

Интерлейкин -6 (IL-6)

Human IL-6 ELISA

Иммуноферментный набор для количественного определения человеческого интерлейкина-6

⚠ ВНИМАНИЕ! Прочитайте паспорта безопасности (SDS) и следуйте инструкции по применению. Во время работы с набором носите соответствующие защитные очки, одежду и перчатки. Паспорта безопасности (SDS) доступны на сайте thermofisher.com/support.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор human IL-6 ELISA предназначен для количественного определения человеческого интерлейкина-6 (IL-6).

2. ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин 6 (IL-6) является мультифункциональным цитокином, регулирующим иммунный ответ, реакции острой фазы и гемопоэз. Данный цитокин может играть центральную роль в защитных механизмах организма. Ген человеческого интерлейкина 6 локализован в хромосоме 7p21, его геномная последовательность определена. IL-6 обычно не продуцируется нормальными клетками конститутивно, однако его экспрессия легко индуцируется различными цитокинами, липополисахаридами или вирусными инфекциями. Продуктом гена IL-6 является одноцепочечный протеин с молекулярной массой 21-28 кДальтон, в зависимости от продуцирующих клеток. Данная гетерогенность обусловлена различными посттрансляционными модификациями (N- и O-гликозилирование, фосфорилирование). Синтезируемый предшественник IL-6 состоит из 212 аминокислотных остатков.

IL-6 является плейотропным цитокином, продуцируемым различными клетками. Действие цитокина проявляется в различных тканях, вызывая индукцию роста, ингибирование роста и дифференцировку в зависимости от природы

клеток-мишеней.

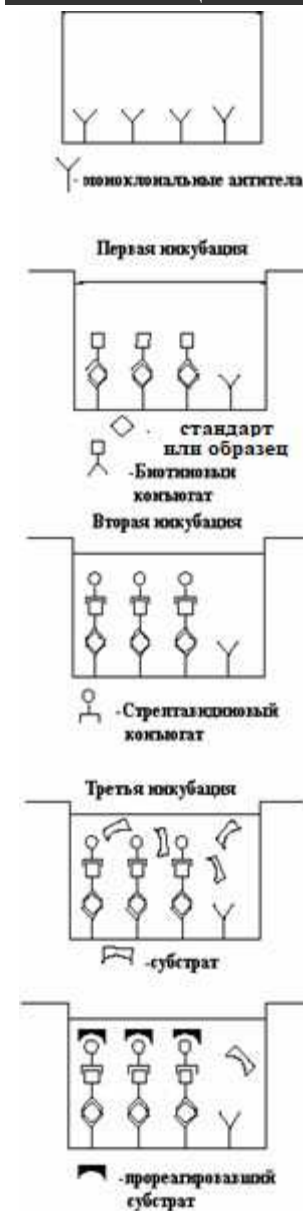
IL-6 участвует в:

- Индукция дифференцировки В-клеток
- Индукция синтеза острофазовых белков гепатоцитами
- Стимуляция роста клеток миеломы/плазмцитомы/гибридомы
- Индукция IL-2 и экспрессии рецептора IL-2

- Прлиферация и дифференцировка Т-клеток
- Ингибирование роста клеток определенных миелоидных лейкоэмических линий и индукция их дифференцировки в макрофаги
- Усиление IL-3-индуцированного образования колоний мультипотентных клеток гемопоэтическими стволовыми клетками и индукция созревания мегакариоцитов (тромбопоэтический фактор)
- Индукция роста мезангиальных клеток
- Индукция нейродифференцировки клеток РС 12
- Индукция роста кератиноцитов.

За более подробной информацией обратитесь на сайт производителя.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА



Антитела к человеческому IL-6 сорбированы в лунках микропланшета. Человеческий IL-6, присутствующий в образцах или стандартах, связывается с антителами, сорбированными в лунках. Антитела к IL-6, конъюгированные с биотином, связывают молекулы человеческого IL-6, захваченные первыми антителами.

После инкубации при промывке из лунок удаляется несвязавшийся биотинилированный анти-IL-6 антитела. В лунки вносится конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (стрептавидин-HRP), который связывает биотин, конъюгированный с антителами к человеческому IL-6.

После инкубации и промывки из лунок удаляется несвязавшийся ферментный конъюгат (стрептавидин-HRP), и в лунки добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора. Реакция останавливается добавлением кислоты.

Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации человеческого IL-6, присутствующего в образцах. Концентрация человеческого IL-6 в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям

стандарта человеческого IL-6.

4. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Набор 96 тестов
96-луночный микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому IL-6	1 планшет

Конъюгат моноклональных антител к ПЛ-6 с биотином, 70 мкл.	1 флакон
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 150 мкл	1 флакон
Стандарт ПЛ-6, лиофилизированный, 200 пг/мл после растворения	2 флакона
Контроль, низкий уровень	1 флакон
Контроль, высокий уровень	1 флакон
Концентрат Рабочего буфера 20х (ФСБ с 1% твином 20 и 10% БСА), 5 мл	1 флакон
Буфер для промывок, концентрат 20х (ФСБ с 1% твином 20), 50 мл.	1 флакон
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл.	1 флакон
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл.	1 флакон
Плѐнки для заклеивания стрипов	4

5 ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Храните реагенты набора при 2°-8°С, кроме контролей. Храните лиофилизированные контроли отдельно при -20°С. Сразу после использования поместите оставшиеся реагенты обратно в холодильник на 2-8°С, а контроли на -20°С, соответственно. Сроки годности реагентов и набора указаны на этикетках.

Только при соответствующем хранении и исключении контаминации во время предыдущего использования набора гарантируется качественная работа реагентов.

6. СБОР ОБРАЗЦОВ

Супернатанты клеточных культур, человеческая сыворотка, плазма (ЭДТА, цитратная или гепариновая) были протестированы с данным набором реагентов. Другие биологические жидкости, возможно, также могут быть исследованы данным методом.

Отделите сыворотку от сгустка как можно скорее после свѐртывания.

Образцы, содержащие видимый преципитат, необходимо очистить от него до анализа. Не используйте образцы с сильным гемолизом или липемией.

Для длительного хранения алиquotируйте образцы и заморозьте алиquotы при -20°С или ниже. В этом случае удаѐтся избежать потерь биоактивности ПЛ-6. Если анализ будет выполнен в течение 24 часов после получения образцов, то они могут храниться при 2-8°С.

Избегайте повторных циклов замораживания - размораживания образцов. До начала анализа замороженные образцы должны быть медленно разморожены и должны достичь комнатной температуры. Тщательно и аккуратно перемешайте образцы перед анализом.

7. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Градуированные пипетки на 5 и 10 мл
- Калиброванные пипетки одноканальные переменного объема с одноразовыми наконечниками на 5 – 1000 мкл
- Многоканальные пипетки переменного объема с одноразовыми наконечниками на 50 – 300 мкл
- Ванночка для реагентов для использования с многоканальной пипеткой
- Калиброванные стаканы и цилиндры, необходимые для приготовления реактивов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство

- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, при возможности, фильтром сравнения 620 нм
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Программное обеспечение для обработки результатов

8. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Со всеми реагентами необходимо обращаться как с потенциально опасными. Работать с данным набором рекомендуется только специально обученному лабораторным методам персоналу и только в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики. Носите соответствующую лабораторную защитную одежду, защитные очки и перчатки. Соблюдайте меры предосторожности, чтобы избежать контакта с кожей или глазами. В случае попадания на кожу или глаза немедленно промойте большим количеством воды. За более подробной специфической информацией обращайтесь к материалам данных по безопасности (MSDS).
- Не замещайте реагенты набора реагентами из других лотов и других источников.
- Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
- Избегайте действия на реагенты сильного источника света во время хранения и инкубации.
- Не пипетируйте ртом.
- Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ.
- Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми.
- При работе с образцами и реагентами пользуйтесь резиновыми или латексными перчатками для защиты рук.
- Избегайте контакта субстратного раствора с металлами и окислителями.
- Избегайте разбрызгивания реагентов или образования аэрозолей.
- Чтобы избежать микробного загрязнения или загрязнения реактивами и получения в результате недостоверных результатов, пользуйтесь одноразовыми наконечниками.
- Используйте чистую, специально выделенную посуду для конъюгатов и субстратного раствора.
- Контакт с кислотой инактивирует конъюгат.
- Для приготовления реактивов используйте дистиллированную в стекле или деионизированную воду.
- Субстратный раствор должен иметь комнатную температуру перед использованием
- Обеззараживайте после работы образцы, так как они могут быть инфицированы, предпочтительно автоклавированием не менее 1 часа при 121.5°С.
- Жидкие отходы, не содержащие кислоту, и нейтрализованные необходимо смешать с раствором гипохлорита натрия таким образом, чтобы получился в итоге 1% раствор гипохлорита. Оставьте полученную смесь на 30 минут для эффективного обеззараживания. Жидкие отходы, содержащие кислоту, необходимо нейтрализовать до обеззараживания раствором гипохлорита натрия.

9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Перед проведением анализа концентраты буферов нагрейте до комнатной температуры и разведите.

Если в концентратах буферов образовались кристаллы, осторожно нагрейте их до полного растворения.

9.1 Буфер для промывок 1x

1. Разбавьте 50 мл концентрата Буфера для промывок (20x) дистиллированной водой в чистом мерном цилиндре до конечного объема 1000 мл. Перемешайте, избегая вспенивания.
2. Перенесите Рабочий Промывочный Буфер в чистый сосуд и храните при 2-25°C. Рабочий Промывочный буфер (1x) стабилен 30 дней.
3. Буфер для промывок (1x) может быть приготовлен в необходимом количестве согласно приведенной ниже таблице.

Таблица. Расход концентрата Буфера для промывок.

Количество используемых стрипов	Концентрат Буфера для промывок, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

9.2 Рабочий буфер 1x

1. Перенесите 5,0 мл концентрата Рабочего буфера в чистый мерный цилиндр на 100. Добавьте дистиллированной воды до конечного объема 100,0 мл. Перемешайте, избегая вспенивания.
2. Храните Рабочий буфер при 2-8°C. Реагент стабилен 30 дней.
3. Рабочий буфер может быть приготовлен в необходимом количестве согласно приведенной ниже таблице.

Таблица. Расход концентрата Рабочего буфера.

Количество используемых стрипов	Концентрат буфера, мл	Рабочего	Дистиллированная вода, мл
1-6	2,5		47,5
1-12	5,0		95,0

9.3 Биотиновый Конъюгат

Замечание: Пожалуйста, обратите внимание, что Биотиновый конъюгат должен использоваться в течение 30 минут после приготовления.

Разбавьте Концентрат Биотинового Конъюгата Рабочим буфером (1x) в соотношении 1:100 в чистой пластиковой посуде. Хорошо перемешайте содержимое.

Биотиновый конъюгат может быть приготовлен в необходимом количестве согласно приведенной ниже таблице.

Таблица. Расход концентрата биотинового конъюгата.

Кол-во стрипов	Концентрат конъюгата, мл	Рабочий Буфер, мл
1-6	0.03	2.97
1-12	0.06	5.94

9.4 Стрептавидин-пероксидаза (стрептавидин-HRP)

Замечание: Пожалуйста, обратите внимание, что раствор конъюгата стрептавидина с пероксидазой должен использоваться в течение 30 минут после приготовления.

Разбавьте концентрированный раствор Стрептавидин-HRP Рабочим буфером (1x) в соотношении 1:200 в необходимом количестве согласно приведенной ниже таблице.

Таблица. Расход концентрата конъюгата Стрептавидин-HRP.

Кол-во стрипов	Концентрат конъюгата, мл	Рабочий Буфер, мл
1-6	0,03	5,97
1-12	0,06	11,94

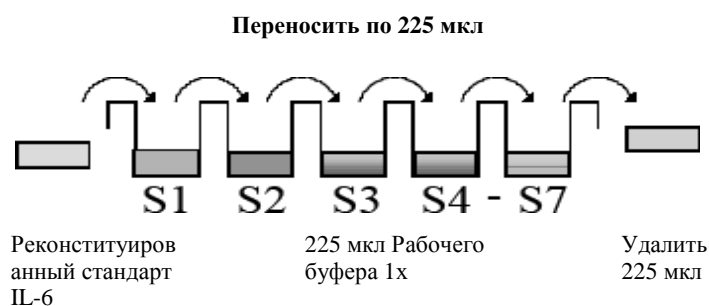
9.5 Стандарты человеческого IL-6

1. Растворите лиофилизированный стандарт человеческого IL-6 в дистиллированной воде. Необходимый для растворения объем указан на этикетке флакона. Аккуратно перемешайте раствор, до полного растворения (концентрация полученного раствора 200 пг/мл).
2. Оставьте раствор при комнатной температуре на 10-30 минут. Тщательно перемешайте перед дальнейшим разведением.
3. После растворения остатки стандарта немедленно не хранятся, утилизируйте их.
4. Разведения стандарта могут быть приготовлены как непосредственно в микропланшете (см. 10.3), так и, альтернативно, в пробирках (см. 9.5.1).

9.5.1 Приготовление разведений стандарта (внешний вариант)

1. Промаркируйте 7 пробирок, одну для каждой стандартной точки: S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7
2. Затем приготовьте серию двукратных разведений для стандартной кривой следующим образом: Добавьте 225 мкл рабочего буфера (1x) в каждую пробирку.
3. Добавьте 225 мкл разведенного стандарта в первую пробирку, маркированную как S1, и перемешайте (концентрация стандарта 1 = 100 пг/мл).
4. Далее добавьте 225 мкл полученного раствора во вторую пробирку, маркированную как S2, и тщательно перемешайте перед приготовлением следующего разведения.
5. Повторите разбавления далее, получив, таким образом, необходимые точки для стандартной кривой (см. рисунок 1). Рабочий буфер (1x) служит бланком.

Рисунок. Приготовление разведений стандарта



9.6 Контроли

Растворите лиофилизированные контроли, добавив по 300 мкл дистиллированной воды (10-30 минут). Аккуратно перемешайте до полного растворения.

Анализируйте контроли данным методом так же, как и образцы с неизвестными концентрациями. Допустимый диапазон указан на этикетках флаконов или в сертификате анализа. Аликвотируйте растворены контроли и храните при -20°C. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Примечание: в случае инкубации без встряхивания полученные значения оптической плотности (ОП) могут быть ниже, чем указано далее. Тем не менее, результаты все еще достоверны.

1. Определите по количеству образцов требуемое для проведения анализа число 8-луночных стрипов, с

учетом лунок, необходимых для анализа бланков и стандартов. Все образцы, стандарты, бланк и контроли (опционально) необходимо анализировать в дублях. **Неиспользуемые стрипы** выньте из держателя и сразу уберите в пакет с осушителем, плотно закройте и храните при 2 - 8°C.

- Промойте лунки 2 раза по 400 мкл **Промывочного Буфера** на лунку, полностью удаляя жидкость между промывками. Выдерживайте лунки в промывочном буфере **10-15 секунд** перед аспирацией (замачивание). Избегайте царапин на поверхности лунок.

Высушите планшет на фильтровальной бумаге после последней промывки. Используйте стрипы немедленно после или максимум через 15 минут при условии, что стрипы уложены на влажную фильтровальную бумагу в перевернутом виде. Не позволяйте лункам высыхать!

- Приготовление разведений стандарта в лунках микропланшета** (альтернативно разведения стандарта могут быть приготовлены в пробирках – см. 9.5.1):

Внесите по 100 мкл рабочего буфера (1x) во все лунки, предназначенные для Стандартов, в дублях. Приготовьте стандартные разведения добавлением по 100 мкл растворенного Стандарта ПЛ-6 (раздел «Приготовление реагентов», п. 9.5), в дублях, в лунки A1 и A2 (Смотри Таблицу 1). Перемешайте содержимое лунок A1 и A2 и перенесите по 100 мкл раствора из лунок A1 и A2 в лунки B1 и B2, соответственно. Во время этих манипуляций постарайтесь не поцарапать внутреннюю поверхность лунок. Повторите перенос и разведение стандартов еще 5 раз, получив в итоге 2 ряда разведений Стандарта ПЛ-6 в диапазоне от 100,0 до 1,56 пг/мл. Удалите по 100 мкл жидкости из последних использованных лунок (G1, G2).

Рисунок 7. Приготовление серийных разведений Стандарта ПЛ-6 в лунках планшета:



При приготовлении разведений в пробирках (см. 9.5.1), добавьте по 100 мкл разведений в лунки для стандартов согласно таблице 1.

Таблица 1: Пример расположения образцов, бланка и стандартов на планшете.

	1	2	3	4
A	Ст #1 (100 пг/мл)	Ст #1 (100 пг/мл)	O1	O1
B	Ст #2 (50 пг/мл)	Ст #2 (50 пг/мл)	O2	O2

C	Ст #3 (25 пг/мл)	Ст #3 (25 пг/мл)	O3	O3
D	Ст #3 (12,5 пг/мл)	Ст #3 (12,5 пг/мл)	O4	O4
E	Ст #4 (6,25 пг/мл)	Ст #4 (6,25 пг/мл)	O5	O5
F	Ст #5 (3,13 пг/мл)	Ст #5 (3,13 пг/мл)	O6	O6
G	Ст #6 (1,56 пг/мл)	Ст #6 (1,56 пг/мл)	O7	O7
H	Бланк	Бланк	O8	O8

Ст – Стандарт, О – образец

Если разведение стандарта было выполнено в пробирках (см. п.9.5.1), внесите по 100 мкл разведений из пробирок S1 - S7 в лунки микропланшета, предназначенные для стандартов, согласно таблице.

- Внесите по 100 мкл **рабочего буфера (1x)** в лунки, предназначенные для бланка.
- Внесите по 50 мкл **рабочего буфера (1x)** в лунки, предназначенные для образцов.
- Добавьте по 50 мкл **образцов** в дублях в соответствующие лунки, предназначенные для образцов.
- Приготовьте **биотиновый конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов» 9.3).
- Добавьте по 50 мкл готового **биотинового конъюгата** во все лунки.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18-25°C), если возможно, используя орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- Приготовьте раствор **Стрептавидин-HRP** (раздел «Приготовление реагентов» 9.4).
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием. Промойте лунки 4 раза, как указано в шаге «2» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Внесите по 100 мкл готового **Стрептавидин-HRP** во все лунки, включая бланк.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18°-25°C), если возможно, на шейкере при 400 об/мин.
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием. Промойте лунки 4 раза как указано в шаге «2» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора ТМБ** во все лунки, включая «Бланк».
- Инкубируйте при комнатной температуре примерно 10 минут, избегайте попадания прямого солнечного света.

За развитием окраски необходимо наблюдать, и субстратная реакция должна быть остановлена (см. пункт 17 протокола) до того, как значение оптической плотности в положительных лунках превысят предел определения прибора.

Рекомендуется останавливать реакцию добавлением стоп-раствора тогда, когда самый высокий стандарт окрасится в темно-голубой цвет.

Альтернативно, развитие окрашивания можно наблюдать с помощью ИФА ридера при длине волны 620 нм.

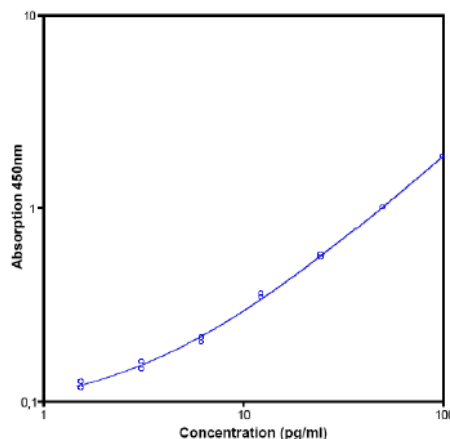
Субстратная реакция должна быть остановлена, как только будет достигнута ОП 0,9 – 0,95.

17. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все лунки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в лунках. Важно вносить стоп-раствор быстро и с той же скоростью, что и субстратный раствор. Оптическую плотность считать немедленно после внесения стоп-раствора или в течение 1 часа при условии, что стрипы находились всё это время при температуре 2-8°C в темноте.
18. Определите оптическую плотность лунок при 450 нм против «Бланка», желательнее использовать длину волны сравнения 620 нм (допустима длина волны сравнения в диапазоне 610-650 нм). Бланкируйте микропланшетный ридер так, как это описано в инструкции производителя, с использованием лунок «бланк». Определите абсорбцию как в неизвестных образцах, так и в стандартах IL-6.

11. РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитайте результаты. Для этого рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта и образца. Отклонение от среднего не должно быть более 20%.
- Постройте калибровочную кривую, отложив по оси ординат значение абсорбции для каждого значения концентрации стандарта против значения концентраций **IL-6** на оси абсцисс. Проведите оптимальную кривую через полученные точки. Для автоматического расчета рекомендуется 5-параметрическая кривая.
- Для определения концентрации **IL-6** в образцах сначала найдите соответствующее среднее значение абсорбции на оси ординат, затем проведите перпендикулярную оси прямую линию (горизонтально) до пересечения со стандартной кривой. Из точки пересечения проведите вертикальную линию до пересечения с абсциссой и считайте соответствующее значение концентрации **IL-6**.
- В ходе анализа образцы были разведены в 2 раза, следовательно, концентрации, полученные из калибровочной кривой, должны быть умножены на коэффициент разведения (x2).
- Расчет концентрации в образцах с концентрацией, превышающей максимальный стандарт, может быть некорректным. Такие образцы должны быть предварительно разведены рабочим буфером (1x) в соответствии с ожидаемыми значениями, и проанализированы еще раз для получения точного значения актуального уровня IL-6.
- Предполагается, что каждая лаборатория должна оценить свой контрольный образец с известной концентрацией **IL-6** и включать его в каждую постановку. Если полученные для контроля значения не укладываются в диапазон ожидаемых значений для данного контроля, результаты анализа могут быть недостоверны.
- Пример стандартной кривой показан на Рисунке 8. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

Рисунок 8. Пример стандартной кривой для IL-6 ELISA.



Типичные результаты, полученные с использованием данного набора IL-6 ELISA. Данные представляют значения последовательных двукратных разведений человеческого IL-6 Рабочим буфером (1x).

Таблица 2. Типичные результаты, полученные с использованием набора Human IL-6 ELISA:

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарты	Концентрация IL-6 пг/мл	О.П. (450 нм)	О.П. среднее	C.V. (%)
1	100,0	1,848 1,854	1,851	0,2
2	50,0	1,005 1,002	1,004	0,2
3	25,0	0,553 0,570	0,562	2,1
4	12,5	0,355 0,343	0,349	2,4
5	6,25	0,201 0,212	0,207	3,8
6	3,13	0,146 0,158	0,152	5,6
7	1,56	0,116 0,125	0,121	5,3
Бланк	0	0,075	0,081	
	0	0,086		

Значения оптической плотности могут сильно зависеть от условий проведения анализа (например, оператора, проводящего анализ, техники пипетирования, промывки или температуры). Кроме того, оставшийся срок годности набора может влиять на ферментативную активность и, таким образом, на интенсивность окрашивания. Значения остаются всё ещё достоверными.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Так как точные условия могут меняться от анализа к анализу, стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.
- Бактериальное или грибковое загрязнение образцов или реактивов, или перекрестное загрязнение реактивов могут привести к недостоверным результатам.
- Предпочтительно использование одноразовых наконечников, флаконов, многоразовая стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта и следы детергента должны быть полностью удалены перед использованием.
- Неполная или неправильная промывка на любом этапе негативно влияет на точность результатов и может привести как к ложноположительным, так и к

ложноотрицательным результатам. Полностью удаляйте Промывочный буфер из лунок между циклами промывки. Наполняйте лунки буфером для промывок как это указано, для каждого цикла промывки. Не позволяйте лункам высыхать или оставаться незакрытыми долгий период времени.

- Использование иммунотерапии значительно увеличило число пациентов с человеческими антимышиными IgG-антителами (НАМА). НАМА могут интерферировать в анализе, использующем мышинные моноклональные антитела, приводя как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам. Образцы сыворотки, содержащие антитела к мышинным иммуноглобулинам, могут быть проанализированы в случае, когда мышинные иммуноглобулины (сыворотка, асцитная жидкость или моноклональные антитела другой специфичности) добавляются в образцы.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

13.1 ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИЗА

Минимально определяемая концентрация ИЛ-6, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше, чем раствор для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 0,92 пг/мл (среднее 6 независимых определений).

13.2 ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

1321 Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась в 2 независимых сериях анализа. В каждой серии анализа было выполнено 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации человеческого ИЛ-6. В каждый планшет были включены по две калибровочные кривые. В таблице приведены средние значения ИЛ-6 и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации внутри серии составил в среднем 3,4%.

Таблица 3

Средние концентрации человеческого ИЛ-6 и коэффициент вариации для каждого образца.

образцы	эксперимент	Средняя концентрация ИЛ-6, пг/мл	Коэфф. вариации (%)
1	1	40,7	7,8
	2	42,2	1,6
2	1	40,1	4,1
	2	40,1	2,6
3	1	43,2	1,1
	2	41,7	3,5
4	1	65,5	2,3
	2	65,4	4,6
5	1	47,2	1,6
	2	48,0	2,1
6	1	34,1	2,5
	2	37,8	5,4
7	1	27,3	0,2
	2	35,2	7,7
8	1	37,8	4,1
	2	42,6	2,4

1322 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определялась в одной лаборатории в 2 независимых сериях анализа. В каждой серии анализа было выполнено 6 определений каждого из 8 образцов сывороток, содержащих различные концентрации

ИЛ-6. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения ИЛ-6 и коэффициент вариации для каждого образца, рассчитанный из 18 определений каждого образца. Коэффициент вариации между сериями составил в среднем 5,2%.

Таблица 4

Средние значения концентрации ИЛ-6 и коэффициент вариации для каждого образца.

Образец	Концентрация ИЛ-6, пг/мл	Коэфф. вариации (%)
1	41,5	2,6
2	40,1	0,0
3	42,5	4,4
4	65,5	0,2
5	47,6	1,2
6	35,9	7,3
7	31,3	17,8
8	40,2	8,4

13.3 ИЗВЛЕЧЕНИЕ

Извлечение оценивали, анализируя человеческую сыворотку, обогащенную 4 уровнями ИЛ-6 человека. Извлечение определяли в 3 независимых экспериментах, по 8 реплик каждого образца. В качестве бланка использовали сыворотку без добавок.

Извлечение составило от 78% до 105%, а в среднем 88%.

13.4 ЛИНЕЙНОСТЬ

Образцы человеческой сыворотки с различными уровнями человеческого ИЛ-6 были проанализированы в сериях двукратных разведений по 4 повтора каждого. Показано, что извлечение в среднем составило 105%, в диапазоне от 98% до 111% (см. таблицу 5).

Таблица 5.

Образец	разведение	Концентрация ИЛ-6, пг/мл		% извлечения от ожидаемой концентрации ИЛ-6
		Ожидаемое значение	Наблюдаемое значение	
1	1:2	--	46,4	--
	1:4	23,2	22,7	98
	1:8	11,6	11,8	102
2	1:2	--	95,0	--
	1:4	47,5	50,3	106
	1:8	23,8	23,4	99
3	1:2	--	51,9	--
	1:4	26,0	28,8	111
	1:8	13,0	14,4	111

13.5 Стабильность образцов

1351 Стабильность при замораживании/оттаивании

Аликвоты образцов сывороток (обогащенные и небогащенные) хранили при температуре -20°C , и размораживали до 5 раз, после чего определяли уровни ИЛ-6. Значительной потери иммунореактивности человеческого ИЛ-6 при повторных циклах замораживания/оттаивания не наблюдалось.

1352 Стабильность при хранении

Аликвоты образцов сывороток (обогащенные и небогащенные) хранились при температуре -20°C , $2-8^{\circ}\text{C}$, комнатной температуре и при 37°C в течение 24 часов, после чего определялись уровни ИЛ-6. При этих условиях не наблюдалось значительной потери иммунореактивности ИЛ-6.

13.6 Сравнение сыворотки и плазмы

От двух человек были взяты образцы сыворотки, ЭДТА, цитратной и гепариновой плазмы. Концентрации человеческого ИЛ-6 отличались незначительно, следовательно, все эти биологические жидкости можно использовать в анализе. Однако настоятельно рекомендуется использовать унифицированные матрицы образцов.

13.7 Специфичность

Не наблюдалось кросс-реактивности с циркулирующими факторами иммунной системы в физиологических концентрациях в образцах человеческой сыворотки, позитивной на ИЛ-6.

13.8 Ожидаемые значения

Панель образцов от случайно выбранных и явно здоровых доноров (мужчин и женщин) была протестирована на человеческий ИЛ-6. Измеренные концентрации могут варьироваться в зависимости от использования метода забора образца. В таблице ниже приведены определенные концентрации.

Матрикс образца	Число образцов	Диапазон (пг/мл)	Измеренное, %	Среднее, пг/мл
Сыворотка	40	нд ⁽¹⁾ 12.7	47.5	5.8
ЭДТА-плазма	40	нд-13.0	17.5	6.4
Цитратная плазма	40	нд-6.6	2.5	6.6
Гепариновая плазма	40	нд-6.5	30.0	5.0

13.9 Калибровка

Данный метод прокалиброван по препарату высокоочищенного рекомбинантного человеческого ИЛ-6, который был оценен по международному референсному стандарту NIBSC 89/548, и была установлена его эквивалентность стандарту.

NIBSC 89/548 измеряется в Международных Единицах (МЕ), 1МЕ соответствует 10 пг человеческого ИЛ-6.

14. СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

14.1 Буфер для промывок 1x

Добавить Концентрат Буфера для промывок 20x (50 мл) в 950 мл дистиллированной воды.

Количество стрипов	Концентрат Промывочного буфера, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

14.2 Рабочий буфер 1x

Добавить Концентрат Рабочего Буфера 20x (5 мл) в 95 мл дистиллированной воды.

Количество стрипов	Концентрат Рабочего буфера, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

14.3 Биотиновый Конъюгат

Разведите в 100 раз в соответствии с таблицей:

Количество стрипов	Концентрат Биотинового конъюгата, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

14.4 Стрептавидин-HRP

Разведите в 200 раз в соответствии с таблицей:

Количество стрипов	Концентрат Стрептавидин-HRP, мл	Рабочий буфер, мл
1-6	0,03	5,97
1-12	0,06	11,94

1-6	0,03	5,97
1-12	0,06	11,94

14.5. Стандарт ИЛ-6

Растворите стандарт ИЛ-6 в дистиллированной воде. Необходимый для растворения объем указан на этикетке флакона со стандартом.

14.6. Контроли

Добавьте 300 мкл дистиллированной воды к лиофилизированным контролям.

16. СХЕМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если инструкции в этом протоколе были соблюдены, образцы были разбавлены в 2 раза (50 мкл образца + 50 мкл Рабочего буфера (1x)) и концентрация, рассчитанная из стандартной кривой, должна быть умножена на коэффициент разбавления (x 2).

1. Определите количество стрипов, необходимых для анализа
2. Промойте лунки планшета дважды **Промывочным буфером**
3. Приготовьте стандартные разведения добавлением 100 мкл растворенного **Стандарта ИЛ-6** в лунки A1 и A2, создайте разведения стандарта ИЛ-6 в диапазоне от 100 до 1,56 пг/мл переносом по 100 мкл из лунки в лунку. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних лунок (G1, G2).
4. Внесите по 100 мкл **Рабочего буфера** в лунки «Бланк».
5. Внесите по 50 мкл **Рабочего буфера** в лунки, предназначенные для образцов.
6. Внесите по 50 мкл каждого **образца** в дублях в соответствующие лунки.
7. Приготовьте **биотиновый конъюгат**.
8. Добавьте по 50 мкл готового **биотинового конъюгата**, во все лунки, включая Бланк.
9. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C).
10. Приготовьте **Стрептавидин-HRP**
11. Полностью удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза **Буфером для промывок**.
12. Внесите по 100 мкл **Стрептавидин-HRP** во все лунки.
13. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C).
14. Полностью удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза **Буфером для промывок**.
15. Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора** во все лунки, включая Бланк.
16. Инкубируйте при комнатной температуре (18–25°C) примерно 10 минут
17. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все лунки, включая Бланк.
18. Бланкируйте микропланшетный ридер и определите оптическую плотность всех лунок при длине волны 450 нм.