретельно ополоснути від будь-яких детергентів.
- Невідповідне або недостатнє промивання на будь-якій стадії процедури може призводити до хибнопозитивних або хибнонегативних результатів. Опорожніть лунки повністю перш ніж вносити новий розчин для миття, заповніть лунки Буфером для миття, як належить для кожного циклу миття і не дозволяйте лункам бути непокритими або сухими протягом тривалого часу.
- Використання радіоімунотерапії значно збільшило кількість зразків, які можуть містити антитіла проти IgG миші (ХАМА). ХАМА впливатиме на результати аналізу, якщо у ІФА наборі використані моноклональні антитіла миші, це призводить до хибнонопозитивних або хибнонегативних результатів. Зразки сироватки, які містять антитіла до імуноглобулінів миші, також можуть бути протестовані за допомогою спеціальної процедури, коли імуноглобуліни миші (сироватка, асцитна рідина або антитіла іншої специфічності) додаються до зразка.

13 Характеристики виконання

13.1 Чутливість

Межею виявлення ІЛ-17А людини визначено ту концентрацію, яка при проведенні аналізу дає ОГ значно вищу, ніж «бланк» або Буфер для розведення зразків (середнє значення плюс 2 стандартних відхилення), становить 0,5 пг/мл (середнє значення для 6 незалежних проб).

13.2 Відтворення

13.2.1 В аналізі

Відтворюваність в аналізі була оцінена у 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз був виконаний з 6 повторами, і 6 серологічними зразками, які містять різні концентрації ІЛ-17А людини. Дві калібрувальні криві були побудовані на кожному планшеті. Дані нижче показують середні значення концентрації ІЛ-17А людини і коефіцієнт мінливості для кожного зразка (див. таблицю 3). Розрахунковий повний коефіцієнт мінливості в аналізі становив 7,1%.

Таблиця 3: середня концентрація IL-17A людини і коефіцієнт мінливості для кожного зразка.

Зразок	Експеримент	Середня концентрація (пг/мл)	Коефіцієнт мінливості (%)
1	1	59.0	3.9
	2	55.6	4.5
	3	59.6	6.5
2	1	64.2	5.9
	2	53.7	4.9
	3	60.0	6.0
3	1	27.2	3.0
	2	24.0	6.1
	3	27.8	5.2
4	1	29.6	4.7
	2	24.9	11.2
	3	26.6	10.9
5	1	16.6	4.4
	2	14.1	10.3
	3	15.5	11.4
6	1	18.5	6.6
	2	13.3	11.1
	3	14.9	10.7

13.2.2 Між аналізами

Відтворення від аналізу до аналізу в одній лабораторії було оцінено у 3 незалежних експериментах. Кожна постановка була виконана у 6 повторах, із 6 серологічними зразками, які містять різні концентрації ІЛ-17А людини. Дві калібрувальні криві були побудовані на кожному планшеті.
Дані нижче показують середні значення концентрації ІЛ-17А людини і коефіцієнт мінливості, обчислений для 18 визначень кожного зразка. Розрахунковий повний коефіцієнт мінливості між аналізами становив 9,1%.

Таблиця 4
Середня людська концентрація IL-17A і коефіцієнт мінливості кожного зразка

Зразок	Середня концентрація (пг/мл)	Коефіцієнт мінливості (%)
1	58.0	3.7
2	59.3	8.9
3	26.3	7.9
4	27.0	8.8
5	15.4	8.3
6	15.6	17.2

13.3 Ступінь вилучення

Визначення методом стандартної добавки або ступінь вилучення проводили шляхом введення 4 різних концентрацій ІЛ-17А людини у сироватку, плазму і зразки супернатанту клітинної культури. Ступінь вилучення досліджували у 3 незалежних експериментах з 4 повторами для кожного рівня концентрації. Незбагачені зразки сироватки, плазми і супернатанта клітинної культури використовувався в якості бланка у цих експериментах. Повне середнє вилучення у серологічних зразках становило 107,0%, у зразках плазми (гепарин) 50,8% і плазми (цитрат) 75,5%, у зразках супернатанту клітинної культури 113,6%.

13.4 Паралелізм розбавлення

Сироватка, плазма і зразки супернатанту клітинної культури з різними рівнями концентрації ІЛ-17А людини були проаналізовані після послідовного 2-кратного розбавлення у 4 повторах для кожного. Ступінь вилучення у серологічних зразках коливалася від 76.9-112.3% з повним вилученням 101,5%.

Повне середнє вилучення у зразках плазми становило 107,8%, а у зразках супернатанту клітинної культури 81,6%.

Таблиця 5 Паралелізм розбавлення

Зразок	Розбавлення	Концентрація ІЛ-17А людини (пг/мл)		Вилучення, очікувані значення (%)
		Очікуване значення	Отримане значення	
1	1	–	47.6	–
	2	23.8	24.6	103.4
	4	12.3	12.8	103.7
	8	6.4	5.6	88.3
2	1	–	42.0	–
	2	21.0	22.3	106.0
	4	11.2	12.2	109.1
	8	6.1	5.9	96.2
3	1	–	9.4	–
	2	4.7	5.3	111.2
	4	2.6	2.5	96.6
	8	1.3	1.0	76.9
4	1	–	63.2	–
	2	31.6	35.5	112.3
	4	17.8	19.1	107.5
	8	9.5	10.2	106.4

13.5 Стабільність ЗРАЗКА

13.5.1 Стабільність в умовах розморожування-заморожування

Певна кількість збагачених серологічних зразків зберігалася при -20 °C і була розморожена 5 разів для визначення рівня концентрації ІЛ-17А людини. У цих умовах заморожування і розморожування не було виявлено жодної значної втрати імунореактивності ІЛ-17А людини.

13.5.2 Стабільність під час зберігання

Певна кількість збагачених серологічних зразків зберігалася при -20 °C, при 2-8 ° C, при кімнатній температурі і при 37 °C, а рівень концентрації ІЛ-17А людини визначали через 24 год. У цих умовах не було виявлено жодної значної втрати імунореактивності ІЛ-17А людини.

13.6 Специфічність

Вплив циркулюючих імунних комплексів оцінювали після збагачення зразків сироватки відповідними білками у фізіологічних концентраціях. Будь-якої перехресної реактивності не було виявлено.

14 Резюме підготовка реагентів

14.1 Буфер для миття (1x)

Додайте Концентрат Буфера для миття 20x (50 мл) до 950 мл дистильованої води.

Кількість стріпів	Концентрат Буфера для миття (мл)	Дистильована вода (mL)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

14.2 Буфер для аналізу (1x)

Додайте Концентрат Буфера для аналізу 20x (5 мл) до 95 мл дистильованої води.

Кількість стріпів	Концентрат Буфера для аналізу (мл)	Дистильована вода (mL)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

14.3 Біотин-кон'югат

Зробіть розбавлення 1:100, Біотин-кон'югату у Буфері для зразків (1x):

Кількість стріпів	Біотин-кон'югат (мл)	Буфер для зразків (1x) (мл)
1 - 6	0.03	2.97
1 - 12	0.06	5.94

14.4 Стрептавідін-HRP

Зробіть розбавлення 1:200, Стрептавідіна-HRP у Буфері для аналізу (1x):

Кількість стрипів	Стрептавідін-HRP (мл)	Буфер для аналізу (1x) (мл)
1 - 6	0.03	5.97
1 - 12	0.06	11.94

14.5 Стандарт ІЛ-17A людини

Розчиніть ліофілізований Стандарт ІЛ-17A людини у дистильованій воді. Обсяг відновлення вказано на етикетці флакону.

14.6 Контролі

Розчиніть ліофілізовані Контролі у дистильованій води (10-30 хвилин). Обсяг відновлення вказано на етикетці флаконів.

15 Резюме протоколу аналізу

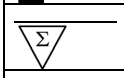
Примітка: Якщо слідувати інструкції до цього протоколу, зразки були розбавлені 1:2 (50 мкл зразка + 50 мкл розчинника), тоді значення концентрації, яке було визначено за калібрувальною кривою, треба помножити на коефіцієнт розведення (x 2).

1. Визначте кількість потрібних стріпів з мікролунками .
2. Промийте мікролунки двічі Буфером для миття.
3. Стандартне розведення у мікропланшеті: Додайте 100 мкл Буфера для зразків, у дублікатах, до усіх лунок для стандартів. Внесіть розчинений Стандарт 100 мкл у перші лунки і проведіть стандартне розведення (2-кратне) шляхом переносу по 100 мкл з лунки до лунки. Видаліть по 100 мкл з останніх лунок.

   Альтернативно, зовнішнє стандартне розведення у пробірках (див. "9.5.1. Зовнішнє стандартне розведення "): Піпетуйте по 100 мкл цих стандартних розведень у відповідні мікролунки.
4. Додайте 100 мкл Буферу для зразків у дублікатах до лунок бланків.
5. Додайте 50 мкл Буферу для зразків у лунки зразків.
6. Додайте 50 мкл зразків, у дублікатах, до лунок зразків.
7. Підготуйте Біотин-кон’югат.
8. Додайте 50 мкл Біотин-кон’югата до усіх лунок.
9. Покрийте плівкою стріпи з мікролунками, інкубуйте 2 год при кімнатній температурі (18-25 °C).
10. Підготуйте Стрептавідин-HRP.
11. Опорожніть і промийте стріпи з мікролунками 4 рази з Буфером для миття.
12. Додайте 100 мкл розбавленого Стрептавидин-HRP.
13. Покрийте плівкою стріпи з мікролунками, інкубуйте 1 год при кімнатній температурі (18-25 °C).
14. Опорожніть і промийте стріпи з мікролунками 4 рази з Буфером для миття.
15. Додайте 100 мкл Розчину Субстрату до усіх лунок.
16. Інкубуйте стріпи з мікролунками приблизно 10 хв при кімнатній температурі (18-25 °C).
17. Додайте 100 мкл Стоп розчину до усіх лунок.
18. Налаштуйте рідер для мікропланшетів і виміряйте інтенсивність забарвлення при 450 нм.

Примітка: За інформацією о реагентах і хімікатах від інших виробників, зв'яжіться з виробником.

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

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

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

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

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

IBL International GmbH
Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург, Німеччина
Тел .: + 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11
E-MAIL: IBL@IBL-International.com
WEB: http://www.IBL-International.com

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

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

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

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

Always there for you