



Набор ИФА для определения НЕЙРОН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭНОЛАЗЫ (НСЭ)

Кат. № : 6334Z
Количество : 96
Производитель : DAI (США)

Методика от 10-10-2009

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

Анализ	NSE ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конкурирующий, конъюгированный пероксидазой ИФА
Диапазон обнаружения	0-200 нг/мл
Образец	15 мкл сыворотки
Специфичность	98,7%
Чувствительность	15 нг/мл
Общее время	~ 80 мин.
Срок годности	12-14 мес.

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор является иммуноферментным анализом (ИФА), предназначен для количественно измерения человеческой НСЭ в сыворотке для клинической оценки пациентов с подозрениями на наличие раковых клеток легких и других связанных заболеваний.

ВВЕДЕНИЕ

Гликолитическая ферментная эналаза (2-фосфо-D-глицерато гидролиза, EC 4.2.1.11) существует в виде нескольких димерных изоферментов ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$, $\beta\beta$ и $\gamma\gamma$) образованных из трех субъединиц α , β и γ . γ -единица обнаружена или в гомологических $\gamma\gamma$ - или в гетерологических $\alpha\gamma$ -изоферментах и известна как нейрон-специфическая эналаза (НСЭ). Моноклональные антитела, используемые в данном наборе, связаны с γ -субъединицей фермента и, следовательно, детектируют и $\gamma\gamma$ и $\alpha\gamma$ формы (1). Уровни НСЭ низки у здоровых людей и пациентов с легкими заболеваниями. Повышенные уровни обычно обнаруживаются у пациентов с сильными нейроэндокринными опухолями, особенно с мелкоклеточным раком легких (2) и нейробластомой (3). Опухоль легких является одним из наиболее быстро распространяющихся форм болезни и составляет 50-100 случаев на 100000 населения. Приблизительно 20% рака легких это мелкоклеточный рак. Пациенты с мелкоклеточным раком показывают разные пропорции изоферментов $\alpha\gamma$ и $\gamma\gamma$. Определение НСЭ также должно определять у изоформу с той самой чувствительностью. Антитела для этой части анализа являются только специфическими к γ -субъединицам без перекрестной реактивности с α и β субъединицами. НСЭ, как показано, используется как диагностический маркер рака легких, нейробластомы, миеломы, семиномы и при повреждении центральной нервной системы. Также он используется для контроля за эффективностью лечения и обнаружения рецидивов болезни.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Этот набор основан на принципе твердофазного иммуноферментного анализа. В нем используется уникальное моноклональное анти- γ НСЭ антитело для иммобилизации солидной фазы (микропланшетные лунки) и другое моноклональное анти- γ НСЭ антитело в растворе конъюгата антитело-энзим (пероксидаза хрена). Стандарты и образцы теста добавляются в микропланшетные лунки, покрытые антителом. Во время инкубации специфическое специфическое НСЭ связывается с анти-НСЭ антителом на ячейке. Несвязанный НСЭ антиген вымывается промыванием лунок буфером. Ферментный конъюгат потом добавляется в каждую лунку. После следующей инкубации несвязанный ферментный конъюгат и количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации присутствующего НСЭ в каждом образце. После добавления субстрата и хромогена интенсивность голубого цвета пропорциональна концентрации НСЭ антигена в образцах.

МАТЕРИАЛЫ И КОМПОНЕНТЫ

Материалы, входящие в состав наборов:

- Планшет с лунками, покрытыми моноклональным анти-НСЭ антителом, 96 лунок.
- Разбавитель образцов (12 мл)
- Реагент ферментного конъюгата, 12 мл
- Лиофилизированные референтные стандарты НСЭ: 0; 5; 15; 40; 100 и 200 нг/мл НСЭ. 1 набор.
- Концентрат промывочного буфера, 50x, 15 мл
- Субстрат ТМБ, 12 мл
- Стоп-раствор, 12 мл.

Требуемые, но не поставляемые материалы:

- Точные пипетки и наконечники: 5-40 мкл, 0,05-0,2 мл и 1,0 мл.
- Одноразовые наконечники для пипеток.
- Дистиллированная вода.
- Вихревой смеситель (вортекс).
- Промокательная бумага или бумажное полотенце.
- Микротитровальный планшет-ридер.
- Бумага для построения графиков.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. Кровь необходимо собирать, используя стандартную методику венепункции, и как можно быстрее необходимо отделить сыворотку от красных кровяных клеток. Избегайте сильно гемолизированных, липемических и мутных образцов.
2. Образцы плазмы, собранные в пробирки, содержащие EDTA, гепарин или оксалат могут влиять на процедуру, поэтому их не следует использовать.
3. Длительное хранение цельной крови может вызывать освобождение НСЭ из клеток крови. Если сыворотка не может анализироваться немедленно, она может храниться при 2-8°C один день или замороженная до -20°C до 30 дней перед тестом. Образцы не должны повторно замораживаться. Не рекомендуется повторное замораживание / размораживание. Не храните в саморазмораживающемся холодильнике.
4. Не используйте гиперлипемическую, гемолизированную сыворотку. Не рекомендуется использовать плазму, поскольку НСЭ может освобождаться из тромбоцитов.
5. Избегайте мутных или загрязненных образцов.

ХРАНЕНИЕ НАБОРОВ И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

1. Невскрытые наборы следует хранить при 2-8°C, а планшет – в закрытой упаковке с влагопоглотителем до конца срока годности. Тестовый набор может использоваться до окончания срока пригодности (один год после даты изготовления). Смотрите дату пригодности, указанную на этикетке.
2. Вскрытый набор остается стабильным до окончания срока пригодности при хранении как указано выше.
3. Микропланшет с шириной ДРОЖКИ 10 нм или меньше и оптической плотностью 0-2 ОП или выше при длине волны 450 нм используется для измерения абсорбции.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Перед использованием доведите реагенты до комнатной температуры (18-22°C) и смешайте легким переворачиванием или вращением. Избегайте образования пены.
2. Добавьте 0,5 мл дистиллированной воды для разведения лиофилизированных стандартов. Выдержите разведенные материалы 20 минут. Легко смешайте. Разведенные стандарты должны храниться при 2-8°C.
3. Разбавьте 1 часть промывочного буфера (50x) 49 частями дистиллированной воды. Например, разбавьте 15 мл промывочного буфера (50x) дистиллированной водой, чтобы приготовить 750 мл промывочного буфера (1x). Перед использованием хорошо перемешать.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Поместите нужное количество лунок в рамку для стрипов.
2. Внесите 25 мкл стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
3. Внесите 100 мкл разбавителя образца в каждую лунку.
4. Тщательно перемешайте 10 секунд. Очень важно добиться полного смешивания на этом этапе.
5. Инкубируйте при комнатной температуре (18-25°C) 30 минут.
6. Удалите инкубационный раствор.
7. Промойте и опустошите микролунки 5 раз промывочным буфером.
8. Резко переверните лунки на абсорбирующую бумагу для удаления оставшихся капель воды.
9. Внесите 100 мкл реагента ферментного конъюгата в каждую лунку. Легко смешайте 5 секунд.
10. Инкубируйте при комнатной температуре 30 минут.
11. Удалите инкубационный раствор.
12. Промойте и опустошите микролунки 4 раза промывочным буфером.

13. Резко переверните лунки на абсорбирующую бумагу для удаления оставшихся капель воды.
 14. Внесите **100 мкл ТМБ субстрата** в каждую лунку. Осторожно перемешайте 5 секунд.
 15. Инкубируйте при комнатной температуре **20 минут**.
 16. Остановите реакцию добавлением **100 мкл стоп раствора** в каждую лунку.
 17. Осторожно перемешайте **30 секунд**, чтоб голубой окрас изменился полностью на желтый.
 18. Считайте оптическую плотность при 450 нм микропланшетным ридером в течении **30 минут**.
4. Высокие значения НСЭ могут быть обнаружены при диализе пациентов с лейкоимической болезнью.
 5. Сыворотка не должна содержать видимый гемолиз, поскольку эритроциты содержат значительное количество НСЭ.
 6. Длительное хранение цельной крови может вызывать освобождение НСЭ из клеток крови.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ООО «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

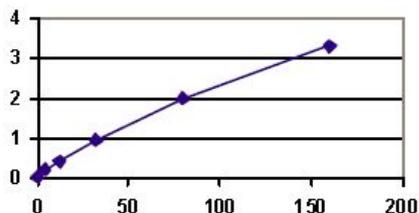
ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определите среднюю абсорбцию для каждого набора стандартов, контролей и образцов. Постройте стандартную кривую, откладывая точки средней абсорбции стандартов на вертикальную ось Y, против соответствующих концентраций на горизонтальную ось X. Используйте среднее значение поглощения для каждого образца, чтобы определить соответствующее значение концентрации НСЭ в Е/мл из стандартной кривой. Разбавленные образцы должны быть скорректированы на коэффициент разбавления.

ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты получают с помощью калибровочной кривой. Пример построения калибровочной кривой приведен в качестве иллюстрации. Его нельзя использовать для расчета концентраций НСЭ в образцах.

Значения НСЭ (нг/мл)	Поглощение (450 нм)
0	0,010
5	0,195
15	0,418
40	0,928
100	1,980
200	3,309



Эта калибровочная кривая только для иллюстрации и не должна использоваться для вычисления. Каждый пользователь должен строить собственную кривую.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

1. Рекомендуется, что б каждая лаборатория определяла собственные нормальные и патологические границы, принимая во внимание такие коэффициенты окружающей среды, как дата, климат и т.д.
2. Были проведены изучения НСЭ набора и были получены следующие результаты: «Почти все индивиды имели значения НСЭ ниже 15 нг/мл (95 процентов).
3. Ожидаемые значения показаны только для иллюстрации и необязательно отображают полученные данные в клинической лаборатории.

ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

1. Для диагностических целей результаты НСЭ теста должны использоваться с другими доступными физиологическими данными.
2. НСЭ тест не должен использоваться в скрининге опухоли и не должен заменять клинические исследования.
3. Образцы с уровнем НСЭ выше 180 нг/мл должны быть разбавлены для получения точных значений.