

Набор ИФА для количественного измерения предстательной кислотной фосфатазы (PAP)

Каталог. № :EIA-1566
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 06-04-2006

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

Этап	(комнатная темп. 20-25°C)	Объем	Время инкубации
1	Образцы и калибраторы	50 мкл	
2	Разбавитель образца	50 мкл	30 минут
3	Промыть 3 раза дист. водой	350 мкл	
4	Ферментный конъюгат	100 мкл	30 минут
5	Промыть 3 раза дист. водой	350 мкл	
6	Хромогенный субстрат ТМВ	100 мкл	30 минут
7	Стоп раствор	100 мкл	
8	Считывание ОП при 450 нм		

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Для количественного измерения предстательной кислотной фосфатазы (PAP) в сыворотке или плазме человека.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Ферментная активность предстательной кислотной фосфатазы (PAP) была впервые измерена в моче мужчин и как показала исследования она локализована в органах генитального тракта мужчин. Гутман и его коллеги заявили, что PAP может быть важным маркерным геном опухоли в пациентах с раком простаты, потому что обнаруженные концентрации PAP в сыворотке оказались повышенными в мужчин с первичной предстательной карциномой и метастатическими повреждениями простаты.

В 1938, Гутман и Гутман зафиксировали повышенную активность кислотной фосфатазы в сыворотке в пациентов с раком предстательной железы, особенно с метастазами кости. Последующие изучения подтвердили, что повышенная ферментная активность предстательного происхождения; также, свойства этого предстательного фермента отличались от таковых кислотной фосфатазы в здоровой сыворотке.

Много лет кислотная фосфатаза в сыворотке измерялась спектрофотометрическими анализами, основанными на действии фермента. Эти колориметрические методы используют различные субстраты, некоторые вместе с дифференциальными ингибиторами предстательной кислотной фосфатазы. В общем, этим анализам не достает чувствительности или специфичности; также, стабильность ферментативной активности сыворотки зависит от времени, температуры и pH. ИФА был разработан, чтобы предложить метод высокой чувствительности и специфичности.

ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Набор ИФА PAP компании «Диагностик Аутомейшн Инк.» (ДАИ) – микролуночный иммуноферментный анализ, основанный на принципе «сэндвича». Лунки покрыты анти-PAP антителами. Образцы и стандарты инкубируются в покрытых лунках. В течение инкубации, при наличии антигена, на лунках образуется комплекс. Несвязанные вещества смываются. Затем добавляется ферментный конъюгат, образуя сэндвич комплекс. Несвязанные вещества смываются снова. Хромогенный субстрат ТМВ добавляется для того, чтобы образовался цвет. Ферментативная реакция останавливается добавлением и интенсивность образовавшегося цвета считывается с помощью микролуночного считывателя при 450 нм. С использованием стандартов PAP в образцах определяется из калибровочной кривой.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- | | |
|---|----------------------|
| 1. Микролуночные полоски: лунки, покрытые анти-PAP антителами | 12 полосок x 8 лунок |
| 2. Хромогенный субстрат ТМВ: янтарная | 1 флакон (15 мл) |

бутылка.

- | | |
|---|-------------------|
| 3. Ферментный конъюгат: раствор красного цвета. Анти-PAP антитела, конъюгированные пероксидазой хрена | 1 флакон (12 мл) |
| 4. Разбавитель образца. | 1 флакон (12 мл) |
| 5. Набор стандартов: 0, 1.5, 5, 15, 30, 60 нг/мл | 1 флакон (1.0 мл) |
| 8. Стоп раствор: 2 N HCl. | 1 флакон (12 мл) |

СБОР И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

1. Соберите образцы крови и отделите сыворотку.
2. Образцы могут храниться при 2-8°C до 7 дней или в замороженном виде до 6 месяцев. Избегать повторного размораживания и размораживания образца сыворотки.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не пипетировать ртом. Не курить, не принимать пищу и не пить в помещениях где используются образцы или реагенты набора.
2. Компоненты данного набора предназначены для применения как целостной единицы. Нельзя перемешивать компоненты из разных партий.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8°C.
2. После вскрытия мешочка остальные лунки необходимо немедленно герметично закрыть в мешочке с высушивающими средствами. Рекомендуется использовать лунки в течении 4 недель.
3. Реагенты стабильны до окончания срока годности набора.
4. Не поддавать реагенты анализа влиянию тепла, солнца или сильного света во время хранения или использования.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

1. Привести все образцы и реагенты набора к комнатной температуре (20-25°C) и осторожно перемешать.
2. Довести до готовности все реагенты и образцы перед началом анализа. Как только наялся анализ он должен быть проведен без прерывания, чтобы получить наиболее достоверные и непротиворечивые результаты.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите желаемое количество покрытых полосок в держатель.
2. Внесите по 50 мкл стандартов и образцов в соответствующие лунки.
3. Внесите по 50 мкл разбавителя образца в каждую лунку и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
4. Удалить инкубационный раствор и промыть 3 раза дистиллированной или водопроводной водой.
5. Внесите по 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
6. Удалить инкубационный раствор и промыть 3 раза дистиллированной или водопроводной водой.
7. Внесите по 100 мкл хромогенного субстрата ТМВ в каждую лунку и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
8. Добавить по 100 мкл стоп раствора, чтобы остановить реакцию.
9. Считайте ОП микролуночным считывателем при 450 нм.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

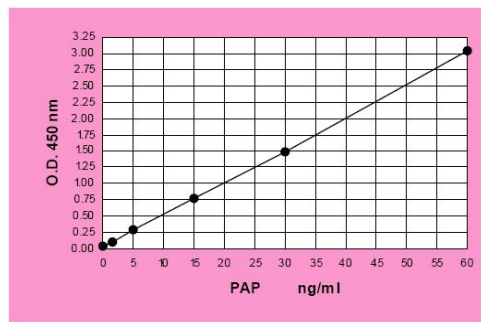
1. Важно тщательно промывать микролунки и удалять последние капельки воды, чтобы достичь лучших результатов.
2. Пипетировать все реагенты и образцы на дно лунок.
3. Абсорбция - функция времени и температуры инкубаций. Рекомендуется снять все крышки из реагентов и образцов и расположить и закрепить в держателе все необходимые лунки. Это будет гарантировать равномерное распределение времени без прерывания при каждом пипетировании.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Создайте калибровочную кривую построением ОП при 450 нм на оси ординат против концентрации PAP в нг/мл на оси абсцисс на миллиметровке или логарифмической графической бумаге.
2. Используя значение ОП каждого образца, определите концентрацию PAP из калибровочной кривой.

3. Типичный пример:

Набор калибраторов	PAP (нг/мл)	ОП при 450 нм		Средн. ОП при 450	СО	КВ %
Калибратор 1	0	0.046	0.041	0.044	0.004	8.128
Калибратор 2	1.5	0.108	0.099	0.104	0.006	6.149
Калибратор 3	5	0.302	0.306	0.304	0.003	0.930
Калибратор 4	15	0.773	0.778	0.776	0.004	0.456
Калибратор 5	30	1.501	1.464	1.483	0.026	1.765
Калибратор 6	60	3.003	3.059	3.031	0.040	1.306
Контроль 1-40121	1.740	0.116	0.113	0.115	0.002	1.853
Контроль 2-40122	27.591	1.232	1.229	1.231	0.002	0.172

**ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ**

- Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория определила свои собственные диапазоны нормы и патологии.
- Результаты клинического изучения с использованием ИФА PAP ДАИ были обобщены:
 - Были проанализированы образцы сыворотки от 95 людей в норме. В этой совокупности 99 % значений составили меньше чем 3 нг/мл.
 - Были проанализированы образцы от 69 пациентов с легкой предстательной гипертрофией (ВРН) и 94% полученных значений составили меньше чем 3 нг/мл.
 - Образцы от 43 пациентов с предстательной карциномой были проанализированы с результатом 81 % выше чем 3 нг/мл.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**Точность (восстановление)**

Исследования восстановления были проведены путем смешивания аликвота объединенной сыворотки и PAP стандарта. Значения PAP были измерены и определено процентное соотношение воспроизведение.

Исходные значения нг/мл	Насыщ. конц. нг/мл	Ожидаемые Значения нг/мл	Наблюд. значения нг/мл	Восстановл. %
A:	4	5	4.5	100
	4	15	9.5	105
	4	30	17.0	99
B:	10.8	5	7.9	105
	10.8	15	12.9	101
	10.8	30	20.4	99
C:	28	3	15.5	97
	28	5	16.5	103
	28	15	21.5	109

Параллелизм

Разбавление	Вычисленный (нг/мл)	Наблюдаемый (нг/мл)	Восстановл. %
4 в 4		86.0	
3 в 4	64.5	69.7	108
2 в 4	43.0	45.2	105
1 в 4	21.5	21.0	98

Точность (воспроизводимость)

Коэффициент вариации между анализами (к-во=12) и в пределах анализа (к-во = 12) был оценен в 3 различных объединенных образцах сыворотки:

Между анализами				В пределах анализа		
Объед. А Объед. В Объед. С				Объед. А Объед. В Объед. С		
К-во	12	12	12	12	12	12
Среднее (нг/мл)	3.73	9.91	18.7	5.62	11.21	22.75
СО (нг/мл)	0.20	0.98	0.96	0.23	0.62	0.94
КВ %	5.28	9.92	5.15	4.15	5.57	4.14

Чувствительность**(минимальная обнаруживаемая концентрация)**

Минимальная обнаруживаемая концентрация PAP составляет 0.2 нг/мл. Минимальная обнаруживаемая концентрация определена как та концентрация PAP, которая соответствует значению абсорбции, то есть, двум стандартным отклонениями больше чем среднее значение абсорбции 20 определений репликаторов разбавленных образцов.

Специфичность (перекрестная реактивность)

Следующие человеческие гормоны и опухолевые маркеры были проанализированы на перекрестную реактивность данного анализа.

Проанализированные Гормоны или опухолевые маркеры	Количество	Эквивалент создавшейся интенсивности света для PAP (нг/мл)
Человеческий TSH	25 МЕ/мл	Неопределяемый
Человеческий AFP	100 МЕ/мл	Неопределяемый
Человеческий CEA	30 нг/мл	Неопределяемый

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Значения PAP должны использоваться как дополнение к другим данным, располагаемым врачом.
- Чтобы получить точное значение образца с уровнем PAP более чем 60 нг/мл, он должен быть разбавлен.

Литература:

(См. в оригинале инструкции).