

НАБОР ИФА ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО, РАСТВОРИМОГО, НЕСВЯЗАННОГО RANKL ЧЕЛОВЕКА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ

BI-20462, FREE soluble RANKL High Sensitivity

Каталог. № : BI-20462

Методика от 18-03-

Количество : 96

2014

Производитель: Biomedica (Австрия)



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

**Только для использования в исследовательских целях
Не для использования в диагностических процедурах**

1) КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

sRANKL - растворимый лиганд рецептора активатора нуклеарного фактора транскрипции каппа-В, принадлежит семейству фактора некроза опухоли (TNF), это основной фактор, стимулирующий образование зрелых остеокластов, он необходим для поддержания их жизнеспособности. Вырабатывается остеобластами и активированными Т лимфоцитами. Он активирует свой собственный специфический рецептор, RANK, локализованный на мембране клеток-предшественников остеокластов и дендритных клеток.

Влияние, оказываемое RANKL, может ингибироваться остеопротегерином (OPG) (см. BI-20402 OPG ELISA), который секретируется различными тканями и действует как эндогенный растворимый рецептор-антагонист.

Основным источником RANKL являются остециты, бывшие остеобласты, которые зафиксированы в минерализованной костной матрице. RANKL представляет собой трансмембранный белок II типа, примерно 35 кДа, при расщеплении которого образуется растворимый биологически активный продукт, представляющий собой гомотимер.

RANKL и его специфичный RANK рецептор являются не только ключевыми регуляторами ремоделирования кости, они также играют важную роль в иммунологических процессах, например, при формировании лимфатических узлов, создании микроокружения тимуса, развитии молочных желез во время беременности, образовании костных метастазов при раке и раке молочной железы, обусловленном половыми гормонами (прогестин), а также в механизмах терморегуляции, и, наконец, при развитии сахарного диабета 2 типа.

ВОЗМОЖНЫЕ ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- Постменопаузальный и сенильный остеопороз
- Глюкокортикоид-индуцированный остеопороз
- Заболевания с локальной резорбтивной активностью
- Артриты
- Онкозаболевания
- Сахарный диабет 2 типа

2) РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

| Обозначение | Компонент набора | Количество |
|-------------|--|-------------------------------|
| PLATE | Стрипованный микропланшет с лунками, покрытыми рекомбинантным OPG в держателе | 12 x 8 тестов |
| WASHBUF | Концентрат промывающего буфера 20X, бесцветный колпачок | 1 x 50 мл |
| ASYBUF | Рабочий буфер, готов к использованию, красный колпачок | 1 x 7 мл |
| AB | Поликлональные биотинилированные антитела козла к sRANKL, готовы к использованию, зеленый колпачок | 1 x 22 мл |
| STD | Стандарты, (0; 0.625; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2 пмоль/л), белые колпачки | 7 флаконов, лиофилизированный |
| CTRL | Контроли, рекомбинантный человеческий RANKL в человеческой сыворотке, желтые крышки, точная концентрация после восстановления указана на флаконе | 2 флакона, лиофилизированный |

| | | |
|------|---|-----------|
| CONJ | Конъюгат (стрептавидин-полиHRPO), янтарный колпачок, готов к использованию. | 1 x 22 мл |
| SUB | Субстрат (ТМБ-раствор), янтарная бутылочка, синий колпачок, готов к использованию | 1 x 22 мл |
| STOP | Стоп-раствор, белый колпачок, готов к использованию | 1 x 7 мл |

3) ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ

- Пленка для накрывания микропланшета, 3X
- Паспорт контроля качества
- Схема планшета
- Инструкция

4) НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Калиброванные пипетки переменного объема на 50 мкл, 150 мкл, 200 мкл и 300 мкл и одноразовые сменные наконечники к ним
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Автоматическое промывающее устройство (вошер) (рекомендуется) или многоканальная пипетка, диспенсер.
- Холодильник на 4 °C (2-8 °C).
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм (с фильтром сравнения 630 нм)
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для определения результатов

5) ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ

Все реагенты тест-набора стабильны при 4 °C (2-8 °C) до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.

Подготовка образцов:

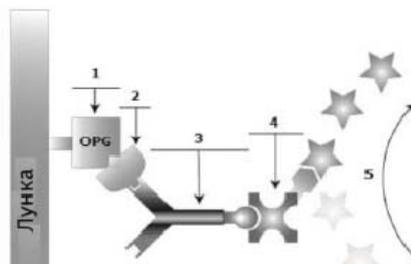
Соберите образцы венозной крови с помощью стандартных пробирок для сбора сыворотки или гепаринизированной плазмы крови. Рекомендовано отделять плазму или сыворотку центрифугированием в максимально короткое время, например, в течение 10 мин при 2000 x g, желательнее при 4 °C (2-8 °C). Если это невозможно, храните образцы при температуре 4 °C (2-8 °C) перед центрифугированием (максимум один день). Полученные образцы плазмы или сыворотки должны быть протестированы в максимально короткое время. Для более длительного хранения алиquotируйте образцы и храните при -25 °C или ниже. Максимальное количество циклов замораживания-оттаивания образцов составляет 3 цикла. При тестировании липемичных или гемолизированных образцов могут быть получены неточные результаты. Перед проведением анализа образцы должны быть хорошо перемешаны. Рекомендовано все образцы тестировать в дублях. Если концентрация аналита в образце выше самого высокого стандарта, рекомендовано его разбавить образцом сыворотки с низким содержанием аналита, и повторно измерить образец. Дополнительная информация по стабильности образцов представлена на веб-сайте www.bmgrp.com (см. Технические файлы).

Растворение/разведение реагентов:

STD (стандарты) и CTRL (контроли): Пипетировать 700 мкл деионизированной или дистиллированной воды в каждую пробирку. Оставить при комнатной температуре (18-26 °C) на 15 минут. Растворенные стандарты и контроли стабильны при температуре -25 °C или ниже до истечения срока годности, указанного на флаконе. Стандарты и Контроли стабильны при размораживании/оттаивании до трех раз.

WASHBUF (Промывающий буфер): Разведите концентрат 1:20 (например, 50 мл концентрата + 950 мл дистиллированной воды). Кристаллы, присутствовавшие в концентрате, должны раствориться при комнатной температуре. Неразведенный Буфер стабилен при температуре 4 °C (2-8 °C) до даты срока годности, указанной на этикетке флакона. Разведенный буфер стабилен в течение месяца при 4 °C (2-8 °C). При выполнении анализа используйте только разведенный буфер для промывок.

6) ПРИНЦИП МЕТОДА



- 1) фиксированный ORC
- 2) свободный sRANKL в образцах/STD/CTRL
- 3) АВ (анти sRANKL – Биотин)
- 4) CONJ (Стрептафидин–HRPO)
- 5) SUB (изменение окрашивания при действии фермента)

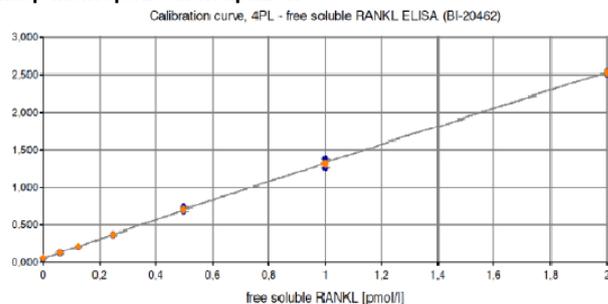
7) ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

| |
|---|
| Перед началом анализа все реагенты должны достичь комнатной температуры (18-26 °C). |
| Пометьте на схеме планшета ячейки бланка, стандартов, контролей и образцов. |
| Извлеките из пакета стрипы микропланшета и пометьте их согласно схеме. Минимум одну ячейку отведите под Бланк. Неиспользованные стрипы запечатайте обратно в пакет с осушителем и храните его при 4 °C до истечения срока годности, указанного на пакете. |
| 1. Предварительно промойте лунки микропланшета 5 раз, используя по 300 мкл разведенного WASHBUF (буфер для промывок, бесцветный колпачок). Удалите остатки буфера из лунок после промывки, постучав перевернутым микропланшетом по фильтровальной бумаге. |
| 2. Внесите по 50 мкл ASYBUF (рабочего буфера, красная крышка) во все лунки микропланшета. В лунку для бланка дополнительно внесите 150 мкл ASYBUF. |
| 3. Внесите по 150 мкл STD/SAMPLE/CTRL стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки в дублях (исключая БЛАНК). |
| 4. Накройте стрипы пленкой и инкубируйте в течение 2 часов при комнатной температуре (18-26 °C). |
| 5. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте их 5 раз, используя по 300 мкл разведенного WASHBUF (буфер для промывок, бесцветный колпачок). Удалите остатки буфера для промывок, постучав перевернутым микропланшетом по чистой фильтровальной бумаге. |
| 6. Внесите по 200 мкл АВ (биотинилированные антитела к sRANKL, зеленый колпачок) в каждую лунку, кроме лунки бланка, аккуратно перемешайте. В лунку для бланка дополнительно внесите 200 мкл ASYBUF (рабочий буфер, красный колпачок). |
| 7. Заклейте лунки адгезивной пленкой и инкубируйте в течение ночи (18-24 часа) при температуре 4 °C (2-8°C). |
| 8. Полностью удалите содержимое лунок и промойте их 5 раз, используя по 300 мкл разведенного WASHBUF (буфер для промывок, бесцветный колпачок). Удалите остатки буфера из лунок после последней промывки, постучав перевернутым микропланшетом по фильтровальной бумаге. |
| 9. Внесите 200 мкл CONJ (конъюгат, янтарный колпачок) во все лунки. |
| 10. Заклейте лунки адгезивной пленкой и инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре (18-26 °C) в темноте. |
| 11. Полностью удалите содержимое лунок и промойте их 5 раз, используя по 300 мкл разведенного WASHBUF (буфер для промывок, бесцветный колпачок). Удалите остатки буфера из лунок после последней промывки, постучав перевернутым микропланшетом по фильтровальной бумаге. |
| 12. Внесите по 200 мкл SUB (субстрат, синий колпачок) во все лунки. |
| 13. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (18-26 °C) в темноте. |
| 14. Внесите по 50 мкл STOP (стоп-раствор, белый колпачок) во все лунки. |
| 15. Сразу же измерьте ОП в лунках при 450 нм с фильтром сравнения 630 нм, если возможно. |

8) РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) во всех лунках на микропланшетном ридере при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 630 нм). Вычитите ОП бланка из значений ОП лунок со стандартами калибраторами и образцами. На основе результатов измерения стандартов постройте калибровочную кривую. Возможно использование коммерчески доступного программного обеспечения, а также миллиметровой бумаги. Результаты измерения образцов определяются по калибровочной кривой. Метод был протестирован с использованием 4-параметрической регрессии. Возможность использования других методов построения калибровочной кривой должна быть оценена пользователем самостоятельно.

Пример калибровочной кривой



9) ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

| | |
|---|--|
| Уровни у практически здоровых лиц: | Медиана (сыворотка, n = 32): 0.14 пмоль/л Каждая лаборатория должна установить свои собственные значения нормы. При исследовании не меняйте вид образцов. |
| Диапазон калибровочной кривой: | 0; 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2 пмоль/л |
| Коэффициент преобразования пг/мл в пмоль/л: | 1 пг/мл = 0.05 пмоль/л (MW: 20 kD, мономер) |
| Объем образца: | 150 мкл человеческой сыворотки или Гепариновой плазмы |
| Предел определения: | (0 пмоль/л + 3 SD): 0.01 пмоль/л / 0.008 пмоль/л |
| Время инкубации: | 2 часа / в течении ночи / 1 час / 30 минут |

10) ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Внутри серии: 2 образца с известной концентрацией протестировано 5 раз одним оператором с использованием одного лота тест-набора. Между сериями анализов: 2 образца с известной концентрацией протестировано 12 раз 3 разными операторами с использованием 3 разных лотов тест-набора.

| Внутри серии (n=5) | | |
|--------------------|-------|------|
| Среднее, пмоль/мл | 0.12 | 1.00 |
| SD (пмоль/мл) | 0.005 | 0.04 |
| CV% | 4 | 4 |

| Между сериями (n=12) | | |
|----------------------|-------|------|
| Среднее, пмоль/мл | 0.12 | 1.00 |
| SD (пмоль/мл) | 0.004 | 0.02 |
| CV% | 3 | 2 |

Дополнительная информация по валидации представлена на веб-сайте www.bmgrp.com (см Технические файлы).

11) ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

- Не используйте или не смешивайте реагенты из различных лотов или других источников.
- Не допускайте смешивания крышек и флаконов различных реагентов.
- Не используйте реагенты по истечении срока годности. Защищайте реагенты от воздействия солнечного света.
- Раствор субстрата должен оставаться бесцветным до внесения в лунки микропланшета.
- Для получения точных результатов необходимо тщательно заклеивать лунки микропланшета пленкой во время инкубаций.

12) ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Все материалы человеческого происхождения, использованные при изготовлении компонентов набора, протестированы методами 3го поколения, одобренными FDA, на отсутствие антител к ВИЧ и HBsAg и при тестировании получены отрицательные результаты. Однако со всеми реагентами и образцами следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

Все жидкие компоненты набора содержат $\leq 0,01$ Проклина 300 в качестве консерванта, который не токсичен в концентрациях, используемых в данном наборе. Проклин 300 может оказывать аллергическое действие при контакте с кожей и слизистыми. Не допускайте попадания реагентов на кожу и слизистые.

- Не пипетируйте ртом.
- В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить, курить или использовать косметику.
- 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
е-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com