



IBL International GmbH
Flughafenstraße 52 a
22335 Гамбург,
Німеччина

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

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

Інструкція по застосуванню

ІФА інтерлейкін-2

Імуноферментний аналіз для
кількісного виявлення ІЛ-2 людини.

REF 30149807



96



2°C 8°C

Тільки для дослідницьких цілей
Не для використання в діагностичних процедурах.

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



IBL International GmbH
Flughafenstrasse 52a
22335 Гамбург, Німеччина

Always there for you

1. ПЕРЕДБАЧУВАНЕ ВИКОРИСТАННЯ

ІФА на інтерлейкін-2 — це імуноферментний аналіз для кількісного виявлення ІЛ-2 людини. ІФА ІЛ-2 людини призначений лише для дослідницького використання. Не для діагностичних або терапевтичних процедур.

2. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Інтерлейкін-2 (ІЛ-2) відіграє центральну роль в активації та проліферації лімфоцитів, які були ініційовані антигенами. ІЛ-2 відіграє ключову роль у розширенні більшості Т-клітин, природних клітин-кілерів і В-клітин під час певних фаз їхньої відповіді.

ІЛ-2 являє собою глікопротеїн масою 15 кДа, що кодується одним геном, розташованим в області q26-28 хромосоми 4 людини. Поліпептид, отриманий з кДНК, складається з 153 амінокислот.

Експресія гена ІЛ-2 регулюється на рівні транскрипції кількома шляхами активації. Антиген-специфічна проліферація хелперних і цитотоксичних Т-лімфоцитів після стимуляції критично залежить від експресії, секреції та зв'язування ІЛ-2 з рецепторами для ІЛ-2, індукованих аутокринним способом на поверхні Т-клітин.

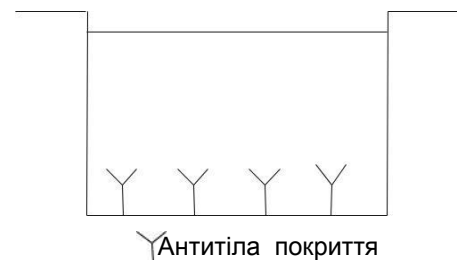
Крім своєї найважливішої ролі в посередництві антиген-специфічної проліферації Т-лімфоцитів, ІЛ-2 модулює експресію гамма-інтерферону та основних антигенів гістосумісності, стимулює проліферацію та диференціацію активованих В-клітин, збільшує активність природних клітин-кілерів і пригнічує гранулоцити. утворення колоній макрофагів. Зміни в здатності Т-клітин синтезувати ІЛ-2 спостерігалися при фізіологічних і патологічних станах.

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Антитіло проти ІЛ-2 людини адсорбується на мікролунках.

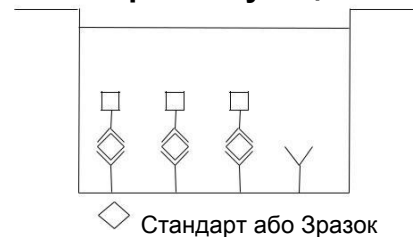
Малюнок 1

Мікролунка з покриттям



Малюнок 2

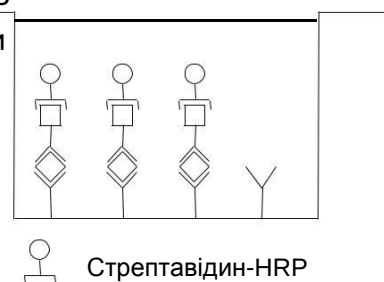
Перша інкубація



Біотин-кон'югат

Малюнок 3

Друга інкубація

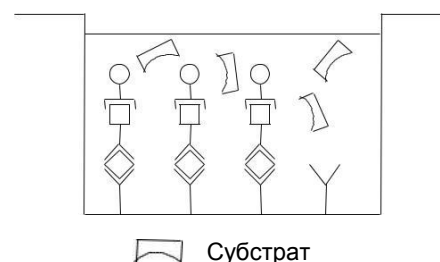


ІЛ-2 людини, присутній у зразку або стандарті, зв'язується з антитілами, адсорбованими на мікролунках. Додають кон'юговане з біотином антитіло анти ІЛ-2 людини, яке зв'язується з ІЛ-2 людини, захопленим першим антитілом.

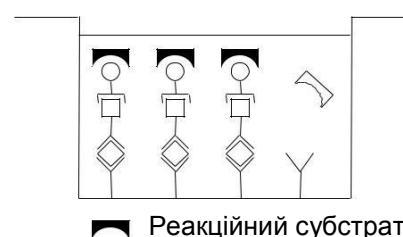
Після інкубації незв'язані кон'юговані з біотином анти-ІЛ-2 людини антитіла видаляються під час етапу промивання. Стрептавідин-HRP додається і зв'язується з кон'югованим з біотином анти-ІЛ-2 людини антитілом.

І після інкубації незв'язаний стрептавідин-HRP видаляють під час етапу промивання, а розчин субстрату реагує з HRP доданим в лунки.

Малюнок 4
Третя інкубація



Малюнок 5



Забарвлений продукт утворюється пропорційно кількості ІЛ-2 людини, присутнього в зразку або стандарті. Реакцію припиняють додаванням кислоти і вимірюють поглинання при 450 нм. Стандартну криву готують із 7 стандартних розведень ІЛ-2 людини та визначають концентрацію зразка ІЛ-2 людини.

4. РЕАГЕНТИ НАДАНІ

МТР

БІУТИН КОНЦ

ENZCONJ КОНЦ

КАЛ ЛЮ

КОНТРОЛЬ НИЗЬКИЙ ЛЮ

КОНТРОЛЬ ВИСОКИЙ ЛЮ

Розчинник зразка

БУФЕР АНАЛІЗУ КОНЦ

WASHBUF КОНЦ

SUBS

СТОП

1 алюмінієвий пакет з мікропланшетом (12 стріпів з 8 лунками кожна)

покриті моноклональними антитілами до ІЛ-2 людини

1 флакон (70 мкл) кон'югату біотину анти-ІЛ-2 людини поліклональні антитіла

1 флакон (150 мкл) Стрептавідин-HRP

2 флакони стандартного ІЛ-2 людини ліофілізовані, 2,4 нг/мл після відновлення

1 флакон Контроль низький, ліофілізований

1 флакон Контроль високий, ліофілізований

1 флакон (5 мл) Буферний концентрат для аналізу 20x (PBS з 1% Tween 20, 10% BSA)

1 пляшка (12 мл) Розчинник зразка

1 пляшка (50 мл) концентрат промивного буфера 20x (PBS з 1% Tween 20)

1 флакон (15 мл) розчину субстрату (тетраметилбензидин)

1 флакон (15 мл) Стоп-розчин (1М фосфорна кислота)

4 Клейкі плівки

5. ІНСТРУКЦІЯ ЗБЕРІГАННЯ – ІФА набір

Зберігайте реагенти набору при температурі від 2° до 8°C, крім контрольних. Зберігати ліофілізовані контролю при -20°C.

Відразу після використання решту реагентів слід повернути в холодне зберігання (2° - 8°C) або до -20°C відповідно. Термін придатності набору та реагентів вказано на етикетках.

Закінчення терміну придатності компонентів набору може бути гарантовано лише за умови належного зберігання компонентів, а також якщо у разі повторного використання одного компонента цей реагент не забруднений під час першої обробки.

6. ІНСТРУКЦІЯ ЗБОРУ ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗІВ

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

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

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

Зразки слід розділити на аліквоти та зберігати замороженими при -20°C , щоб уникнути втрати біологічно активного IL-2 людини. Якщо зразки потрібно аналізувати протягом 24 годин, їх можна зберігати при температурі від 2° до 8°C (стабільність зразка див. у 13.5.). Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Перед аналізом заморожений зразок слід повільно довести до кімнатної температури та обережно перемішати.

7. МАТЕРІАЛИ ПОТРІБНІ, АЛЕ НЕ НАДАНІ

- Градуйовані піпетки на 5 і 10 мл
- Регульовані одноканальні мікропіпетки від 5 мкл до 1000 мкл з одноразовими наконечниками
- Регульована багатоканальна мікропіпетка від 50 мкл до 300 мкл з одноразовими наконечниками
- Багатоканальний резервуар мікропіпетки
- Стакани, колби, циліндри, необхідні для приготування реагентів
- Пристрій для подачі промивного розчину (багатоканальна промивна пляшка або система автоматичного миття)
- Мікролунковий пристрій для зчитування стріпів, здатний зчитувати при 450 нм (620 нм як додаткова референтна довжина хвилі)
- Скляна дистильована або дейонізована вода
- Статистичний калькулятор з програмою для виконання регресійного аналізу

8. ЗАХОДИ ЩОДО ВИКОРИСТАННЯ

- Усі реагенти слід розглядати як потенційно небезпечні. Тому ми рекомендуємо, щоб з цим продуктом працювали лише ті особи, які пройшли навчання з лабораторних методів та використовували його відповідно до принципів належної лабораторної практики. Носіть відповідний захисний одяг, такий як лабораторний комбінезон, захисні окуляри та рукавички. Слід дотримуватися обережності, щоб уникнути контакту зі шкірою або очима. У разі потрапляння на шкіру або в очі негайно промити водою. Для отримання конкретних рекомендацій див. паспорт безпеки.
- 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 чи 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 піпетувати через рот.
- Не їжте і не паліть в місцях, де працюють з реагентами або зразками набору.
- Уникайте контакту шкіри або слизових оболонок з реагентами або зразками набору.
- Під час роботи з реагентами або зразками набору слід надягати гумові або одноразові латексні рукавички.
- Уникайте контакту розчину субстрату з окислювачами та металом.
- Уникайте розбризкування або утворення аерозолів.
- Щоб уникнути мікробного забруднення або перехресного забруднення реагентів або зразків, які можуть зробити тест недійсним, використовуйте одноразові наконечники та/або піпетки.
- Використовуйте чисті спеціальні лотки для реагентів для дозування реагенту кон'югату та субстрату.
- Вплив кислоти інактивує кон'югат.
- Для приготування реагентів необхідно використовувати скляну дистильовану воду або дейонізовану воду.
- Розчин субстрату перед використанням повинен бути кімнатної температури.
- Знезаразити та утилізувати зразки та всі потенційно заражені матеріали, оскільки вони можуть містити інфекційні агенти. Кращим методом дезактивації є автоклавування протягом мінімум 1 години при $121,5^{\circ}\text{C}$.
- Рідкі відходи, що не містять кислоти, та нейтралізовані відходи можна змішувати з гіпохлоритом натрію в таких обсягах, щоб кінцева суміш містила 1,0% гіпохлориту натрію. Дайте 30 хвилин для ефективної дезактивації. Перед додаванням гіпохлориту натрію рідкі відходи, що містять кислоту, необхідно нейтралізувати.

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 до повного розчинення.

9.1.Буфер для промивання (1х)

1. Налийте весь вміст (50 мл) концентрату промивного буфера (20х) у чистий градуйований циліндр об'ємом 1000 мл. Доведіть до кінцевого об'єму 1000 мл дистильованою або дейонізованою водою.
2. Акуратно перемішайте, щоб уникнути утворення піни.
3. Перекласти в чисту пляшку для миття і зберігати при температурі від 2° до 25°С. Зверніть увагу, що промивний буфер (1х) стабільний протягом 30 днів.
4. Буфер для промивання (1х) також можна приготувати за потребою відповідно до наступної таблиці:

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

9.2.Буфер для аналізу (1х)

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

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

9.3.Біотин-кон'югат

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

Розведіть концентрований розчин біотин-кон'югату 1:100 буфером для аналізу (1х) у чистій пластиковій пробірці відповідно до наведеної нижче таблиці:

Кількість стріпів	Кон'югат біотин (мл)	Буфер для аналізу (1х) (мл)
1 - 6	0,03	2,97
1 - 12	0,06	5.94

9.4.Стрептавідин-HRP

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

Розведіть 1:100 концентрований розчин стрептавідин-HRP буфером для аналізу (1х) у чистій пластиковій пробірці відповідно до наведеної нижче таблиці:

Кількість стріпів	Стрептавідин-HRP (мл)	Буфер для аналізу (1х) (мл)
1 - 6	0,06	5.94
1 - 12	0,12	11.88

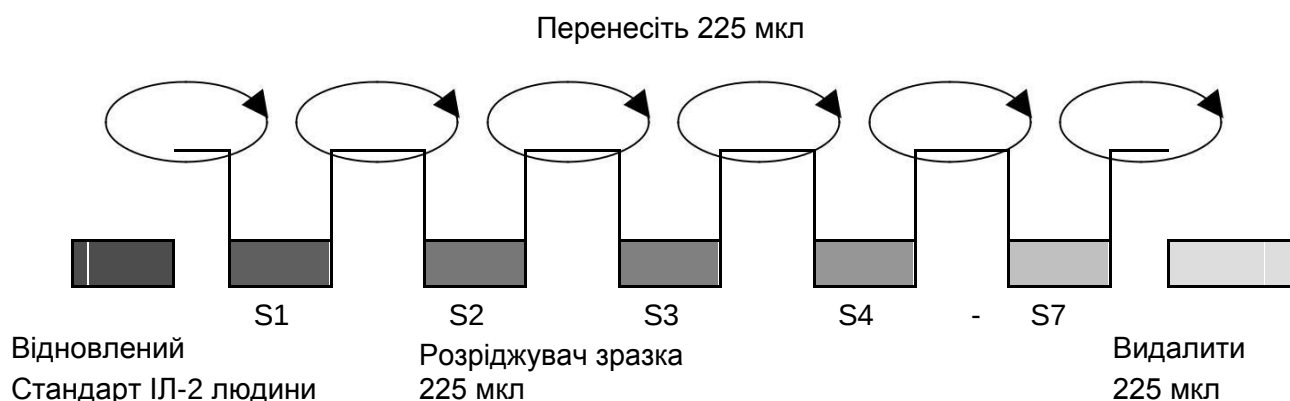
9.5. Стандарт ІЛ-2 людини

1. Відновіть стандарт ІЛ-2 людини, додавши дистильовану воду. Об'єм розчинення вказано на етикетці стандартного флакона. Прокрутіть або обережно перемішайте, щоб забезпечити повну та однорідну солюбілізацію (концентрація відновленого стандарту = 2,4 нг/мл).
2. Дайте стандарту відновитися протягом 10-30 хвилин. Добре перемішайте перед приготуванням розведень.
3. Після використання, що залишився стандарт, не можна зберігати і його потрібно викинути.
4. Стандартні розведення можна готувати безпосередньо на планшеті з мікролунками (див. 10-5) або, як варіант, у пробірках (див. 9.5.1).

9.5.1. Зовнішнє стандартне розведення

1. Позначте 7 пробірок, по одній для кожної стандартної точки: S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7
2. Потім приготуйте послідовні розведення 1:2 для стандартної кривої наступним чином: піпеткою внесіть 225 мкл розчинника зразка в кожну пробірку.
3. Внесіть піпеткою 225 мкл відновленого стандарту (концентрація стандарту = 2,4 нг/мл) у першу пробірку з позначкою S1 і перемішайте (концентрація стандарту 1 = 1,2 нг/мл).
4. Внесіть піпеткою 225 мкл цього розведення в другу пробірку, позначену як S2, і ретельно перемішайте перед наступним перенесенням.
5. Повторіть серійні розведення ще 5 разів, створюючи точки стандартної кривої (див. малюнок 6). Розріджувач зразка служить як бланк.

Рисунок 6 Розведені стандарти - пробірки



9.6. Контролі

Відновіть ліофілізовані контролі, додавши дистильовану воду (10-30 хвилин). Об'єм розчинення вказано на етикетці контрольного флакона. Перемішайте або обережно перемішайте, щоб забезпечити повну та однорідну солюбілізацію. Надалі поведіться з контролями як зі своїми зразками в аналізі. Діапазон контролю можна знайти в сертифікаті аналізу. Зберігати відновлені контролі в аліквотах при -20°C. Уникайте повторних циклів заморожування та відтавання.

10. ПРОТОКОЛ ТЕСТУВАННЯ

Примітка: у разі інкубації без струшування отримані значення ОГ можуть бути нижчими, ніж зазначено нижче.

Тим не менш результати залишаються актуальними.

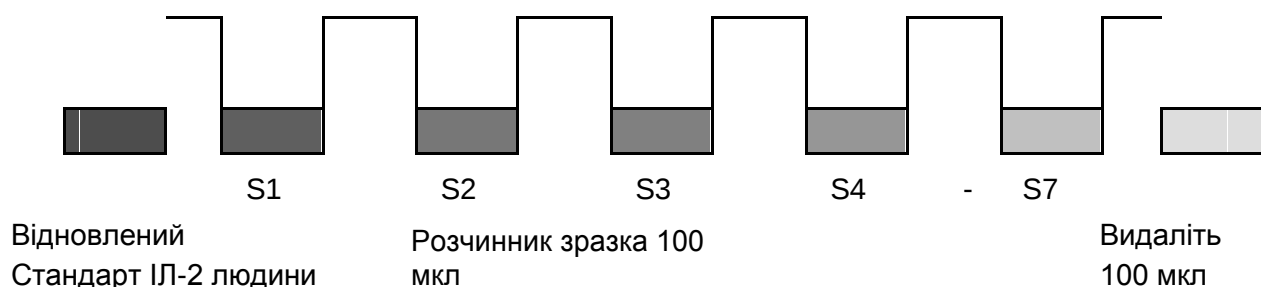
1. Для повторного вимірювання потрібні 2 x 50 мкл зразка. Зразки сироватки або плазми, а також відновлені контролі наносять без попереднього розведення. Рівні ІЛ-2 людини в супернатантах клітинної культури можуть значно відрізнятися. Для кожного окремого зразка необхідно визначити оптимальне розведення. Для невідомих зразків клітинної культури корисно аналізувати нерозведені, а також попередньо розведені зразки (наприклад, 1:20 - 1:50) паралельно, таким чином охоплюючи більш широкий діапазон в одному аналізі. Супернатанти клітинної культури з дуже високою концентрацією людського ІЛ-2 вимагають великих розведень (наприклад, до 1:2000) для правильного вимірювання. Такі зразки необхідно попередньо розвести у відповідному середовищі для культивування клітин. Остаточне розведення має бути виконано в розбавителі зразків за такою схемою:

Розведення	Обсяг зразка	Розчинник зразка	Коефіцієнт розведення:
1 : 5	Зразок 50 мкл	200 мкл розчинника зразка	5
1 : 10	Зразок 25 мкл	225 мкл розчинника зразка	10
1 : 50	Зразок 10 мкл	490 мкл розчинника зразка	50
1 : 100	A: Зразок 10 мкл B: 25 мкл попереднього розведення A	90 мкл розчинника зразка 225 мкл розчинника зразка	100
1 : 1000	B: 10 мкл зразка мкл попереднього розведення A B: 25 розведення A	мкл культурального середовища 990 225 мкл розчинника зразка	1000
1: 2000	B: 10 мкл зразка мкл попереднього розведення A B: 10 розведення A	мкл культурального середовища 390 мкл розчинника 490 зразка	2000

- Визначте кількість стріпів для мікролунок, необхідних для тестування бажаної кількості зразків, а також відповідну кількість лунок, необхідних для запуску бланк і стандартів. Кожен зразок, стандарт, бланк і необов'язковий контрольний зразок слід аналізувати в двох примірниках. Вийміть додаткові стріпи з мікролунками з тримача та зберігайте їх у пакеті з фольги з щільно закритим осушувачем, що постачається при температурі 2°-8°C.
- Приготуйте кон'югат біотин (див. Приготування кон'югату біотин 9.3).
- Двічі промийте стріпи з мікролунками приблизно по 400 мкл промивного буфера на лунку з ретельною аспірацією вмісту мікролунок між промиваннями. Дайте промивному буферу постояти в лунках приблизно 10-15 секунд перед аспірацією. Слідкуйте за тим, щоб не подряпати поверхню мікролунок.
Після останнього етапу промивання спорожніть лунки та постукайте стріпами мікролунок по абсорбуючій прокладці або паперовому рушнику, щоб видалити надлишок промивного буфера. Використовуйте стріпи з мікролунками відразу після промивання. В якості альтернативи стріпи з мікролунками можна покласти догори дном на вологий абсорбуючий папір не довше ніж на 15 хвилин. Не допускати висихання лунок.
- Стандартне розведення на мікролунковому планшеті (Альтернативно стандартне розведення можна приготувати в пробірках - див. 9.5.1.): Додайте 100 мкл розчинника зразка в двох примірниках у всі лунки стандартів. Внесіть піпеткою 100 мкл підготовленого стандарту (див. Підготовка стандарту 9.5.1., концентрація = 2400,0 пг/мл) у двох примірниках у лунки A1 та A2 (Таблиця 1). Змішайте вміст лунок A1 і A2 шляхом повторної аспірації та викиду (концентрація стандарту 1, S1 = 1200,0 пг/мл) і перенесіть 100 мкл у лунки B1 і B2 відповідно (див. рисунок 7). Слідкуйте за тим, щоб не подряпати внутрішню поверхню мікролунок. Продовжуйте цю процедуру 5 разів, створюючи два ряди стандартних розведень ІЛ-2 людини в діапазоні від 1200,0 до 18,8 пг/мл. Видаліть 100 мкл вмісту останніх використаних мікролунок (G1, G2).

Малюнок 6





У разі зовнішнього стандартного розведення (див. 9.5.1), внесіть піпеткою 100 мкл цих стандартних розведень (S1 - S7) у лунки стандартів відповідно до таблиці 1.

Таблиця 1 Приклад розташування бланк, стандартів і зразків у мікролункових стріпах.

	1	2	3	4
A	Стандарт 1 (1200,0 пг/мл)	Стандарт 1 (1200,0 пг/мл)	Зразок 1	Зразок 1
Б	Стандарт 2 (600,0 пг/мл)	Стандарт 2 (600,0 пг/мл)	Зразок 2	Зразок 2
С	Стандарт 3 (300,0 пг/мл)	Стандарт 3 (300,0 пг/мл)	Зразок 3	Зразок 3
Д	Стандарт 4 (150,0 пг/мл)	Стандарт 4 (150,0 пг/мл)	Зразок 4	Зразок 4
Е	Стандарт 5 (75,0 пг/мл)	Стандарт 5 (75,0 пг/мл)	Зразок 5	Зразок 5
Ф	Стандарт 6 (37,5 пг/мл)	Стандарт 6 (37,5 пг/мл)	Зразок 6	Зразок 6
Г	Стандарт 7 (18,8 пг/мл)	Стандарт 7 (18,8 пг/мл)	Зразок 7	Зразок 7
Х	Бланк	Бланк	Зразок 8	Зразок 8

- Додайте по 100 мкл розчинника зразка в двох примірниках у лунки бланк.
- Додайте 50 мкл розчину для зразків у всі лунки для зразків.
- Додайте по 50 мкл кожного зразка в дублікатах у лунки для зразків.
- 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 зі швидкістю 400 об/хв.
- Приготуйте Стрептавідин-HRP (див. Приготування Стрептавідин-HRP 9.4.).
- Зніміть клейку плівку та спорожніть лунки. Промийте мікролункові стріпи 6 разів згідно з пунктом 4 протоколу тестування. Негайно переходьте до наступного кроку.
- Додайте 100 мкл розведеного Стрептавідин-HRP у всі лунки, включаючи пусті лунки.
- Накрийте клейкою плівкою та інкубуйте при кімнатній температурі (18-25°C) протягом 1 години, якщо є, на шейкері для мікропланшетів, встановлений на 400 об/хв.
- Зніміть клейку плівку та спорожніть лунки. Промийте мікролункові стріпи 6 разів згідно з пунктом 4 протоколу тестування. Негайно переходьте до наступного кроку.
- Внесіть піпеткою 100 мкл розчину субстрату ТМБ у всі лунки.
- Інкубуйте стріпи з мікролунками при кімнатній температурі (від 18° до 25°C) протягом приблизно 30 хв. Уникайте прямого впливу інтенсивного світла.
Слід контролювати розвиток кольору на планшеті та зупинити реакцію субстрату (див. наступний пункт цього протоколу) до того, як позитивні лунки більше не будуть належним чином записані.

Визначення ідеального періоду часу для розвитку кольору має проводитися окремо для кожного аналізу.

Рекомендується додавати стоп-розчин, коли найвищий стандарт набув темно-синього кольору. Як альтернатива, розвиток кольору можна контролювати за допомогою рідера ІФА при 620 нм. Реакцію субстрату слід припинити, як тільки Стандарт 1 досягне ОГ 0,9 – 0,95.

18. Зупиніть ферментну реакцію, швидко ввівши 100 мкл стоп-розчину в кожну лунку. Важливо, щоб стоп-розчин швидко і рівномірно розподілявся по мікролунках, щоб повністю інактивувати фермент. Результати необхідно зчитувати відразу після додавання стоп-розчину або протягом однієї години, якщо мікролункові стріпи зберігаються при 2-8°C у темряві.
19. Зчитуйте поглинання кожної мікролунки на спектрофотометрі, використовуючи 450 нм як довжину первинної хвилі (за бажанням 620 нм як еталонну довжину хвилі; допустимо від 610 нм до 650 нм). Запустіть рідер планшетів згідно з інструкціями виробника, використовуючи лунки бланк. Визначте поглинання як зразків, так і стандартів.

11. РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

- Обчисліть середні значення поглинання для кожного набору дублікатів стандартів і зразків. Дублікати мають бути в межах 20 відсотків від середнього значення.
- Створіть стандартну криву, побудувавши середнє поглинання для кожної стандартної концентрації на ординаті проти концентрації людського ІЛ-2 на осі абсцис. Намалюйте криву найкращої відповідності через точки графіка (рекомендується крива відповідності з 5 параметрами).
- Щоб визначити концентрацію циркулюючого людського ІЛ-2 для кожного зразка, спочатку знайдіть середнє значення поглинання на ординаті та проведіть горизонтальну лінію до стандартної кривої. У точці перетину протягніть вертикальну лінію до осі абсцис і зчитайте відповідну концентрацію ІЛ-2 людини.
- Зразки сироватки, плазми та контрольні зразки були розведені 1:2 (50 мкл зразка + 50 мкл розчинника зразка (1x)), концентрацію, зчитану зі стандартної кривої, необхідно помножити на коефіцієнт розведення (x 2).
- Якщо було виміряно супернатанти клітинної культури, концентрацію, зчитану зі стандартної кривої, необхідно помножити на індивідуальний коефіцієнт попереднього розведення (y) і коефіцієнт розведення (2) аналізу (x 2y).
- Розрахунок зразків із концентрацією, що перевищує стандарт 1, може призвести до неправильного низького рівня ІЛ-2 людини (Хук ефект). Такі зразки вимагають додаткового зовнішнього попереднього розведення відповідно до очікуваних значень людського ІЛ-2 за допомогою розріджувача зразка, щоб точно визначити фактичний рівень людського ІЛ-2.
- Рекомендується, щоб кожна установа для тестування створювала контрольний зразок відомої концентрації людського ІЛ-2 і запускала цей додатковий контроль з кожним аналізом. Якщо отримані значення виходять за межі очікуваного діапазону контролю, результати аналізу можуть бути недійсними.
- Типова стандартна крива показана на малюнку 8. Цю криву не можна використовувати для отримання результатів тесту. Кожна лабораторія повинна підготувати стандартну криву для кожної групи аналізованих мікролункових стріпів.

Рисунок 8. Типова стандартна крива для ІФА ІЛ-2 людини. ІЛ-2 людини розводили послідовними 2-кратними кроками в розчиннику зразка. Не використовуйте цю стандартну криву для отримання результатів тесту. Для кожної групи мікролункових стріпів необхідно провести стандартну криву.



Таблиця 2

Типові дані за допомогою ІФА ІЛ-2 людини. Довжина хвилі вимірювання: 450 нм. Референтна довжина хвилі: 620 нм

Стандарт	ІЛ-2 людини Концентрація (пг/мл)	ОГ при 450 нм	Середня ОГ при 450 нм	CV (%)
1	1200,0	2,996 3,020	3,008	0,4%
2	600,0	1,683 1,706	1,694	0,7%
3	300,0	0,836 0,795	0,815	2,6%
4	150,0	0,444 0,430	0,437	1,5%
5	75,0	0,243 0,241	0,242	0,3%
6	37,5	0,150 0,144	0,147	2,0%
7	18,8	0,098 0,095	0,096	1,3%
Бланк	0	0,053 0,055	0,054	

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

12. ОБМЕЖЕННЯ

- Оскільки точні умови можуть відрізнятися від аналізу до аналізу, стандартна крива повинна бути встановлена для кожного запуску.
- Бактеріальне або грибкове забруднення зразків або реагентів, або перехресне забруднення між реагентами, може призвести до помилкових результатів.
- Перевагу віддають одноразовим наконечникам для піпеток, колбам або скляному посуду, багаторазовий скляний посуд перед використанням необхідно вимити та ретельно промити від усіх миючих засобів.
- Неправильне або недостатнє миття на будь-якому етапі процедури призведе до помилкових результатів. Повністю спорожніть лунки перед подачею свіжого промивного розчину, заповніть буфером для промивання, як зазначено для кожного циклу промивання, і не дозволяйте лункам залишатися відкритими або висихати протягом тривалого часу.
- Застосування радіоімунотерапії значно збільшило кількість зразків з антитілами IgG людини (НАМА) анти мишачими.. НАМА може заважати аналізам з використанням мишачих моноклональних антитіл, що призводить до помилкових результатів. Зразки сироватки, що містять антитіла до мишачих імуноглобулінів, все ще можна аналізувати в таких аналізах, коли до зразка додають імуноглобуліни мишей (сироватка, асцитична рідина або моноклональні антитіла невідповідної специфічності).

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Чутливість

Межа виявлення людського ІЛ-2, визначена як концентрація аналіту, що призводить до поглинання, значно вище, ніж у середовища розведення (середнє значення плюс 2 стандартних відхилення), було визначено як 9,1 пг/мл (середнє 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 4 зразків сироватки та 4 зразків супернатанту клітинної культури, що містять різні концентрації людського ІЛ-2. На кожній пластині було проведено 2 стандартні криві. Дані нижче показують середню концентрацію ІЛ-2 людини і коефіцієнт варіації для кожного зразка (див. таблицю 3). Розрахований загальний коефіцієнт варіації в межах аналізу становив 7,0%.

Таблиця 3 Середня концентрація ІЛ-2 людини та коефіцієнт варіації для кожного зразка

Зразок	Експеримент	Середній ІЛ-2 людини Концентрація (пг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	1	2065.2	3,3%
	2	2062.9	3,7%
	3	2239.6	3,9%
2	1	1616.5	5,0%
	2	1476.6	6,8%
	3	1491.1	3,1%
3	1	1036.9	7,6%
	2	1065.8	7,6%
	3	1082.5	5,5%
4	1	595.9	6,1%
	2	638.7	4,0%
	3	696.8	10,0%
5	1	426.5	4,0%
	2	419.5	9,5%
	3	406.1	12,0%
6	1	210.8	11,6%
	2	195.8	7,4%
	3	207.1	8,8%
7	1	88.4	14,8%
	2	103.6	5,5%
	3	104.3	6,6%

13.2.2. Між аналізами

Відтворюваність аналізу в межах однієї лабораторії була оцінена в 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повтореннями 8 зразків супернатанту клітинної культури, що містять різні концентрації ІЛ-2 людини. На кожному планшеті було проведено 2 стандартні криві. Дані нижче показують середню концентрацію ІЛ-2 людини і коефіцієнт варіації, розрахований за 18 визначеннями кожного зразка (див. таблицю 4). Розрахований загальний міждослідний коефіцієнт варіації становив 5,0%.

Середня концентрація ІЛ-2 людини та коефіцієнт варіації кожного зразка

Зразок	Середній ІЛ-2 людини Концентрація (пг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	2122.6	4,8 %
2	1528.1	5,0 %
3	1061.7	2,2 %
4	643.8	7,9 %
5	417.4	2,5 %
6	204.6	3,8 %
7	98.8	9,1 %

13.3. Відновлення збагаченням

Відновлення збагаченням оцінювали шляхом додавання 3 рівнів ІЛ-2 людини в об'єднані зразки нормальної людської сироватки та цитратної плазми. Відновлення визначали в 2 незалежних експериментах по 4 повторення кожен. Сироватка та плазма без добавок використовувалися як бланк в цих експериментах. Дані відновлення див. у таблиці 5. Таблиця 5

Зразок матриці	Збагачення високе		збагачення середнє		збагачення низьке	
	Середнє (%)	Діапазон (%)	Середнє (%)	Діапазон (%)	Середнє (%)	Діапазон (%)
Сироватка	94	80 - 111	102	95 - 114	105	91 - 118
плазма (EDTA)	103	93 - 110	94	86 - 106	97	73 - 111
плазма (цитрат)	117	114 - 118	101	95 - 110	98	82 - 115
плазма (гепарин)	115	110 - 119	102	91 - 113	93	73 - 105
Супернатант клітинної культури	110	106 - 116	109	98 - 120	108	95 - 121

13.4. Паралелізм розведення

Зразки сироватки, плазми (ЕДТА, цитрат, гепарин), супернатант клітинної культури з різними рівнями людського ІЛ-2 аналізували в серійних 2-кратних розведеннях з 4 повторами кожен. Дані див. у Таблиці 6).

Таблиця 6

Зразок матриці	Відновлення Ехр. значення		
	Розведення	Середнє (%)	Діапазон (%)
Сироватка	1:4	89	82 - 95
	1:8	84	80 - 90
	1:16	80	73 - 85
плазма (EDTA)	1:4	97	92 - 102
	1:8	92	82 - 104
	1:16	98	97 - 122
плазма (цитрат)	1:4	93	87 - 98
	1:8	89	83 - 99
	1:16	91	83 - 103
плазма (гепарин)	1:4	92	89 - 96
	1:8	90	81 - 95
	1:16	94	82 - 109
Супернатант клітинної культури	1:4	96	94 - 99
	1:8	86	81 - 90
	1:16	86	82 - 90

13.5. Стабільність зразка

13.5.1. Стабільність заморожування-відтавання

Аліквоти зразків сироватки та супернатанту клітинної культури (з добавками чи без добавок) зберігали при -20°C і розморожували 5 разів, а також визначали рівні IL-2 людини. Не було виявлено значної втрати імунореактивності IL-2 людини протягом 3 циклів заморожування та відтавання.

Значне зниження імунореактивності IL-2 людини (20%) було виявлено при подальших циклах заморожування-відтавання.

13.5.2. Стабільність зберігання

Аліквоти зразків супернатанту сироватки та клітинної культури (з добавками чи без добавок) зберігали при -20°C, 2-8°C, кімнатній температурі (КТ) та 37°C, а рівень IL-2 людини визначали через 24 години. Під час зберігання при -20°C, 2-8°C і КТ не було виявлено значної втрати імунореактивності людського IL-2.

Значна втрата імунореактивності IL-2 людини (20%) була виявлена під час зберігання при 37°C через 24 години.

13.6. Специфічність

Перехресну реактивність та вплив циркулюючих факторів імунної системи оцінювали шляхом введення цих білків у фізіологічно відповідних концентраціях у сироватку, позитивну на ІЛ-2 людини. Перехресної реактивності чи перешкод не виявлено.

РЕЗЮМЕ ПІДГОТОВКИ РЕАГЕНТІВ**Буфер для****промивання (1х)**

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

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

Буфер для аналізу (1х)

14.2. Додайте концентрат буфера для аналізу 20х (5 мл) до 95 мл дистильованої води.

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

14.3. Біотин-кон'югат

Розведіть 1:100 кон'югат біотин в буфері для аналізу (1х):

Кількість стріпів	Кон'югат біотин (мл)	Буфер для аналізу (1х) (мл)
1 - 6	0,03	2,97
1 - 12	0,06	5.94

14.4. Стрептавідин-HRP

Розведіть стрептавідин-HRP 1:100 у буфері для аналізу (1х):

Кількість стріпів	Стрептавідин-HRP (мл)	Буфер для аналізу (1х) (мл)
1 - 6	0,06	5.94
1 - 12	0,12	11.88

14.5. Стандарт ІЛ-2 людини

Розведіть ліофілізований стандарт ІЛ-2 людини дистильованою водою. (Об'єм розчинення вказано на етикетці стандартного флакона.)

14.6. Контролі

Відновіть ліофілізовані контролі, додавши дистильовану воду (10-30 хвилин). Об'єм розчинення вказано на етикетці контрольного флакона.

15. РЕЗЮМЕ ПРОТОКОЛУ ТЕСТУВАННЯ

1. Попередньо розведіть супернатанти клітинної культури за допомогою розчинника зразка.
2. Визначте необхідну кількість мікролункових стріпів.
3. Приготуйте біотин-кон'югат.
4. Двічі промийте мікролункові стріпи промивним буфером.
5. Стандартне розведення на мікролунковому планшеті: Додайте 100 мкл розчинника зразка в дублікатах у всі стандартні лунки. Внесіть піпеткою 100 мкл підготовленого стандарту в перші лунки та створіть стандартні розведення шляхом перенесення 100 мкл з лунки в лунку. Видаліть 100 мкл з останніх лунок.
Як альтернатива зовнішнього стандартного розведення в пробірках (див. 9.5.1): внесіть піпеткою 100 мкл цих стандартних розведень у стріпи для мікролунок.
6. Додайте 100 мкл розчинника зразка в дублікатах у лунки бланк.
7. Додайте 50 мкл розчинника зразка в дублікатах у лунки для зразків.
8. Додайте 50 мкл зразка в дублікатах у призначені лунки для зразків.
9. Додайте 50 мкл біотин-кон'югату в усі лунки.
10. Накрийте стріпи з мікролунками та інкубуйте 2 години при кімнатній температурі (18°-25°C).
11. Приготуйте стрептавідин-HRP.
12. Опустіть і промийте мікролункові стріпи 6 разів промивним буфером.
13. Додайте 100 мкл розведеного Стрептавідин-HRP у всі лунки.
14. Накрийте стріпи з мікролунками та інкубуйте 1 годину при кімнатній температурі (18°-25°C).
15. Опустіть і промийте мікролункові стріпи 6 разів промивним буфером.
16. Додайте 100 мкл розчину субстрату ТМБ у всі лунки.
17. Інкубуйте стріпи з мікролунками приблизно 30 хвилин при кімнатній температурі (18°-25°C).
18. Додайте 100 мкл стоп-розчину в усі лунки.
19. Налаштуйте на бланк мікролунковий рідер та виміряйте інтенсивність кольору при 450 нм.

Примітка. Зразки сироватки, плазми та контрольних зразків були розведені 1:2 (50 мкл зразка + 50 мкл розчинника зразка (1x)), концентрацію, зчитану зі стандартної кривої, необхідно помножити на коефіцієнт розведення (x 2). Якщо було виміряно супернатанти клітинної культури, концентрацію, зчитану зі стандартної кривої, необхідно помножити на індивідуальний коефіцієнт попереднього розведення (y) і коефіцієнт розведення (2) аналізу (x 2y).

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.

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

Маркування небезпечних речовин відповідає європейській директиві.

Для отримання додаткових класифікацій для окремих країн, будь ласка, зверніться до відповідного паспорта безпеки.

IBL International GmbH



Flughafenstrasse 52a
22335 Гамбург, Німеччина

Телеф

он: +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