



**Інструкція по  
використанню**

# ІФА sVEGF-R1

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення розчинного VEGF-R1 у супернатанті культури клітин людини, сироватці, плазмі та інших біологічних зразках.

REF

**BE59131**



**1 x 96**



2°C / 8°C

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



**IBL international**

Flughafenstrasse 52a  
D-22335 Гамбург, Німеччина  
International.com

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

**GMBH**

IBL@IBL-International.com  
www.IBL-

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)

Always there for you



## 1 Використання за призначенням

ІФА VEGF-R1 людини — це імуноферментний аналіз для кількісного виявлення VEGF-R1 людини. Тільки для дослідницького використання. Не для діагностичних чи терапевтичних процедур.

## 2 Загальна інформація

Розчинний VEGF-R1 (sFLT-1) є природною ендогенною формою VEGF-R1 і спочатку був знайдений у супернатанті ендотеліальних клітин судин людини. Він утворюється диференціальним сплайсингом гена *flt-1*. *In vitro* VEGF-R1 використовується для інгібування сигналів, опосередкованих VEGF-A, в ендотеліальних клітинах, а *in vivo* його можна використовувати для блокування фізіологічного ангиогенезу в кількох органах, наприклад, в яєчнику або в кістках. Пухлинні клітини, трансфіковані геном *flt-1*, мають обмежений ріст *in vivo* через обмеження розвитку кровоносних судин пухлини через передачу сигналів VEGF-A. Останні дослідження показали, що ця молекула присутня ендогенно в концентраціях нг/мл у біологічних рідинах здорових людей або в кондиціонованих середовищах FLT-1 позитивних типів клітин.

## 3 Принципи аналізу

Антитіло, що покриває VEGF-R1 людини, адсорбується на мікролунки.

VEGF-R1 людини, присутній у зразку або стандарті, зв'язується з антитілами, адсорбованими в мікролунках. Антитіло проти VEGF-R1 людини, кон'юговане з біотином, додається та зв'язується з VEGF-R1 людини, захопленим першим антитілом.

Після інкубації незв'язане з біотином антитіло проти VEGF-R1 людини видаляють під час етапу промивання. Додається стрептавідин-HRP, який зв'язується з біотин-кон'югованим антитілом проти VEGF-R1 людини.

Після інкубації незв'язаний стрептавідин-HRP видаляється під час етапу промивання, і розчин субстрату реагує з HRP додається в лунки.

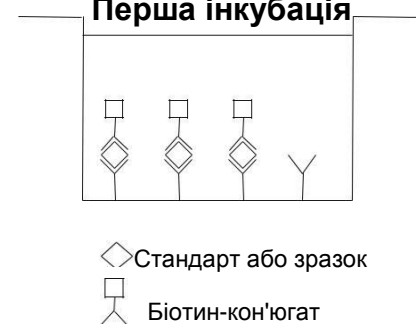
Малюнок 1

### Мікролунка з покриттям



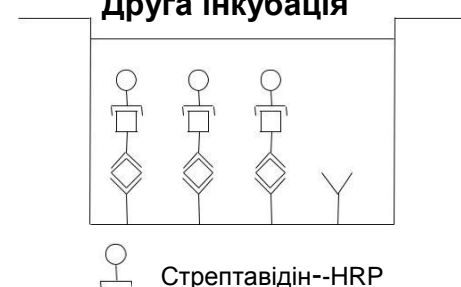
малюнок 2

### Перша інкубація



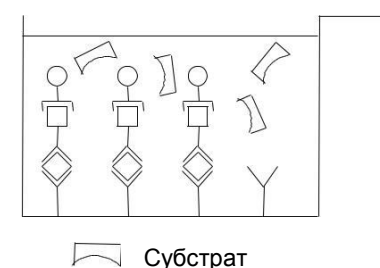
малюнок 3

### Друга інкубація



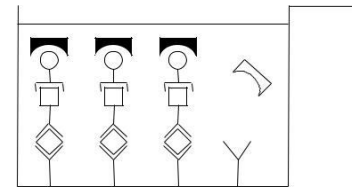
малюнок 4

### Третя інкубація



Кольоровий продукт утворюється пропорційно до кількості VEGF-R1 людини, присутнього у зразку або стандарті. Реакцію припиняють додаванням кислоти та вимірюють поглинання при 450 нм. Стандартну криву готують із 7 стандартних розведень VEGF-R1 людини та визначають концентрацію зразка VEGF-R1 людини.

малюнок 5



Субстрат, що прореагував

#### 4 . Реагенти в наборі

<b>MTP</b>	1 алюмінієвий пакет із мікропланшетом, покритим моноклональним антитілом до VEGF-R1 людини
<b>BIOTIN</b> <b>CONC</b>	1 флакон (70 мкл) поліклонального антитіла до VEGF-R1 людини з біотин-кон'югатом
<b>ENZCONJ</b> <b>CONC</b>	1 флакон (150 мкл) Streptavidin-HRP
<b>CAL</b> <b>LYO</b>	2 флакони людського стандарту VEGF-R1, ліофілізованого, 20 нг/мл після розчинення
<b>SUBS</b>	1 флакон (15 мл) розчину субстрату (тетраметилбензидин)
<b>WASHBUF</b> <b>F</b> <b>CONC</b>	1 пляшка (50 мл) концентрату промивного буфера 20x (PBS з 1% Tween 20)
<b>STOP</b>	1 флакон (15 мл) стоп-розчину (1M фосфорної кислоти)
<b>CONJDIL</b>	1 флакон (20 мл) розчинника кон'югату
<b>ASSAYBUF</b> <b>CONC</b>	1 флакон (5 мл) концентрату буфера для аналізу 20x (PBS з 1% Tween 20, 10% BSA) 4 клейкі плівки

#### 5 Інструкції щодо зберігання – набір ІФА

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

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

#### 6 Інструкції щодо збору та зберігання зразків

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

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

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

Зразки слід розділити на аліквоти та зберігати в замороженому стані при -20°C, щоб уникнути втрати біоактивного VEGF-R1 людини. Якщо зразки потрібно перевірити протягом 24 годин, їх можна зберігати при температурі від 2 °C до 8 °C (стабільність зразка див. у 13.5).

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

**7 Необхідні матеріали, але не надаються**

Градуйовані піпетки на 5 мл і 10 мл

Регульовані одноканальні мікропіпетки від 5 мкл до 1000 мкл з одноразовими наконечниками. Регульовані багатоканальні мікропіпетки від 50 мкл до 300 мкл з одноразовими наконечниками

Багатоканальний резервуар мікропіпетки

Стакани, колби, циліндри, необхідні для приготування реактивів

Пристрій для подачі промивного розчину (багатоканальний промивний флакон або автоматична промивна система)

Рідер мікролуночних стріпів, здатний зчитувати при 450 нм (620 нм як додаткова еталонна довжина хвилі) Дистильована або дейонізована вода

Статистичний калькулятор із програмою для виконання регресійного аналізу

**8 Застереження щодо використання**

Усі хімічні речовини слід розглядати як потенційно небезпечні. Тому ми рекомендуємо, щоб цей продукт використовувався лише особами, які пройшли підготовку з лабораторних методів, і щоб він використовувався відповідно до принципів належної лабораторної практики. Одягайте відповідний захисний одяг, такий як лабораторний комбінезон, захисні окуляри та рукавички. Слід бути обережним, щоб уникнути контакту зі шкірою або очима. У разі потрапляння на шкіру або в очі негайно промити водою. Перегляньте паспорт(и) безпеки матеріалу та/або заяву(и) безпеки для отримання конкретних порад.

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

Не змішуйте та не замінюйте реагенти реагентами з інших партій або інших джерел. Не використовуйте реагенти набору після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.

Не піддавайте реагенти набору впливу сильного світла під час зберігання або інкубації. Не піпетуйте ротом.

Не їжте та не куріть у місцях, де працюють із реагентами або зразками. Уникайте контакту шкіри або слизових оболонок із реагентами або зразками набору.

Під час роботи з реагентами або зразками з набору слід надягати гумові або одноразові латексні рукавички. Уникайте контакту розчину субстрату з окислювачами та металом.

Уникайте бризок або утворення аерозолів.

Щоб уникнути мікробного забруднення або перехресного забруднення реагентів або зразків, яке може зробити тест недійсним, використовуйте одноразові наконечники та/або піпетки.

Використовуйте чисті спеціальні лотки для реагентів для дозування кон'югату та реагенту субстрату. Вплив кислоти інактивує кон'югат.

Для приготування реагентів необхідно використовувати дистильовану або дейонізовану воду. Перед використанням розчин субстрату повинен бути кімнатної температури.

Деконтамінуйте та утилізуйте зразки та всі потенційно заражені матеріали так, ніби вони можуть містити інфекційні агенти. Переважним методом дезактивації є автоклавування протягом мінімум 1 години при 121,5°C.

Рідкі відходи, що не містять кислоти, і нейтралізовані відходи можна змішувати з гіпохлоритом натрію в таких обсягах, щоб кінцева суміш містила 1,0% гіпохлориту натрію. Зачекайте 30 хвилин для ефективного знезараження. Рідкі відходи, що містять кислоту, необхідно нейтралізувати перед додаванням гіпохлориту натрію.

## 9 Приготування реагентів

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

### 9.1 Промивний буфер (1x)

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

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

### 9.1 Буфер для аналізу (1x)

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

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

### 9.2 Біотин-кон'югат

Примітка: біотин-кон'югат слід використати протягом 30 хвилин після розведення.

Зробіть розведення 1:100 концентрованого розчину біотин-кон'югату з розріджувачем кон'югату в чистій пластиковій пробірці відповідно до наступної таблиці:

Кількість стріпів	Біотин-кон'югат (мл)	Розріджувач кон'югату (мл)
1 - 6	0,03	2,97
1 - 12	0,06	5.94

### 9.3 Стрептавідін-HRP

Примітка: Стрептавідін-HRP слід використати протягом 30 хвилин після розведення.

Зробіть розведення 1:300 концентрованого розчину стрептавідину-HRP з розріджувачем кон'югату в чистій пластиковій пробірці відповідно до наведеної нижче таблиці:

Кількість стріпів	Стрептавідін-HRP (мл)	Розріджувач кон'югату (мл)
1 - 6	0,02	5,98
1 - 12	0,04	11.96

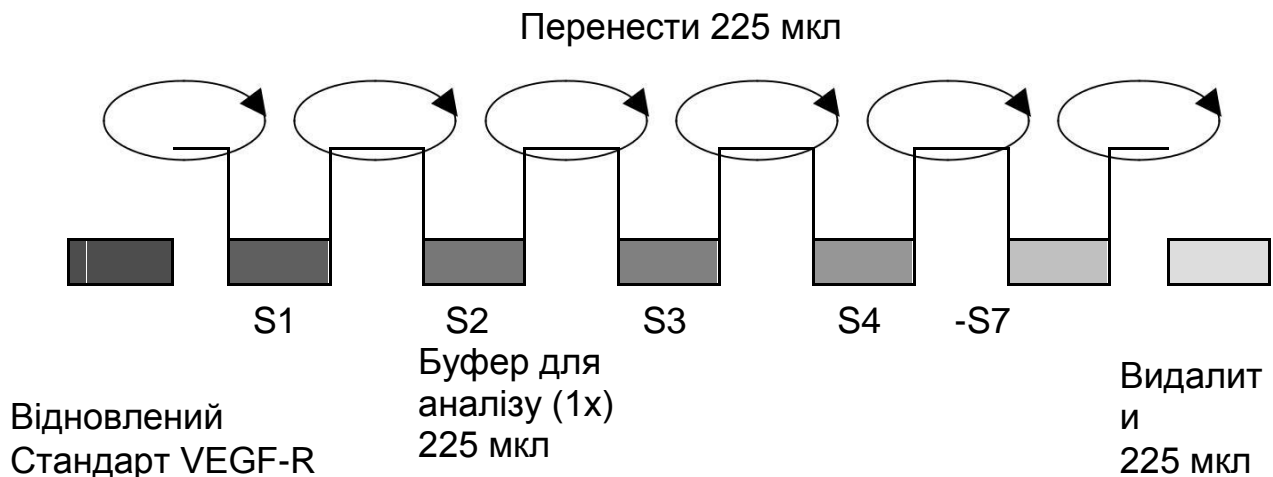
### 9.4 Стандарт VEGF-R1 людини

1. Розчиніть стандарт VEGF-R1 людини, додавши дистильовану воду. Обсяг розчинення вказано на етикетці стандартного флакона. Покрутіть або обережно перемішайте, щоб забезпечити повну та однорідну солюбілізацію (концентрація відновленого стандарту = 20,00 нг/мл).
2. Дайте стандарту відновитися протягом 10-30 хвилин. Добре перемішайте перед приготуванням розчинів.
3. Після використання стандарт, що залишився, не може зберігатися і повинен бути викинутий. Стандарт необхідно використати відразу після відновлення і не підлягає зберіганню.

### 9.4.1 Розведення зовнішнього стандарту

1. Позначте 7 пробірок, по одній для кожної точки стандартів : S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7
2. Приготуйте серійні розведення 1:2 для стандартної кривої таким чином: Внесіть 225 мкл буфера для аналізу (1x) у кожен пробірку.
3. Внесіть піпеткою 225 мкл відновленого стандарту (концентрація стандарту = 20 нг/мл) у першу пробірку, позначену S1, і перемішайте (концентрація стандарту 1 = 10 нг/мл).
4. Внесіть 225 мкл цього розчину в другу пробірку, позначену S2, і ретельно перемішайте перед наступним перенесенням.
5. Повторіть серійні розведення ще 5 разів, таким чином створивши точки стандартної кривої (див. рис. 6). Буфер для аналізу (1x) служить бланк.

Малюнок 6

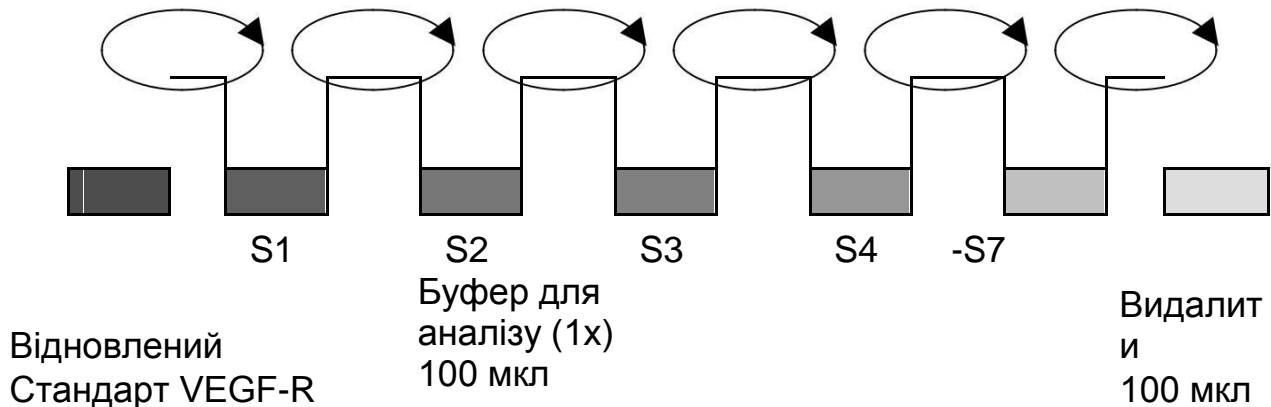


### 10 Протокол аналізу

- а. Визначте кількість мікролуночних стріпів, необхідних для тестування бажаної кількості зразків, плюс відповідну кількість лунок, необхідних для проведення холостих проб і стандартів. Кожен зразок, стандартний, бланк і необов'язковий контрольний зразок слід аналізувати в двох примірниках. Вийміть додаткові мікролунокові стріпи з тримача та зберігайте в щільно закритому пакеті з фольги з осушувачем при 2°-8°С.
- б. Двічі промийте стріпи мікролунок приблизно 400 мкл промивного буфера на лунку, ретельно відсмоктуючи вміст мікролунок між промиваннями. Перед аспірацією дайте промивному буферу постояти в лунках приблизно 10–15 секунд. Будьте обережні, щоб не подряпати поверхню мікролунок. Після останнього етапу промивання спорожніть лунки та постукайте стріпами мікролунок по вбираючій подушечці або паперовому рушнику, щоб видалити надлишок промивного буфера. Використовуйте стріпи для мікролунок одразу після промивання. Крім того, стріпи мікролунок можна покласти догори дном на вологий абсорбуючий папір не довше ніж на 15 хвилин. Не допускати пересихання лунки.
- с. Стандартне розведення на мікропланшеті  
(Альтернативно стандартний розчин можна приготувати в пробірках - див. 9.4.1.):  
Додайте 100 мкл буфера для аналізу (1x) у двох примірниках до всіх стандартних лунок. Прокачайте 100 мкл готового стандарту (див. Приготування стандарту 9.4, концентрація = 20,00 нг/мл) у двох примірниках у лунки А1 і А2 (див. Таблицю 1). Змішайте вміст лунок А1 і А2 шляхом повторної аспірації та викиду (концентрація стандарту 1, S1 = 10,00 нг/мл) і перенесіть 100 мкл в лунки В1 і В2 відповідно (див. Малюнок 7). Будьте обережні, щоб не подряпати внутрішню поверхню мікролунок. Продовжуйте цю процедуру 5 разів, створюючи два ряди стандартних розведень VEGF-R1 людини в діапазоні від 10,00 до 0,16 нг/мл. Відкиньте 100 мкл вмісту останніх використаних мікролунок (G1, G2).

## Малюнок 7

Перенесіть 100 мкл



У разі зовнішнього стандартного розведення (див. 9.4.1), внесіть 100 мкл цих стандартних розведень (S1 - S7) у стандартні лунки відповідно до Таблиця 1.

## Таблиця 1

Таблиця із зображенням прикладу розташування заготовок, стандартів і зразків у стріпах мікролунок:

	1	2	3	4
<b>А</b>	Стандарт 1 (10,00 нг/мл)	Стандарт 1 (10,00 нг/мл)	Зразок 1	Зразок 1
<b>Б</b>	Стандарт 2 (5,00 нг/мл)	Стандарт 2 (5,00 нг/мл)	Зразок 2	Зразок 2
<b>С</b>	Стандарт 3 (2,50 нг/мл)	Стандарт 3 (2,50 нг/мл)	Зразок 3	Зразок 3
<b>Д</b>	Стандарт 4 (1,25 нг/мл)	Стандарт 4 (1,25 нг/мл)	Зразок 4	Зразок 4
<b>Е</b>	Стандарт 5 (0,63 нг/мл)	Стандарт 5 (0,63 нг/мл)	Зразок 5	Зразок 5
<b>Ф</b>	Стандарт 6 (0,32 нг/мл)	Стандарт 6 (0,32 нг/мл)	Зразок 6	Зразок 6
<b>Г</b>	Стандарт 7 (0,16 нг/мл)	Стандарт 7 (0,16 нг/мл)	Зразок 7	Зразок 7
<b>Х</b>	Бланк	Бланк	Зразок 8	Зразок 8

- Додайте 100 мкл буфера для аналізу (1x) у двох примірниках до лунок бланк.
- Додайте 50 мкл буфера для аналізу (1x) до лунок зразка.
- Додайте 50 мкл кожного зразка в двох примірниках до лунок для зразків.
- Приготуйте біотин-кон'югат (див. Приготування біотин-кон'югату 9.2).
- Додайте 50 мкл біотин-кон'югату в усі лунки.
- Накрийте клейкою плівкою та інкубуйте при кімнатній температурі (18–25°C) протягом 2 годин, якщо є, на шейкері для мікропланшетів, встановленому на 400 об/хв.
- Приготуйте Стрептавідін-HRP (див. Приготування Стрептавідін-HRP 9.3).

- k. Видалити клейку плівку та спорожнити лунки. Промийте стріпи мікролунок 6 разів відповідно до пункту b. протоколу випробування. негайно перейдіть до наступного кроку.
- l. Додайте 100 мкл розведеного Стрептавідін - HRP до всіх лунок, включаючи лунки бланк.
- m. Накрийте клейкою плівкою та інкубуйте при кімнатній температурі (від 18° до 25°С) протягом 1 години, якщо є, на шейкері для мікропланшетів зі швидкістю 400 об./хв.
- n. Видалити клейку плівку та спорожнити лунки. Промийте стріпи мікролунок 6 разів відповідно до пункту b. протоколу випробування. негайно перейдіть до наступного кроку.
- o. Внесіть 100 мкл розчину субстрату ТМБ в усі лунки.
- p. Інкубуйте стріпи з мікролунками при кімнатній температурі (18–25 °С) приблизно 30 хв. Уникайте прямого впливу інтенсивного світла.  
**Слід відстежувати розвиток кольору на планшеті та зупиняти реакцію субстрату (див. наступний пункт цього протоколу) до того, як позитивні лунки перестануть належним чином реєструватися. Визначення ідеального періоду часу для розвитку забарвлення має проводитися індивідуально для кожного аналізу.**  
Рекомендується додавати стоп-розчин, коли найвищий стандарт набув темно-синього кольору. Альтернативно розвиток кольору можна відстежувати за допомогою пристрою для зчитування ІФА при 620 нм. Реакцію субстрату слід зупинити, як тільки стандарт 1 досягне ОГ 0,9–0,95.
- q. Зупиніть реакцію ферменту, швидко додавши піпеткою 100 мкл стоп-розчину в кожен лунку. Важливо, щоб стоп-розчин швидко та рівномірно розподілявся по мікролунках, щоб повністю інактивувати фермент. Результати слід зчитувати одразу після додавання стоп-розчину або протягом однієї години, якщо мікролункові стріпи зберігаються при 2–8°С у темряві.
- r. Зчитайте поглинання кожної мікролунки на спектрофотометрі, використовуючи 450 нм як основну довжину хвилі (необов'язково 620 нм як еталонну довжину хвилі; прийнятно від 610 нм до 650 нм). Налаштуйте рідер планшету згідно з інструкціями виробника, використовуючи лунки бланк. Визначте поглинання як зразків, так і стандартів.

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

## 11 Підрахунок результатів

Обчисліть середні значення поглинання для кожного набору дублікатів стандартів і зразків. Дублікати повинні бути в межах 20 відсотків від середнього значення.

Побудуйте стандартну криву, відклавши середнє значення поглинання для кожної стандартної концентрації на ординаті проти концентрації VEGF-R1 людини на осі абсцис. Намалюйте криву найкращого підбору через точки графіка (рекомендовано підгонку кривої з 5 параметрами).

Щоб визначити концентрацію циркулюючого людського VEGF-R1 для кожного зразка, спочатку знайдіть середнє значення поглинання на осі ординат і проведіть горизонтальну лінію до стандартної кривої. У точці перетину протягніть вертикальну лінію до осі абсцис і прочитайте відповідну концентрацію VEGF-R1 людини.

Якщо дотримувалися інструкцій у цьому протоколі, зразки були розведені 1:2 (50 мкл зразка + 50 мкл буфера для аналізу (1x)), а концентрацію, зчитану зі стандартної кривої, потрібно помножити на коефіцієнт розведення (x 2).

Розрахунок зразків із концентрацією, що перевищує стандарт 1, призведе до неправильних низьких рівнів VEGF-R1 людини (ефект Хука). Такі зразки вимагають подальшого зовнішнього попереднього розведення відповідно до очікуваних значень VEGF-R1 людини за допомогою буфера для аналізу (1x), щоб точно визначити фактичний рівень VEGF-R1 людини.

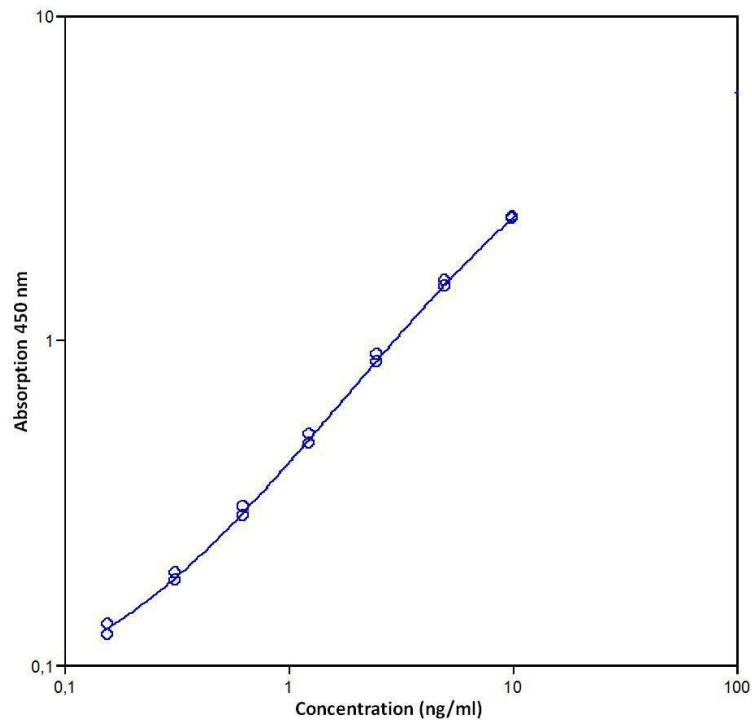
Рекомендується, щоб кожен тестовий заклад створював контрольний зразок відомої концентрації VEGF-R1 людини та запуслав цей додатковий контроль з кожним аналізом. Якщо отримані значення виходять за межі очікуваного діапазону контролю, результати аналізу можуть бути недійсними.

Типова стандартна крива показана на малюнку 8.

Примітка. Не використовуйте цю стандартну криву для отримання результатів тесту. Кожна лабораторія повинна підготувати стандартну криву для кожної досліджуваної групи стріпів мікролунок.

## Малюнок 8

Типова стандартна крива для ІФА VEGF-R1 людини. Людський VEGF-R1 розводили серійно в 2 рази в буфері для аналізу (1х). Не використовуйте цю стандартну криву для отримання результатів тесту. Для кожної досліджуваної групи стрипів мікролунок необхідно провести стандартну криву.



Таблиця 2

Типові дані з використанням людського VEGF-R1 ІФА

Довжина хвилі вимірювання: 450 нм

Референтна довжина хвилі: 620 нм

Стандартний	VEGF-R1 людини Концентрація (нг/мл)	ОГ при 450 нм	Середній ОГ при 450 нм	CV (%)
1	10.00	2,389 2,372	2,381	0,4
2	5.00	1,458 1,518	1,488	2.0
3	2.50	0,900 0,852	0,876	2.8
4	1.25	0,511 0,480	0,496	3.1
5	0,63	0,306 0,289	0,297	3.0
6	0,31	0,191 0,181	0,186	2.9
7	0,16	0,134 0,124	0,129	3.8
Пустий	0,00	0,054 0,055	0,054	1.6

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

## 12 Обмеження

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

Бактеріальне або грибокве забруднення зразків або реагентів або перехресне забруднення між реагентами може призвести до помилкових результатів.

Перевага надається одноразовим наконечникам для піпеток, колбам або скляному посуду, багаторазовий скляний посуд необхідно вимити та ретельно промити від усіх миючих засобів перед використанням.

Неправильне або недостатнє миття на будь-якому етапі процедури призведе до хибнопозитивних або хибнонегативних результатів. Повністю спустошіть лунки, перш ніж вводити свіжий розчин для промивання, заповніть промивним буфером, як зазначено для кожного циклу промивання, і не дозволяйте лункам залишатися непокритими або висихати протягом тривалого часу.

Застосування радіоімунотерапії значно збільшило кількість пацієнтів з людськими антитілами IgG проти миші (НАМА). НАМА може впливати на аналізи, в яких використовуються мишачі моноклональні антитіла, що призводить до хибнопозитивних і хибнонегативних результатів. Зразки сироватки, що містять антитіла до мишачих імуноглобулінів, все ще можна аналізувати в таких аналізах, коли до зразка додають мишачі імуноглобуліни (сироватка, асцитична рідина або моноклональні антитіла нерелевантної специфічності).

## 13 Технічні характеристики

### 13.1 Чутливість

Межа виявлення VEGF-R1 людини, визначена як концентрація аналіту, що призводить до поглинання, значно більшої, ніж у середовища для розведення (середнє значення плюс 2 стандартних відхилення), було визначено як 0,03 нг/мл (середнє значення з 6 незалежних аналізів).

### 13.2 Відтворюваність

#### 13.2.1 В аналізі

Відтворюваність в межах аналізу оцінювали в 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повторами 6 зразків сироватки, що містять різні концентрації VEGF-R1 людини. На кожній пластині проводили 2 стандартні криві. Дані нижче показують середню концентрацію VEGF-R1 людини та коефіцієнт варіації для кожного зразка (див. таблицю 3). Розрахований загальний внутрішньоаналізний коефіцієнт варіації становив 5,5%.

Таблиця 2

Середня концентрація VEGF-R1 людини та коефіцієнт варіації для кожного зразка

Зразок	Експеримент	Середнє VEGF-R1 людини Концентрація (нг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	1	15.38	3.5
	2	14.15	5.4
	3	15.26	2.9
2	1	9.91	3.2
	2	9.16	4.6
	3	9,86	3.5
3	1	5.46	6.2
	2	5.23	2.8
	3	5.47	5.3
4	1	4.05	5.2
	2	3.71	3.9
	3	3,95	5.5
5	1	2.87	6.2
	2	2.40	4.6
	3	2.90	7.8

Зразок	Експеримент	Середнє VEGF-R1 людини Концентрація (нг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
6	1	2.15	5.9
	2	2.04	4.8
	3	2.28	5.4
7	1	0,52	2.6
	2	0,46	8.9
	3	0,50	11.8
8	1	0,82	5.4
	2	0,85	7.0
	3	0,86	8.8

### 13.2.2 Між аналізами

Відтворюваність аналізу в одній лабораторії оцінювали в 2 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повторами 6 зразків сироватки, що містять різні концентрації VEGF-R1 людини. На кожному планшеті проводили 2 стандартні криві. Дані, наведені нижче, показують середню концентрацію VEGF-R1 людини та коефіцієнт варіації, розрахований на основі 18 визначень кожного зразка (див. Таблиця 3). Розрахований загальний міжтестовий коефіцієнт варіації становив 5,1%.

Таблиця 3

Середня концентрація VEGF-R1 людини та коефіцієнт варіації кожного зразка

Зразок	Середнє VEGF-R1 людини Концентрація (нг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	14.93	4.5
2	9,64	4.3
3	5.39	2.5
4	3.90	4.5
5	2.72	10.4
6	2.16	5.5
7	0,49	6.5
8	0,84	2.4

### 13.3 Відновлення збагаченням

Відновлення збагаченням оцінювали шляхом введення 3 рівнів VEGF-R1 людини у сироватку, плазму та супернатант культури клітин. Відновлення визначали з 4 репліками кожного. Кількість ендogenous людського VEGF-R1 у зразках без добавок була віднята від значень добавок.

Показано, що відновлення залежить від використовуваної сироватки.

Дані відновлення див. у таблиці 5.

Таблиця 4

Зразок матриці	Збагачення високе (%)	Збагачення середнє(%)	Збагачення низьке (%)
Сироватка	46	50	67
Плазма (EDTA)	73	72	91
Плазма (цитрат)	148	115	155
Супернатант клітинної культури	47	56	79

### 13.4 Паралелізм розведення

Зразки сироватки, плазми та супернатанту клітинної культури з різними рівнями VEGF-R1 людини аналізували в серійних 2-кратних розведеннях з 4 повторами кожного. Дані для відновлення див Таблиця 5.

Таблиця 5

Зразок матриці	Відновлення Експ.Знач..	
	Діапазон (%)	Середнє (%)
Сироватка	112 - 148	128
Плазма (EDTA)	114 - 142	125
Плазма (цитрат)	77 - 121	102
Супернатант клітинної культури	105 - 127	116

### 13.5 Стабільність зразка

#### 13.5.1 Стабільність при замерзанні-відтаванні

Аліквоти зразків сироватки (з додаванням або без додавання) зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  і розморожували 5 разів, і визначали рівні VEGF-R1 людини. Не було значної втрати людської імунореактивності VEGF-R1, виявленої за допомогою заморожування та розморожування.

#### 13.5.2 Стабільність при зберіганні

Аліквоти зразків сироватки (з додаванням або без додавання) зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $2-8^{\circ}\text{C}$ , кімнатній температурі (RT) і при  $37^{\circ}\text{C}$ , а рівень VEGF-R1 людини визначали через 24 години. Не було виявлено значної втрати імунореактивності VEGF-R1 людини під час зберігання при  $-20^{\circ}\text{C}$  і  $4^{\circ}\text{C}$ .

Значну втрату імунореактивності VEGF-R1 людини було виявлено під час зберігання при кімнатній температурі та  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 13.6 Специфіка

Аналіз виявляє як природний, так і рекомбінантний VEGF-R1 людини.

Перехресну реактивність і вплив циркулюючих факторів імунної системи оцінювали шляхом додавання цих білків у фізіологічно відповідних концентраціях у позитивний зразок VEGF-R1 людини. Вплив було виявлено для VEGF-A при концентраціях  $> 0,15$  нг/мл і для PLGF-1 при концентраціях  $> 2,5$  нг/мл.

Не було виявлено перехресної реактивності або інтерференції для KDR, PDGFAA, PDGF-BB, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, HGF, EGF.

### 13.7 Очікувані значення

Панелі з 40 зразків сироватки, а також EDTA і цитратної плазми від випадково відібраних очевидно здорових донорів (чоловіків і жінок) були протестовані на VEGF-R1 людини. Виміряні рівні можуть відрізнитися в залежності від зразка, який використовується.

Підвищений рівень VEGF-R1 людини залежить від типу імунологічного розладу.

Виявлені рівні VEGF-R1 людини див Таблиця 6.

Таблиця 6

Зразок матриці	Кількість зразків	Діапазон (нг/мл)	% Виявляється	Середнє значення, що виявляється
	Оцінено			(нг/мл)
Сироватка	40	nd * - 0,42	5	--
Плазма (EDTA)	40	nd	--	--
Плазма (цитрат)	40	nd	--	--

\* нв = не виявляється, зразки, виміряні нижче найнижчої стандартної точки, вважаються такими, що не виявляються.

**14 Підсумок приготування реагентів****14.1 Промивний буфер (1х)**

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

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

**14.2 Буфер для аналізу (1х)**

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

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

**14.3 Біотин-кон'югат**

Зробіть 1:100 розведення біотин-кон'югату в розчиннику кон'югату:

Кількість стріпів	Біотин-кон'югат (мл)	Розріджувач кон'югату (мл)
1 - 6	0,03	2,97
1 - 12	0,06	5.94

**14.4 Стрептавідін-HRP**

Зробіть розведення Стрептавідін-HRP 1:300 у розріджувачі кон'югату:

Кількість стріпів	Стрептавідін-HRP (мл)	Розріджувач кон'югату (мл)
1 - 6	0,02	5,98
1 - 12	0,04	11.96

**14.5 Стандарт VEGF-R1 людини**













Відновіть ліофілізований стандарт VEGF-R1 людини дистильованою водою. (Обсяг розчинення вказано на етикетці флакона стандарту.)

**15 Резюме протоколу тестування**

1. Визначте необхідну кількість стріпів для мікролунок.
2. Двічі промийте стріпи мікролунок промивним буфером.
3. Стандартне розведення на мікропланшеті: Додайте 100 мкл буфера для аналізу (1x) у двох примірниках до всіх стандартних лунок. Прокачайте 100 мкл готового стандарту в перші лунки та створіть стандартні розведення, переносючи 100 мкл з лунки в лунку. Відкиньте 100 мкл з останніх лунок. Як альтернатива зовнішнє стандартне розведення в пробірках (див.9.4.1):Внесіть 100 мкл цих стандартних розведень у стріпи мікролунок.
4. Додайте 100 мкл буфера для аналізу (1x) у двох примірниках до лунок бланк.
5. Додайте 50 мкл буфера для аналізу (1x) до лунок зразка.
6. Додайте 50 мкл зразка в двох примірниках до призначених лунок для зразків.
7. Приготуйте біотин-кон'югат.
8. Додайте 50 мкл біотин-кон'югату в усі лунки.
9. Закрийте стріпи мікролунками та інкубуйте 2 години при кімнатній температурі (18–25 °С).
10. Приготуйте Стрептавідін-HRP.
11. Спорожніть і промийте стріпи мікролунок 6 разів промивним буфером.
12. Додайте 100 мкл розведеного Стрептавідін-HRP до всіх лунок.
13. Закрийте стріпи мікролунками та інкубуйте 1 годину при кімнатній температурі (18–25 °С).
14. Спорожніть і промийте стріпи мікролунок 6 разів промивним буфером.
15. Додайте 100 мкл розчину субстрату ТМБ в усі лунки.
16. Інкубуйте стріпи з мікролунками приблизно 30 хвилин при кімнатній температурі (18–25 °С).
17. Додайте 100 мкл стоп-розчину в усі лунки.
18. Налаштуйте рідер мікролунок (бланк) і виміряйте інтенсивність кольору при 450 нм.

**Примітка.** Якщо дотримувалися інструкцій у цьому протоколі, зразки були розведені 1:2 (50 мкл зразка + 50 мкл буфера для аналізу (1x)), а концентрація, зчитана зі стандартної кривої, повинна бути помножена на коефіцієнт розведення (x 2) .

## 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 подалі від джерел тепла і прямого сонячного світла.
	Зберігати при температурі:
	Виробник:
	Увага!
	Містить біологічний матеріал людського походження
	Містить біологічний матеріал тваринного походження
UDI 	Унікальна ідентифікація пристрою
	Дистриб'ютор
Умовні позначення компонентів див. у розділі «Матеріали, що входять до набору».	

## Символи компонентів набору див. МАТЕРІАЛИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ.

**СКАРГИ:** Скарги можуть бути подані спочатку письмово або усно. Згодом їх необхідно подати в письмовій формі, включаючи виконання тесту та результати, у разі аналітичних причин.

**ГАРАНТІЯ:** Гарантується, що продукт не має матеріальних дефектів протягом визначеного терміну придатності та відповідає специфікаціям продукту, що постачаються разом із продуктом. Продукт необхідно використовувати відповідно до використання за призначенням, усіх інструкцій, наведених в інструкції із застосування, та протягом терміну придатності продукту. Будь-яка модифікація процедури тестування або обмін чи змішування компонентів різних партій може негативно вплинути на результати. Ці випадки роблять будь-яку вимогу про заміну недійсною.

**ОБМЕЖЕННЯ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ:** ЗА ВСІХ ОБСТАВИН ОБСЯГ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ВИРОБНИКА ОБМЕЖУЄТЬСЯ ЦІНОЮ ПОКУПКИ КОМПЛЕКТІВ. ВИРОБНИК У ЖОДНОМУ РАЗІ НЕ НЕСЕ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ЗА БУДЬ-ЯКІ ВИПАДКОВІ АБО НЕПРЯМІ ЗБИТКИ, ВКЛЮЧАЮЧИ ЗБИТКИ ВІД ВТРАЧЕНОГО ПРИБУТКУ, ВТРАТИ ПРОДАЖІВ, ПОВЕДЕННЯ ЛЮДИНИ ЧИ МАЙНА АБО БУДЬ-ЯКИХ ІНШИХ ВИПАДКОВИХ АБО НЕПРЯМИХ ЗБИТКІВ.



**IBL International GmbH**

Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург, Німеччина

тел.: + 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11

E-MAIL: IBL@IBL-International.com

ВЕБ: <http://www.IBL-International.com>