

НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНДОТЕЛИНА (1-21)

BI-20052, Endothelin (1-21)

Каталог. № : BI-20052
Количество : 96
Производитель: Biomedica
(Австрия)

Методика от 01-07-2009
Проверено 16-02-2012



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Расщепление большого эндотелина мембрансвязанной металлопротеиназой, эндотелин превращающим энзимом (ECE), приводит к образованию активного ЭТ (1-21), потенциального вазоконстриктора и биологически неактивного С-концевого фрагмента (22-38). Период полураспада в плазме составляет менее чем 1 минуту, в то время как расщепление большого эндотелина осуществляется значительно медленнее. Эндотелин обнаружен в различных тканях, включая легкие, почки, мозг, гипофиз, периферические эндокринные ткани и плацента. Биологическая роль ЭТ кроме регуляции сосудистого тонуса включает свойства регулятора роста. Пептид взаимодействует аутокринным/паракринным образом со специфическими рецепторами к эндотелину, обнаруженными на различных клетках, включая гладкую мускулатуру, миоциты и фибробласты.

Возможное применение

- Сердечная недостаточность и острый инфаркт миокарда.
- Онкология
- Маркер эндотелиальной дисфункции, повреждений печени и почечных заболеваний
- Гипертензия

2. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

	СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА	КОЛИЧЕСТВО
PLATE	Поликлональные антитела к Эндотелину, в виде микропланшета с лунками, в запечатанном пакете с осушителем.	12X8 тестов
WASHBUF	Концентрат промывающего буфера (20-кратный)	1x50 мл
AB	Обнаруживающее антитело-моноклональное мышинное антитело к эндотелину, зеленая крышка, готовое к использованию	1x22 мл
STD	Стандарты (0-10 фмоль/мл), содержащих синтетический человеческий эндотелин (1-21) в человеческой плазме, белые крышки лиофилизированные.	6 фл. лиофилизирован.
CTRL	Контроли, содержащие синтетический человеческий эндотелин-1 (1-21) в человеческой плазме, желтые крышки лиофилизированный. Концентрации контролей после разбавления указаны на флаконах.	2 фл. лиофилизирован.
CONJ	Конъюгат, (анти-мышинное IgG антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена), янтарная крышка, готов к использованию.	1x22 мл
SUB	Субстрат (раствор ТМБ), синяя крышка готовый к использованию.	1x22 мл
STOP	Стоп раствор, белая крышка, готовый к использованию.	1x7 мл
ET-STOCK	Исходный раствор, содержащий синтетический человеческий эндотелин-1(1-21), лиофилизированный, красная крышка. Концентрация после разбавления указана на этикетке.	1 фл. лиофилизирован.

3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ

- Самоклейкие пленки для микропланшета (2 шт.)
- Протокол контроля качества
- Протокол анализа
- Инструкция по применению.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Откалиброванные пипетки переменного объема на 50 мкл, 200 мкл, 300 мкл, 500 мкл и одноразовые наконечники
- Микропланшетный считыватель с фильтром на 450 нм (или от 450 нм до 620 нм)
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов
- Дистиллированная или деионизированная вода.

5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ

Подготовка образца:

Сыворотка, ЭДТА плазма, моча, слюна, супернатант культуры тканей могут использоваться в этом анализе. Не меняйте тип образца во время исследований. Свежесобранные образцы плазмы с ЭДТА или сыворотки должны быть помещены на лед немедленно после взятия и отцентрифугированы в течение 1 дня. Образцы следует хранить при температуре -20 °C или ниже, для более длительного периода хранения при -70°C. Образцы мочи могут использоваться без предварительной обработки.

Избегайте повторных циклов замораживания и размораживания. Липемические или гемолизированные образцы могут давать ошибочные результаты. Перед анализом образцы следует тщательно перемешать. Рекомендуется исследовать все образцы в дублях. Если необходимо разбавить образцы с высокой концентрацией используйте 0,9 % раствор хлорида натрия.

Разбавление/обращение:

- Стандарты** (белая крышка): растворите в 0,5 мл дистиллированной воды и оставьте при комнатной температуре (18-26°C) на 30 минут, тщательно перемешайте. Растворенные стандарты стабильны при -25°C или ниже до истечения срока годности, указанного на флаконе. Не допускайте повторных циклов заморозки-оттаивания!
- Контроли** (желтые крышки) разбавить в 0,5 мл дистиллированной воды и оставьте при комнатной температуре (18-26°C) на 30 мин. Растворенные контроли стабильны при -25°C или ниже до истечения срока годности, указанного на флаконе. Не допускайте повторных циклов замораживания/размораживания!
- Промывочный буфер** разбавить 1:20 дистиллированной водой (добавьте 50 мл концентрата к 950 мл дистиллированной воды). Кристаллы должны раствориться при комнатной температуре. Буфер стабилен при 2-8°C до истечения срока годности, указанного на флаконе.
- Исходный раствор** (красная крышка). Прямое измерение эндотелина в супернатанте культуры тканей: разведите в 2 мл среде культуры тканей при комнатной температуре (18-26°C) и оставьте на 30 минут, тщательно перемешайте. Точная концентрация после разбавления указана на флаконе, напр.: 10 фмоль/мл. Растворенный исходный раствор стабилен при -25°C или ниже до истечения срока годности, указанного на флаконе. Не допускайте повторных циклов замораживания/размораживания

Измерение образцов культуры клеток

Не используйте стандарты плазмы (белая крышка) и контроли (желтая крышка)!

- Приготовьте последовательные разведения исходного раствора эндотелина (ET-STOCK, красная крышка) в культуральной среде до значения 0,625 фмоль/мл (например, 10/5/2,5/1,25/0,625 фмоль/мл). Культуральную среду используйте в качестве нулевого стандарта.
- Разбавьте супернатант культуры клеток соответственно ожидаемой концентрации культуральной средой. Разведение супернатанта зависит от количества эндотелина, секретируемого соответствующим типом клеток.

Измерение образцов слюны

Для забора слюны мы рекомендуем Sarstedt Salivetes

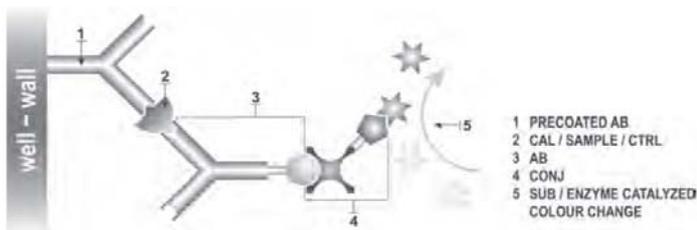
Забор образцов:

Исключите употребление мяса и сигарет по крайней мере за час перед забором образцов:

- Прополощите рот водой, подождите 10 минут.
- Положите ватный рулон пробирки Sarstedt Salivette в рот, пожайте 30 секунд, подержите во рту еще 2 минуты.
- Положите рулон из ваты на ровное дно верхней пробирки Salivette, закройте пробкой и центрифугируйте 3 мин. при 1000g.

- Выньте пробирку с ровным дном из Саливетта и пипетируйте чистую слюну из дна V-подобной пробирки, приготовьте аликвоты и храните при -20°C или -70°C.
- Используйте чистую слюну согласно протоколу анализа.

6. ПРИНЦИП АНАЛИЗА



7. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты следует привести к комнатной температуре (18-26)°C.

Пометьте на схеме плашки ячейки бланка, стандартов, контролей и образцов.

Извлеките из пакета полоски микропланшета и пометьте их согласно схеме. Одну лунку отведите под бланк. Неиспользованные полоски запечатайте обратно в пакет и храните его при 2-8°C до истечения срока годности, указанного на пакете.

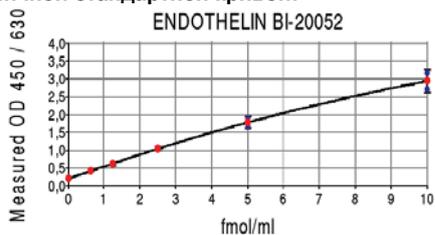
1. Внесите по 50 мкл стандартов, образцов и контролей в дубликаты в соответствующие ячейки, кроме бланка.
2. Добавьте по 200 мкл детектирующих антител в каждую лунку, кроме бланка, осторожно перемешайте.
3. **Накройте полоски пленкой и инкубируйте в течение ночи (16-24 часа) при комнатной температуре (18-26°C).**
4. Полностью удалите содержимое лунок и промойте их 5 раз с 300 мкл промывающего буфера. Удалите остаток жидкости в лунках после последней промывки постучав планшетом по фильтровальной бумаге.
5. Добавьте 200 мкл конъюгата в каждую лунку.
6. **Накройте полоски пленкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18-26°C).**
7. Полностью удалите содержимое лунок и промойте их 5 раз 300 мкл разбавленного промывающего буфера. Удалите остаток жидкости в лунках после последней промывки переворачиванием полосок на бумажное полотенце.
8. Внесите по 200 мкл субстрата во все ячейки.
9. **Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (18-26°C) в темноте.**
10. Добавьте по 50 мкл стоп-раствора во все ячейки, перемешайте содержимое лунок.
11. Определите оптическую плотность лунок при 450 нм с фильтром сравнения 620 нм.

8. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оптическая плотность бланка вычитается из значений ОП остальных лунок. Калибровочная кривая строится на основе результатов измерения стандартов. Используйте программное обеспечение или миллиметровую бумагу. Получите концентрацию образца с этой калибровочной кривой. Рекомендуется использование 4-параметрической кривой. Необходимо учитывать фактор разбавления.

Поставляемый с набором протокол контроля качества указывает на последние результаты по качественному контролю для каждого набора. Данные оптической плотности, полученные исследователем могут отличаться из-за различных воздействий и/или в соответствии с нормальным уменьшением интенсивности сигнала в процессе срока эксплуатации.

Пример типичной стандартной кривой:



9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Нормальные границы:	Медиана: 0,26 фмоль/мл (n=70) Каждая лаборатория должна установить собственные границы
Диапазон стандартов:	0-10 фмоль/мл

Объем образца:	50 мкл человеческой EDTA плазмы, сыворотки, мочи, слюны или супернатанта культуры клеток.
Диапазон определения:	(0 фмоль/мл + 3 CD): 0,02 фмоль/мл
Инкубационное время:	На ночь/60 мин./30 мин.
Перекрестная реактивность:	ET 1 (1-21): 100%, ET 2 (1-21): 100%, ET 3 (1-21): <5%, Высокий эндотелин (1-38) <1%, Высокий эндотелин (22-38) <1% В образцах нормальной человеческой плазмы уровень ET-2 составляет менее 20% уровня ET-1. Уровень ET-3 составляет 50% уровня ET-1. Сыворотка животных: Конь, кот, свинья 100%; собака 66% и крыса 79%. Сыворотка мыши не может быть измерена в этом анализе.

Восстановление

Протокол (n=4)	Обогащение 1 фмоль/мл	Обогащение 5 фмоль/мл
Восстановление (фмоль/мл)	0,96	4,3
Восстановление (%)	96	86

10. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Внутри серии: 2 образца с известными концентрациями были анализированы 18 раз (n=18)

Среднее (фмоль/мл)	2,02	7,01
SD	0,08	0,21
CV%	4	3

Между сериями (n=24):

Среднее (фмоль/мл)	3,8	0,8
SD	0,2	0,04
CV%	6	5

11. ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

Не используйте реагенты из различных лотов или источников.

Не допускайте смешивания крышек и флаконов различных реагентов

Не используйте реагенты по истечении срока годности.

Защищайте реагенты от прямых солнечных лучей

Раствор субстрата должен оставаться бесцветным до внесения в плашку.

Для получения точных результатов необходимо тщательной запечатывание плашки пленкой при инкубации.

12. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Компоненты набора, содержащие материалы человеческого происхождения, протестированы тестами 3-го поколения на отсутствие антител к ВИЧ и HBsAg с отрицательным результатом. Однако с реагентами и образцами следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

Все жидкие компоненты набора содержат 0,01% проклин 300 в качестве консервантов. Проклин 300 не токсичен в концентрации, что используется в этом наборе. Он может вызвать аллергическую реакцию кожи – избегайте контакта с кожей или глазами.

Не пипетируйте ртом.

В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить

Используйте защитные перчатки при работе.

Стоп раствор содержит разбавленную серную кислоту, которая может вызвать раздражение глаз и кожи. При попадании стоп раствора на кожу промойте место контакта большим количеством воды.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»