

Інтерлейкін-10 високої чутливості ІФА

Імуноферментний аналіз для
кількісного виявлення ІЛ-10 людини.

REF BE58101

 **96**

   **2-8°C**

Тільки для дослідницьких цілей
Не для використання в діагностичних процедурах



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

Flughafenstrasse 52a
D-22335 Hamburg, Germany

Phone: +49 (0)40-53 28 91-0
Fax: +49 (0)40-53 28 91-11

IBL@IBL-International.com
www.IBL-International.com

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

1. Очікуване використання

ІЛ-10 людини ІФА - це імуноферментний аналіз, пов'язаний з ферментами, для кількісного виявлення ІЛ-10 людини. Тільки для досліджень. Не використовується для діагностичних процедур.

2. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Інтерлейкін-10 - це плейотропний цитокін, який відіграє важливу роль як регулятора лімфоїдної та мієлоїдної клітинної функції. Завдяки здатності

IL-10 для блокування синтезу цитокінів та декількох функцій допоміжних клітин макрофагів цим цитокіном є потужний супресор ефektorних функцій макрофагів, Т-клітин і NK-клітин. Крім того, IL-10 бере участь у регуляції проліферації та диференціювання В-клітин, тучних клітин і тимоцитів.

Первинна структура людського IL-10 була визначена шляхом клонування кДНК, що кодує цитокіни.

Відповідний білок проявляє 160 амінокислот із прогнозованою молекулярною масою 18,5 кДа. Виходячи з його

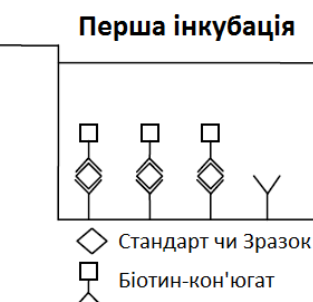
первинної структури, IL-10 є членом сімейства цитокінів, що складається з чотирьох спіралей. У розчині IL-10 людини є гомодимер з видимою молекулярною масою 39 кДа. Хоча він містить N-зв'язане місце глікозилювання, він не вистачає виявлених вуглеводів. Таким чином, рекомбінантний білок, експресований в *E. coli*, зберігає всі відомі біологічні діяльності. Людський ген IL-10 розташований на хромосомі 1 і присутній у вигляді єдиної копії.

2. Принцип аналізу.



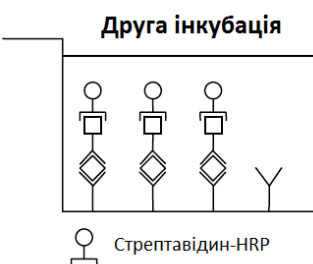
Малюнок 1.

Анти- людський IL-10 покриття антитілами абсорбується на мікролунки.



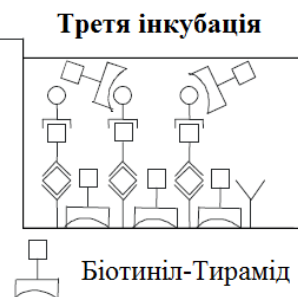
Малюнок 2.

IL-10 людини, присутній в зразку або стандарті, зв'язується з антитілами, адсорбованими на мікропланшеті. Біотин-кон'юговане анти-людське IL-10 антитіло додається і зв'язується до IL-10 захопленого першим антитілом.



Малюнок 3

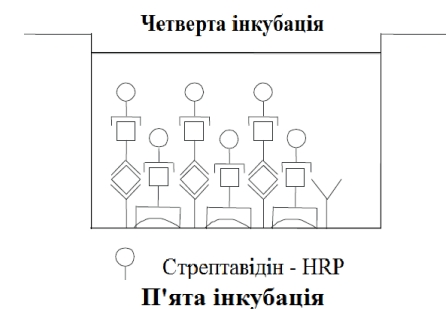
Після інкубації незв'язане біотин-кон'юговане анти людське IL-10 антитіло видаляють під час етапу промивання. Стрептавідин- HRP додають і зв'язується з біотин-кон'югованим антитілом анти-людського IL-10.



Малюнок 4.

Після інкубації незв'язаний Стрептавідин-HRP видаляється під час етапу промивання та реактив для ампліфікації 1 (біотиніл-Тирамід) додають у лунки.

Малюнок 5



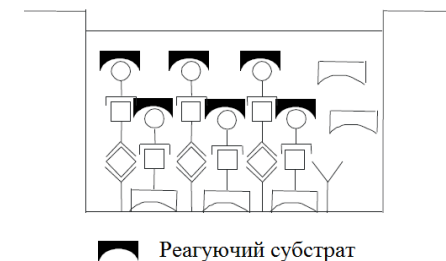
Після інкубації незв'язаний ампліфікуючий реагент 1 видаляється під час стадії промивки, і ампліфікуючий реагент 2 (стрептавідін HRP) додається.

Малюнок 6



Після інкубації незв'язаний ампліфікуючий реагент 2 видаляється під час етапу промивання і розчин субстрату реагує з HRP доданим.

Малюнок 7



Кольоровий продукт утворюється пропорційно до кількості TNF- α людини, присутнього у зразку або стандарті. Реакція закінчується додаванням кислоти і поглинання вимірюється при 450 нм. Стандартна крива готується з 7 стандартних розчинів IL-10 людини та визначається концентрація зразка IL-10 людини.

4. Принцип реакції ампліфікації

Реакція ампліфікації заснована на технології PerkinElmer Life Sciences TSA™.

Реагент ампліфікації 1 містить біотиніл-тірамід. HRP перетворює декілька молекул біотиніл-тіраміду в високореактивні похідні (вільні радикали). Ці вільні радикали ковалентно зв'язуються з будь-яким білком у лунці.

Таким чином, кількість прореагуваного біотиніл-тіраміду пропорційна кількості HRP в лунці.

Після інкубації незв'язаний біотиніл-тірамід видаляють під час етапу промивання. Реагент для ампліфікації 2 містить стрептавідін-HRP, який зв'язується з сайтами біотину, створеними під час реакції біотиніл-тіраміду, таким чином розмноження молекул HRP можливе на поверхні для реакції субстрату.

5. Реагенти надані

MTP 1 алюмінієвий пакет з Мікропланшетом (12 стріпв по 8 лунок кожна) з покриттям з моноклональним антитілом до IL-10 людини

BIOTIN CONC 1 флакон (70 мкл біотин-кон'югату анти-людського IL-10 людини моноклонального антитіла

ENZCONJ CONC 1 флакон (150 мкл) Стрептавидин-HRP

CAL LYO 2 флакони IL-10 людини Стандарт ліофілізований, 400 пг / мл після відновлення

CONTROL LYO 1 флакон Контроль позитивний ліофілізований

AMPLIF 1 CONC 2 флакони (75 мкл) ампліфікуючий реагент 1 (примітка : реагент містить етил алкоголь)

AMPLIF 2 CONC 1 флакон (15 мкл) Ампліфікуючий реагент 2

AMPLIFDIL CONC 1 флакон (7 мл) ампліфікуючого розчинника концентрат (2x)

SAMPLEDIL 2 флакон (12 мл) буфер розчинника зразку

SUBS 1 флакон (15 мл) Розчин субстрату (тетраметілбензидін)

WASHBUF CONC 2 флакони (50 мл) промивного буферу концентрат для промивання 20x (PBS з 1% Tween 20)

ASSAYBUF CONC 1 флакон (5 мл) Концентрат буфера аналізу 20x (PBS з 1% Tween 20, 10% BSA)

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

8 Клейких плівок

6 Інструкції з зберігання - Набір ІФА

Зберігайте реактиви від 2 до 8 ° С за винятком контролів. Зберігайте ліофілізовані контролі при -20°C. Відразу після використання залишок реагентів слід повернути в холодне зберігання (від 2 ° до 8 ° С), контролі -20°C відповідно. Термін придатності набору і реагентів вказаний на етикетках. Термін придатності набору може бути гарантований, тільки якщо компоненти зберігаються належним чином, і якщо в разі повторного використання одного компонента цей реагент не забруднений першою обробкою.

7 Інструкції щодо збору та зберігання зразків

Супернатант клітинної культури *, сироватки і плазми (плазма з цитратом, плазма з гепарином) були проаналізовані за допомогою цього аналізу. Видаляють сироватку або плазму з згустку або клітин якнайшвидше після згортання і сепарації.

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

Зразки повинні бути аліквотовані і повинні зберігатися замороженими при температурі -20 ° С для уникнення втрати біоактивного IL 10 людини . Якщо зразки повинні бути прогнані протягом 24 годин вони можуть зберігатися при температурі від 2 до 8 ° С (зверніться до «стабільність зразка 14.5).

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

7 Матеріали необхідні, але не надані

- 5 мл і 10 мл градуйовані піпетки
- 5 мкл до 1000 мкл регульованих одноканальних мікропіпеток з одноразовими наконечниками
- 50 мкл до 300 мкл регульованої багатоканальної мікропіпетки з одноразовими наконечниками
- Багатоканальний резервуар для мікропіпеток
- Мензурки, колби, балони, необхідні для приготування реагентів
- Пристрої для доставки м'якого розчину (багатоканальна мийна пляшка або автоматична промивочна система)
- Шейкер для мікропланшетів
- Рідер мікропланшетів, здатний зчитувати при 450 нм (620 нм як необов'язкова довжина хвилі)
- Дистильована в склі або дейонізована вода
- Статистичний калькулятор з програмою для регресійного аналізу

8 ПОПЕРЕДЖЕННЯ для використання

-Всі хімікати слід розглядати як потенційно небезпечні. Ми тому рекомендуємо, щоб цей продукт оброблявся лише особами, які пройшли підготовку з лабораторної техніки і щоб набір використовувався у відповідності з принципами належної лабораторної практики.

Використовуйте захисний одяг, наприклад, лабораторний комбінезон, безпечні окуляри та рукавички. Слід уникати контакту зі шкірою або очима. У разі контакту зі шкірою або очима негайно промити з водою. Див. Паспорт (и) з безпеки матеріалу та / або заяву з безпеки (рекомендації) для конкретних порад.

- Реагенти призначені тільки для досліджень і не призначені для використання в діагностичних або терапевтичних процедурах.

- Не змішуйте і не замінюйте реагенти з реагентами з інших джерел.

– Не використовуйте реагенти набору після закінчення терміну придатності на етикетці.

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

- Не піпетувати ротом.

- Не їжте і не курите в місцях, де реагенти або зразки набору обробляються.

Уникайте контакту шкіри або слизових оболонок з реагентами набору або зразками.

- Під час роботи з реагентами набору або зразками слід носити 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 реактивів або зразків, які можуть призвести до недійсності тесту, використовуйте одноразові наконечники піпеток і / або піпетки.

- Використовуйте чисті, спеціальні підставки для дозування кон'югату та реагенту субстрату.

- Вплив кислоти інактивує кон'югат.

- Для підготовки реагенту слід використовувати дистильовану у склі воду або дейонізовану воду.

- Розчин субстрату перед використанням повинен бути при кімнатній температурі.
- Дезактивувати та утилізувати зразки та всі потенційно забруднені матеріали, оскільки вони можуть містити інфекційні агенти. Кращим способом дезактивації є автоклавування протягом мінімум 1 годину при 121,5 ° С.
- Рідкі відходи, що не містять кислоти та нейтралізовані відходи, можуть бути змішані з гіпохлоритом натрію в обсягах, таким чином, щоб кінцева суміш містила 1,0% гіпохлориту натрію. Дозвольте 30 хвилин для ефективного знезараження. Рідкі відходи, що містять кислоти, повинні бути нейтралізовані до додавання гіпохлориту натрію.

10. Підготовка реагентів

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

10.1. Промивний буфер (1x)

1. Залити весь вміст (50 мл) промивного буфера концентрату (20x) у чистий 1000-мл градуйований циліндр. Доведіть до кінцевого об'єму 1000 мл з дистильованою в склі або дейонізованою водою. М'яко змішайте, щоб уникнути спінювання.
2. Перемістіть до чистої промивної пляшки та зберігайте при температурі від 2 до 25 ° С. Будь-ласка, зверніть увагу, що промивний буфер (1x) стабільний протягом 30 днів.
3. Промивний буфер (1x) також може бути приготовлений у відповідності з наведеною нижче таблицею:

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

10.2. Буфер аналізу (1x)

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

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

10.3. Біотин-кон'югат

1. Пам'ятайте, що біотин-кон'югат повинен використовуватися протягом 30 хвилин після розбавлення.
2. Зробіть 1:200 розчин концентрованого біотин-кон'югата розчину з буфером аналізу (1x) у чистій пластиковій пробірці, як необхідно відповідно до наведеної таблиці:

Кількість стріпів	Біотин- кон'югат мл	Буфер аналізу (1x) (мл)
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

9.4. Стрептавідин-HRP.

Будь ласка, зверніть увагу на те, що стрептавідин-HRP слід використовувати протягом 30 хвилин після розведення.

Зробіть розчин 1:200 концентрованого розчину Стрептавідин-HRP з буфером аналізу(1x) у чистій пластиковій пробірці в міру необхідності відповідно до наведеної таблиці :

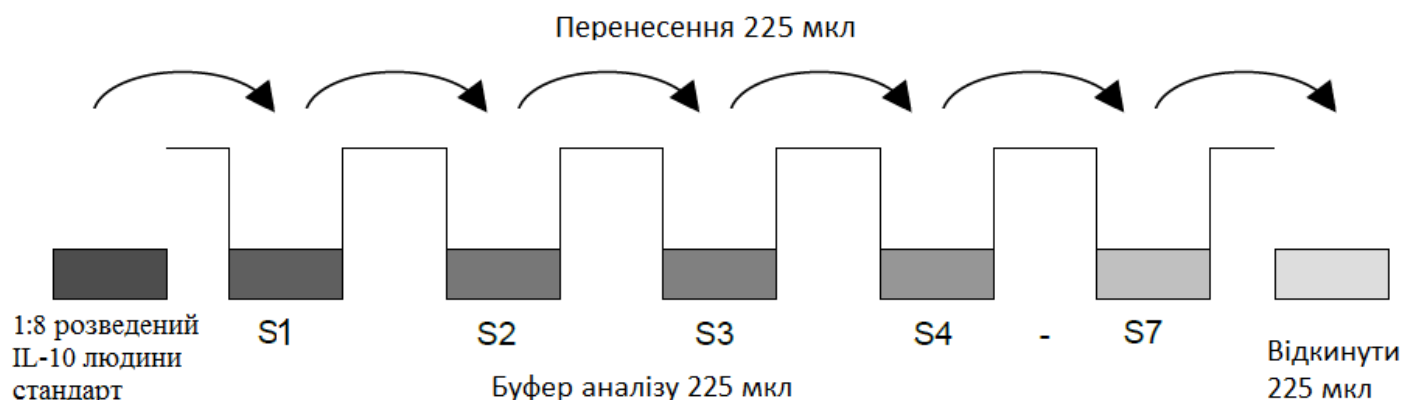
Кількість стріпів	Стрептавідин-HRP, мл	Буфер аналізу (1x) (мл)
1-6	0,03	5,97
1-12	0,06	11,94

10.5. Стандарт IL10 людини

- 1.Відновіть IL 10 людини **стандарт** шляхом додавання дистильованої води. Обсяг відновлення вказаний на етикетці флакона стандарту. Оберніть або обережно змішайте, щоб забезпечити повне і однорідне розчинення (концентрація відновленого стандарту = 400 пг / мл).
- 2.Дозвольте стандарту відновитися протягом 10-30 хвилин. Змішайте лунки до виробництва розчину. Після використання стандарт, що залишився, не може бути збережений і повинен бути видалений.
3. Після використання залишившийся стандарт не може бути збережений і його потрібно видалити.
4. Концентрований стандарт IL-10 людини повинен бути розведений 1:8 розріджувачем зразка безпосередньо перед використанням , очистити пластикову пробірку згідно з наступною схемою розведення: 100 мкл концентрованого IL-10 людини стандарт + 700 мкл Розчинник зразка. Обережно перемішати, щоб змішати (концентрація стандарту = 50 пг / мл).
5. **Стандартні розведення** можна одержувати безпосередньо на планшеті (див. 11с) або, як альтернатива, у пробірках (див. 10.5.1) .

10.5.1. Зовнішнє стандартне розведення.

- 1.Позначте 7 пробірок, по одній для кожної стандартної точки.
S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7
 2. Потім готуйте 1:2 серійні розведення для стандартної кривої наступним чином: прокапати 225 мкл розчинника зразку у кожену пробірку.
 - 3.Прокапати 225 Мкл відновленого стандарту (концентрація стандарту = 50 пг/мл) у першу пробірку, позначену як S1, та змішайте (концентрація стандарту 1 = 25 пг / мл).
 4. Прокапати 225 мкл цього розчину у другу пробірку, позначену S2, та змішайте ретельно перед наступним перенесенням.
 - 5.Повторно повторюйте серійні розведення ще 5 разів, створюючи таким чином точки стандартної кривої (див. Мал. 7).
- Розчинник зразка служить як бланк.
Малюнок 8 .



10.6. Контролі

1. Відновити, додаючи 400 мкл дистильованої води до ліофілізованих контролів (10-30 хвилин). Прокрутити або обережно перемішайте для забезпечення повної та однорідної солюбілізації. Попередньо розчиніть солюбілізований контроль 1:9 у розчиннику зразку: 100 мкл контролю + 800 мкл Розчинник для зразків.
2. Далі обробляйте контролі, як ваші зразки в аналізі. Для діапазону контролів зверніться до сертифіката аналізу або етикетки на флаконі. Зберігати відновлений контроль аликвотованим при температурі -20 ° C. Уникайте циклів повторного заморожування та відтавання.

10.7. Ампліфікаційний розчинник (1x)

Приготування ампліфікаційного розріджувача (1x) потрібно проводити безпосередньо перед використанням. Зробіть розведення 1: 2

концентрований розчинник для ампліфікації (2x) за потребою згідно з наступною таблицею :

Кількість стріпів	Ампліфікаційний розчинник (2x) (2x) мл	Дистильована вода (мл)
1-6	3	3
1-12	6	6

10.8. Ампліфікаційний розчин 1

1. Підготуйте ампліфікаційний розчин 1 безпосередньо перед нанесенням на тарілку.
2. Розвести ампліфікаційний реагент I в ампліфікаційному розчиннику (1х), як зазначено в сертифікаті аналізу.
3. Видаліть негайно будь-який попередньо розведений ампліфікаційний розчин 1 після використання.

10.9. Ампліфікаційний розчин 2

1. Підготуйте ампліфікаційний розчин 2 безпосередньо перед нанесенням на планшет.
2. Флакон центрифугують протягом декількох секунд у мікроцентріфузі перед відкриттям для збору рідини, що потрапила у кришку.
3. Розбавити ампліфікуючий реагент II в буфері для аналізу (1х), як зазначено в сертифікаті аналізу.
4. Видалити негайно будь-який попередньо розроблений ампліфікаційний розчин 2 після використання

11 Протокол аналізу

ВАЖЛИВО!

- Оскільки цей ІФА є системою з високою чутливістю, надзвичайно важливо дотримуватися інструкції (процедура промивання, хронологія та приготування розчинів, час інкубації) для отримання оптимальної продуктивності тесту .
- Ампліфікуючий розчин необхідно підготувати безпосередньо перед нанесенням на планшет. Надзвичайно важливо промити лунки належним чином, щоб отримати хорошу продуктивність тесту.
- Струшування абсолютно необхідне для оптимальної роботи тесту. Захищайте мікропланшет від світла під час етапу інкубації.

1. Визначити кількість мікролунок, необхідних для тестування бажаної кількості зразків плюс відповідну кількість необхідних лунок для прогону бланків і стандартів. Кожен зразок, стандартний, порожній і необов'язковий контрольний зразок повинен бути проаналізований у дублікатах. Видалити додаткові стріпи мікропланшета з тримача і зберігати в пакеті з фольги з осушувачем наданим при 2 ° -8 ° C герметично закритим.

2. Промийте мікролунок двічі приблизно з 400 мкл промивного буфера на лунку з ретельною аспірацією вмісту мікролунок між промиваннями. Дозвольте промивочному буферу знаходитись в лунках 10 - 15 секунд до аспірації. Рекомендується замочування між промиваннями для отримання хорошої продуктивності аналізу ! Будьте обережні, щоб не подряпати поверхню мікролунок. Після останнього кроку промивання опорожнити лунки

і торкніться постукайте стріпами мікропланшета об абсорбуючий папір або паперовий рушник, щоб видалити зайвий пральний буфер. Використовуйте

стріпи мікролунок відразу після миття. Не дозволяйте лункам висохнути.

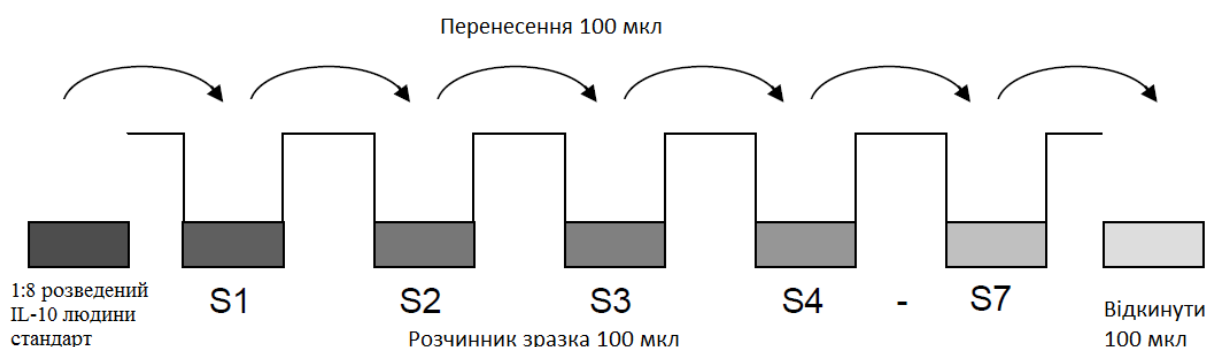
3. Стандартне розведення на мікропланшеті (альтернативно стандартне розведення можна приготувати в пробірках - див.10.5.1):

Додають по 100 мкл розчинника зразку у дублікатах до всіх лунок стандартів.

Прокапайте 100 мкл підготовленого стандарту (див.10.5 Стандарт ІЛ-10 людини , концентрація = 50 пг / мл у дублікатах в лунки А1 і А2 (див. Таблицю 1). Змішують вміст лунок А1 і А2 шляхом повторення аспірації і викиду (концентрація стандарту 1, S1 =25 пг / мл), і переносять 100 мкл у лунки В1 і В2 відповідно (див. мал. 9). Будьте обережні, щоб не подряпати внутрішню поверхню мікролунок. Продовжуйте цю процедуру 5 разів, створюючи два ряди ІЛ-10 людини стандартних розведень в діапазоні від 25 до 0,39 пг / мл.

Видаляють 100 мкл вмісту з останніх мікролунок (G1, G2) використаних.

Малюнок 9.



У разі розведення зовнішнього стандарту (див. 10.5.1.) піпетувати 100 мкл цих стандартних розведень (S1 - S7) у стандартних лунках згідно таблиці 1.

Таблиця1 .Таблиця, що зображає приклад розташування бланків, стандартів і зразків в стріпах мікролунок:

	1	2	3	4
A	Стандарт 1 (25,00 пг/мл)	Стандарт 1 (25,00 пг/мл)	Зразок 1	Зразок 1
B	Стандарт 2 (12,50 пг/мл)	Стандарт 2 (12,50 пг/мл)	Зразок 2	Зразок 2
C	Стандарт 3 (6,25 пг/мл)	Стандарт 3 (6,25 пг/мл)	Зразок 3	Зразок 3
D	Стандарт 4 (3,13 пг/мл)	Стандарт 4 (3,13 пг/мл)	Зразок 4	Зразок 4
E	Стандарт 5 (1,56 пг/мл)	Стандарт 5 (1,56 пг/мл)	Зразок 5	Зразок 5
F	Стандарт 6 (0,78 пг/мл)	Стандарт 6 (0,78 пг/мл)	Зразок 6	Зразок 6
G	Стандарт 7 (0,39 пг/мл)	Стандарт 7 (0,39 пг/мл)	Зразок 7	Зразок 7
H	бланк	бланк	Зразок 8	Зразок 8

4. Додають по 100 мкл розчинника зразку у дублікатах у лунки бланк.
5. Додайте 50 мкл розчинника зразку в лунки зразка.
6. Додають 50 мкл кожного зразка в дублікаті до лунок зразка
7. Приготуйте біотін-кон'югат.
8. Додайте 50 мкл біотін-кон'югату до всіх лунок.
9. Накрийте клейкою плівкою та інкубуйте при кімнатній температурі (від 18 до 25 ° C) протягом 2 годин, на мікропланшетному шейкері. (Вструшення є абсолютно необхідним для оптимальної продуктивності тесту.)
10. Готують стрептавідін HRP (див. стрептавідін HRP).
11. Зняти клейку плівку і опорожнити лунки. Промийте стріпи мікропланшета 6 разів відповідно до пункту 2. протоколу тестування. Перейти негайно до виконання наступного кроку.
12. Додайте 100 мкл розведеного Стрептавідін HRP до всіх лунок, включно до лунок бланк.
13. Накрийте клейкою плівкою та інкубуйте при кімнатній температурі (від 18 до 25 ° C) протягом 1 години, на шейкері для мікропланшетів (вструшування є абсолютно необхідним для оптимальної продуктивності тесту.)
14. Готують ампліфікуючий розчин 1, розведений в ампліфікуючому розчиннику (1x) (див. ампліфікуючий розчин 1) , безпосередньо перед використанням.
15. Зняти клейку плівку і опорожнити лунки. Промийте стріпи мікропланшета 6 разів відповідно до пункту 2. протоколу аналізу. Перейти негайно до виконання наступного кроку.
16. Додають 100 мкл ампліфікуючого розчину до всіх лунок, включаючи бланк лунки.
17. Накривають клейкою плівкою і інкубують при кімнатній температурі (18 ° C до 25 ° C) протягом 15 хвилин, на шейкері для мікропланшетів (Вструшування абсолютно необхідне для оптимальної продуктивності випробування)
18. Готують розчин Ампліфікації 2, розведений в буфері для аналізу (див. «Розчин 2 ампліфікації») перед використанням
19. Зняти клейку плівку і опорожнити лунки. Промийте стріпи мікропланшета 6 разів відповідно до пункту с. протоколу тестування. Перейти негайно до виконання наступного кроку.
20. Прокапати 100 мкл ампліфікуючого розчину 2 до всіх лунок, включаючи лунки бланк.
21. Накрийте клейовою фольгою і інкубуйте стріпи мікролунок при кімнатній температурі (від 18 ° до 25 ° C) точно 30 хв. на шейкері для мікропланшетів (Вструшування абсолютно необхідне для оптимальної продуктивності випробування)
22. Видалити клейку плівку і опорожнити лунки. Промийте стріпи мікролунок 6 разів згідно з пунктом 2. Протоколу аналізу. Негайно перейдіть до наступного кроку.
23. Введіть 100 мкл розчину субстрату ТМБ у всі лунки.
24. Інкубуйте стріпи мікролунок при кімнатній температурі (від 18 ° до 25 ° C) протягом приблизно 10-20 хвилин. Уникайте прямого впливу інтенсивного світла.

Розвиток кольору на планшеті повинен бути контрольований і реакція субстрату зупинена (див. наступну точку цього протоколу) перед тим, як позитивні лунки більше не підлягають правильному запису. Визначення ідеального періоду часу для розвитку кольору повинно бути зроблено індивідуально для кожного аналізу.

Рекомендується додати стоп-розчин, коли найвищий стандарт розвив темно-синій колір. Альтернативно розвиток кольору можна контролювати з допомогою рідера ІФА при 620 нм. Реакцію субстрату слід припинити, як тільки стандарт 1 досяг ОГ 0,9 - 0,95.

25. Зупиніть реакцію ферменту шляхом швидкого прокапування 100 мкл Стоп Розчину у кожен лунку. Важливо, щоб стоп-розчин поширювався швидко і рівномірно по всіх мікролунках до повної інактивації фермента. Результати повинні бути прочитані відразу після додавання стоп-розчину або протягом однієї години, якщо мікролунки зберігаються при температурі 2-8 ° С в темряві.

26. Зчитують поглинання кожної мікролунки на спектрофотометрі з використанням 450 нм в якості первинної довжини хвилі (необов'язково 620 нм як еталонна довжина хвилі; 610 нм - 650 нм є прийнятною).

Налаштувати на нуль рідер мікропланшетів відповідно до інструкцій виробника за допомогою бланк лунок. Визначають абсорбцію як зразків, так і стандартів.

Примітка: У разі інкубації без струшування отримані О.Г. значення можуть бути нижче, ніж вказано нижче. Проте результати все ще діють.

12 Розрахунок результатів

- Розрахувати середні значення поглинання для кожного набору дублікатів, стандартів та зразків. Дублікати повинні бути в межах 20 відсотків від середнього значення.

- Створіть стандартну криву нанесенням середнього поглинання для кожної стандартної концентрації на ординаті проти концентрації IL-10 людини на абсцисі. Намалюйте найкращу криву відповідності через точки графіка (рекомендована крива 5-параметрів).

- Для визначення концентрації циркулюючого IL-10 людини для кожного зразка спочатку знаходять середнє значення поглинання на ординаті і подовжують горизонтальну лінію до стандартної кривої. На місці перехрестя, витягніть вертикальну лінію до абсциси і прочитайте відповідну концентрацію IL-10 людини .

- **Якщо дотримувалися інструкції в цьому протоколі, зразки були розведені 1:2 (50 мкл зразка + 50 мкл розчинника зразку і контролі 1:18 (50 мкл попередньо розведеного контролю 1:9 + 50 мкл розчинника зразка).** Таким чином концентрації, прочитані зі стандартної кривої, повинні бути помножені на коефіцієнт розведення (x 2 для зразків, x 18 для контролів).

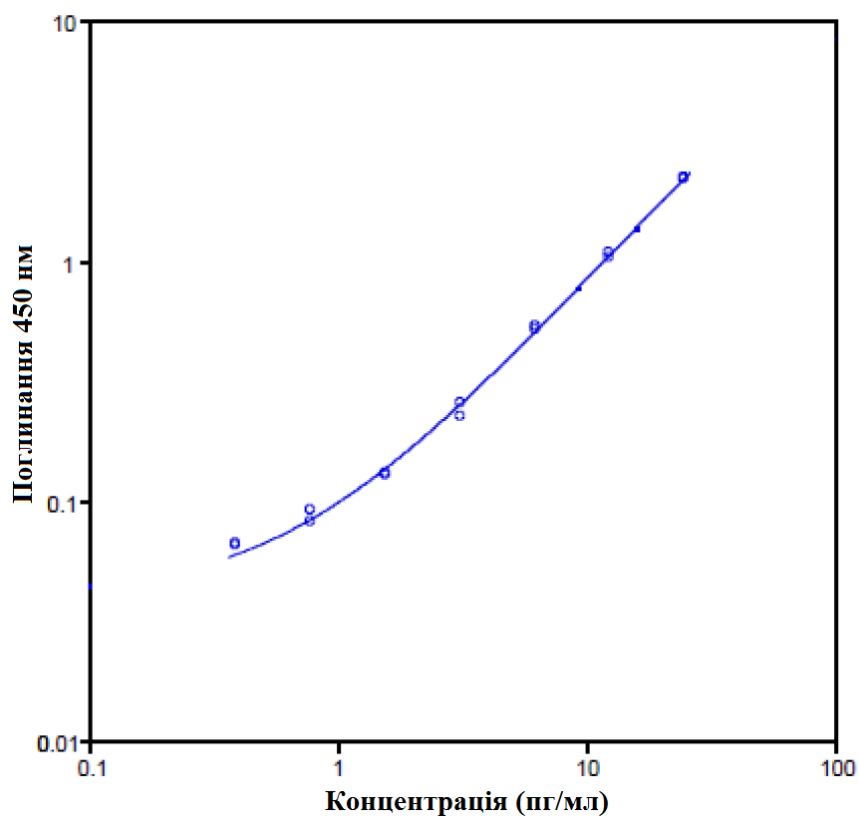
- Розрахунок зразків з концентрацією, що перевищує стандарт 1 , може призвести до неправильних, низьких рівнів IL-10 людини. Такі зразки вимагають додаткового зовнішнього розведення відповідно до очікуваних значень IL-10 людини з розчинником зразка для точного кількісного визначення фактичного рівня IL-10 людини.

- Пропонується, щоб кожна лабораторія встановила контрольний зразок з відомою концентрацією IL-10 людини і прогоняла цей додатковий контроль з кожним аналізом. Якщо отримані значення не знаходяться в межах очікуваного діапазону контролю, результати аналізу можуть бути недійсними.

- Репрезентативна стандартна крива показана на малюнку 10. Ця крива не може бути використана для отримання результатів аналізу. Кожна лабораторія повинна підготувати стандартну криву для кожної групи аналізованих стрипів мікропланшетів.

Малюнок 10

Репрезентативна стандартна крива для IL-10 людини ІФА. IL-10 людини розбавляли послідовними 2-кратними етапами в розчиннику зразку. Не використовуйте цю стандартну криву для отримання результатів аналізу. Стандартна крива повинна бути зроблена для кожної групи аналізованих мікролунок.



Таблиця 2
 Типові дані використання IL-10 людини ІФА
 Вимірювання довжини хвилі: 450 нм
 Довідкова довжина хвилі: 620 нм

стандарт	IL-10 людини концентрація (пг/мл)	ОГ при 450 нм	Середня ОГ при 450 нм	C.V. (%)
1	25,00	2,193 2,201	2,197	0.3
2	12.50	1.020 1.070	1,045	3.4
3	6.25	0,531 0,514	0,523	2.3
4	3.13	0,253 0,225	0,239	8.3
5	1,56	0,129 0,127	0,128	1.1
6	0,78	0,091 0,081	0,086	8.2
7	0,39	0,065 0,066	0,066	1,1
Бланк	0,00	0,037 0,036	0,037	1.4

Значення ОГ стандартної кривої можуть змінюватися відповідно до умови продуктивності аналізу (наприклад, оператор, техніка прокапування, техніки промивання або температурні ефекти). Крім того, термін придатності набору може впливати на ферментативну активність і, отже, на інтенсивність кольору. Вимірювані значення ще залишаються дійсними.

12. Обмеження

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

14. Характеристики виконання

14.1. Чутливість.

Межа виявлення IL-10 людини, визначена як концентрація аналіту, внаслідок чого поглинання значно вище, ніж у середньому розведенні (середнє значення плюс 2 стандартних відхилення), було визначено 0,05 пг / мл (середнє значення 6 незалежних аналізів) .

14.2. Відтворюваність

14.2.1. В аналізі

Відтворюваність в аналізі оцінювали в 3 незалежних експериментах. Кожний аналіз проводили з 6 повторами з 6 сироваткових екземплярів, що містять різні концентрації IL-10 людини . На кожному планшеті запустили 2 стандартні криві. Розрахований загальний коефіцієнт варіації в аналізі становив 6,8 %.

Таблиця 3.

Середня концентрація IL-10 людини та коефіцієнт варіації для кожного зразка.

Зразок	Експеримент	Середній IL -10 людини концентрація (пг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	1	7,64	10
	2	7,99	8
	3	7,97	8
2	1	1,27	8
	2	1,16	8
	3	1,47	8
3	1	1,16	7
	2	1,12	9
	3	1,09	5
4	1	5,11	1
	2	5,23	3
	3	6,39	4
5	1	1,55	7
	2	1,38	8
	3	1,64	8
6	1	3,65	4
	2	3,27	8
	3	4,41	6
7	1	2,45	8
	2	2,68	7
	3	3,04	7
8	1	3,09	9
	2	3,13	7
	3	3,60	6

14.2.2. Між аналізами

Відтворюваність від аналізу до аналізу в межах однієї лабораторії оцінювали в 3 незалежних експериментах. Кожний аналіз проводили з 6 повторами з 8 зразками сироваток, що містять різні концентрації ІЛ-10 людини. Дані нижче показують середню концентрацію ІЛ-10 у людини та коефіцієнт варіації, обчислений на 18 визначеннях кожного зразка (див. таблицю 4) 2 стандартні криві прогоняли на кожному планшеті. Розрахунковий загальний коефіцієнт варіації між аналізами становив 7,5%.

Зразок	Середня концентрація ІЛ-10 (пг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	7,87	9,0
2	1,30	8,0
3	1,12	7,1
4	5,58	2,5
5	1,53	7,7
6	3,78	6,1
7	2,73	7,1
8	3,27	7,1

14.3. Відновлення після збагачення.

Відновлення збагачення оцінювалось збагаченням ІЛ-10 людини в зразках сироватки людини. Відновлення визначалося в 3 незалежних експериментах з 8 зразками сироватки.

Відновлення коливалися від 78–111% із загальним середнім відновленням 91%.

14.4. Розведення паралелізм

Чотири зразки сироватки з різними рівнями ІЛ-10 людини аналізували при серійних 2-кратних розведеннях з 4 повторами кожен. Відновлення коливалось в діапазоні 98-118% при загальному відновленні 111% (див. табл.5)

зразок	розведення	Очікувані концентрації ІЛ-10 (пг/мл)	Спостерігаємі концентрації ІЛ-10 людини (пг/мл)	Відновлення очікуваного ІЛ-10 людини концентрація (%)
1	1	-	40,4	-
	2	20,2	22,3	111
	4	11,2	13,2	118
	8	6,6	7,4	112
2	1	-	38,2	-
	2	19,1	18,8	98
	4	9,4	11,1	118
	8	5,5	6,4	115
3	1	-	17,7	-
	2	8,9	9,3	105
	4	4,7	5,5	117
	8	2,7	3,0	109
4	1	-	40,4	-
	2	20,2	22,3	111
	4	11,2	13,2	118
	8	6,6	7,4	112

14.5. Стабільність зразка

14.5.1. Стабільність заморожування-відтавання.

Аліквоти зразків сироватки (збагачені або незбагачені) зберігали при -20 ° С і відтавали 5 разів, а рівні ІЛ-10 людини визначали. Відзначалося невелика втрата імунореактивності ІЛ-10 людини, виявлена замерзанням і розморожуванням, які потому слід уникати.

14.5.2. Стабільність зберігання

Аліквоти зразків сироватки та клітинної культури супернатантів збагачені або незбагачені) зберігали при -20 ° С, 2-8 ° С, кімнатній температурі (КТ), і при 37° С, а рівень IL-10 людини визначався через 24 год. Не було виявлено значної втрати імунореактивності IL-10 людини виявлено при зберіганні при -20 ° С та 2-8 ° С. Незначна втрата імунореактивності IL-10 людини була виявлена при зберіганні при кімнатній температурі і 37 ° С через 24 години.

14.6. Порівняння сироватки і плазми

З декількох індивідуумів сироватка, а також плазма ЕДТА, плазма з цитратом та з гепарином, отримані одночасно, були оцінені для IL-10 людини. Концентрації людського IL-10 істотно не відрізнялися і тому всі ці рідини тіла придатні для аналізу. Проте рекомендується забезпечити однорідність препаратів крові.

14.7 Специфічність

Інтерференцію циркулюючих факторів імунної системи оцінювали шляхом збагачення цих білків при фізіологічно значущих концентраціях в IL-10 позитивній сироватці людини. Не було виявлено перехресної реактивності.

14.8. Калібрування

Цей імуноаналіз калібрують з високоочищеним рекомбінантним людським IL-10, який оцінювали відповідно до Міжнародного стандартного стандарту NIBSC 93/722 і було показано, що він є еквівалентним. NIBSC 93/722 кількісно визначається в міжнародних одиницях (МОд), 1Од, що відповідає 200 пг IL-10 людини.

15. Підсумок підготовка реагентів

15.1. Промивний буфер (1x)

Додати концентрат промивного буферу 20x (50мл) до 950мл дистильованої води.

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

15.2. Буфер аналізу (1x)

Додають буфер аналізу концентрат 20x (5мл) до 95мл дистильованої води.

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

15.3. Біотин-кон'югат.

Зробіть 1: 100 розчин біотин-кон'югату в буфері аналізу (1x):

Кількість стріпів	Біотин-кон'югат (мл)	Буфер аналізу (1x) (мл)
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

15.4. Стрептавідин-HRP.

Зробіть 1:200 розчин **Стрептавідин-HRP** в буфері аналізу (1x)

Кількість стріпів	Стрептавідин-HRP (мл)	Буфер аналізу (1x) (мл)
1-6	0,03	5,97
1-12	0,06	11,94

15.5. IL-10 людини стандарт

Відтворити ліофілізований стандарт IL-10 людини з дистильованою водою.

(Об'єм відновлення вказаний на етикетці стандартного флакону). Концентрований стандарт IL-10 людини повинен бути розведений 1:8 з розріджувачем зразка.

15.6. Ампліфікаційний розчинник (1х)

Приготування ампліфікаційного розріджувача (1х) потрібно проводити безпосередньо перед використанням.

Кількість стріпів	Ампліфікаційний розчинник (2х) (мл)	Дистильована вода (мл)
1-6	3	3
1-12	6	6

15.7. Ампліфікаційний розчин 1

Розбавляють реагент для посилення I в ампліфікаційному розчиннику (1х) безпосередньо перед нанесенням на планшет як зазначено у сертифікаті аналізу.

15.8. Ампліфікаційний розчин 2

Пробірку центрифугують протягом декількох секунд у мікроцентрофузі перед відкриттям для збору рідини, що потрапила у кришку. Розбавте розчин ампліфікації 2 в буфері для аналізу (1х) безпосередньо перед нанесенням на планшет, як зазначено в свідоцтві про аналіз.

15.9. Контролі

Додайте 400 мкл дистильованої води до ліофілізованих засобів контролю. Попередньо відновлений контроль 1:9 з розріджувачем зразків.

16. Підсумок протокол випробувань

Примітка: готуйте розчини для посилення безпосередньо перед нанесенням на планшет. Надзвичайно важливо промити лунки належним чином, щоб отримати надійні показники тесту.

1. Визначте кількість необхідних стріпів мікролунок.
2. Промийте мікролунки стріпів двічі промивним буфером.
3. Стандартне розведення на мікропланшеті: додайте 100 мкл розчинника для зразків у двох примірниках до всіх лунок стандартів. В першу лунку піпетувати 100 мкл підготовленого стандарту і створити стандартні розведення перенесенням 100 мкл з лунки в лунку. Видаліть 100 мкл з останніх лунок. Альтернативно розведення зовнішнього стандарту в пробірках (див. "Розведення зовнішнього стандарту" 10.0.1):
Піпетуйте 100 мкл цих розведень стандартів у стріпи мікролунок.
4. Додайте 100 мкл розчинника для зразків у двох примірниках до бланк лунок.
5. Додайте 50 мкл розчинника для зразків у лунки для зразків.
6. Додайте 50 мкл зразків у двох примірниках у призначені лунки для зразків.
7. Приготуйте біотин-кон'югат.
8. Додайте 50 мкл біотин-кон'югату у всі лунки.
9. Накрийте стріпи мікролунок та інкубуйте 2 години при кімнатній температурі (від 18 ° до 25 ° C). (Струшування абсолютно необхідне для оптимальної ефективності тесту.)
10. Підготуйте Стрептавідин-HRP.
11. Опорожнити і промити стріпи мікролунок 6 разів промивальним буфером.
12. Додайте 100 мкл розведеного Стрептавідин-HRP до всіх лунок.
13. Накрийте стріпами мікролунки та інкубуйте 1 годину при кімнатній температурі (від 18 ° до 25 ° C). (Струшування абсолютно необхідне для оптимальної ефективності тесту.)
14. Підготуйте ампліфікаційний розчин, розведений в ампліфікаційному розчиннику (1х) безпосередньо перед нанесенням на планшет.
15. Опорожнити і вимийте стріпи мікролунок 6 разів промивочним буфером.
16. Додайте 100 мкл ампліфікаційного розчину 1 у всі лунки.
17. Накрийте стріпи мікролунок та інкубуйте рівно 15 хвилин при кімнатній температурі (від 18 ° до 25 ° C). (Струшування абсолютно необхідне для досягнення оптимальних показників тесту.)
18. Підготуйте ампліфікаційний розчин 2, розведений в буфері для аналізу (1х) безпосередньо перед нанесенням на планшет.

19. Опорожнити лунки і промити стріпи мікролунок 6 разів промивочним буфером.
20. Додайте 100 мкл ампліфікаційного розчину 2 у всі лунки.
21. Накрийте стріпи мікролунок та інкубуйте рівно 30 хвилин при кімнатній температурі (від 18 ° до 25 ° C).
22. Опорожнити лунки і промити стріпи мікролунок 6 разів промивочним буфером.
23. Додайте 100 мкл розчину субстрату ТМБ до всіх лунок.
24. Інкубуйте стріпи мікролунок протягом приблизно 10-20 хвилин при кімнатній температурі (від 18 ° до 25 ° C).
25. Додайте 100 мкл стоп-розчину у всі лунки.
26. Налаштуйте рідер мікролунок та вимірюйте інтенсивність кольорів на 450 нм.

Примітка: Якщо дотримуватися інструкцій цього протоколу, зразки розбавляють 1: 2 (зразок 50 мкл + 50 мкл Розріджувача для зразків) та контролі 1:18 (50 мкл 1:9 попереднь розведеного контролю + 50 мкл Розчинник для зразків). Таким чином концентрації, прочитані зі стандартної кривої, повинні бути помножені на коефіцієнт розведення (x 2 для зразків, x 18 для контролів.)

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