

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ НЕЙРОН СПЕЦИФИЧНОЙ ЭНОЛАЗЫ (НСЭ)

EIA-4610, NSE ELISA

Кат. № : EIA-4610
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 09-2013
Версия 10.0



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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения нейрон специфической энтолазы (НСЭ) в человеческой сыворотке.

1.1 Клиническое значение

Нейрон специфичная энтолаза (2-фосфо-D-глицерат гидролаза) 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 ад-изоферментах и известна как нейрон-специфическая энтолаза (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).

Количественное определение НСЭ в сыворотке важно для пациентов с подозрением на мелкоклеточный рак легких или нейробластому для подтверждения диагноза, контроля за эффективностью лечения и обнаружения рецидивов болезни.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор является твердофазным, неконкурентным методом, основанным на двух моноклональных антителах (полученных из мыши), направленных против двух различных антигенных детерминант в молекуле НСЭ. Используемые моноклональные антитела связываются с γ -субъединицей фермента и следовательно, детектируют и $\gamma\gamma$ и $\alpha\gamma$ формы. Стандарты и сыворотки пациентов инкубируются вместе с биотинилированными анти-НСЭ антителами E21 и пероксидазой хрена, меченой моноклональными антителами E17 в покрытых стрептавидином ячейках микропланшета. После промывки в каждую ячейку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментативная реакция. В процессе реакции развивается голубая окраска, если присутствует антиген. Интенсивность окраски пропорциональна количеству НСЭ, присутствующей в образце. Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном ридере при 620 нм (или, что необязательно, при 405 нм после добавления стоп-раствора).

Стандартные кривые строятся для каждого анализа в координатах оптическая плотность против концентрации для каждого стандарта. Концентрация НСЭ в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТЫ

3.1 Поставляемые с набором реагенты и материалы

1. **Стандарты (CAL0-CAL4)**, 2 флакона каждый калибратор, лиофилизированные; внимательно прочитайте пункт 6.1
2. **Контроли**, 2 флакона каждый калибратор, лиофилизированные; Отрицательный и Положительный Контроль внимательно прочитайте пункт 6.1
3. **Инкубационный буфер**, 1 флакон, 50 мл. Фосфатный буфер 50 мМ рН 7.4; BSA 1 г/л.
4. **Конъюгат**, 1 флакон, 1 мл. Пероксидазы хрена анти моноклональный конъюгат НСЭ человека.
5. **Микропланшет**, 1 микропланшет, делимый. Анти моноклональная НСЭ человека, адсорбированная на делимом микропланшете.

6. **Раствор ТМВ субстрата**, 1 флакон, 15 мл. H₂O₂-ТМВ 0.26 г/л (избегайте любого контакта с кожей)
7. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 15 мл, Серная кислота 0.15 моль/л (избегайте любого контакта с кожей)
8. **Концентрат промывочного раствора 50x**, 1 флакон, 20 мл. NaCl 45 г/л; Tween-20 (55 г/л)

3.2 Требуемые, но не поставляемые реагенты

Дистиллированная вода.

3.3 Дополнительные материалы и инструменты

Автоматический дозатор.

Микропланшетный считыватель.

Примечания

Стандарты и Контроли, содержат НСЭ человека в белковом стабилизирующем матричном растворе.

Хранить все реагенты между 2-8 °С в темноте.

Вскройте пакет с реагентом 4 (Покрытый микропланшет) только в комнатной температуре и немедленно закройте после использования.

Не удаляйте защитную пленку из неиспользованных полосок.

После вскрытия набор стабилен до окончания срока годности.

4. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Реагенты содержит Проклин 300 и гентамицин как консервант.
- Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера партий.
- Не используйте высоко гемолизированные образцы.
- Для реабования и распределения реагентов требуется максимальная точность.
- Избегайте попадания реагентов ТМВ/H₂O₂ под прямой солнечный свет, на металлы и оксиданты.
- Обращайтесь с образцами пациентов как с потенциально инфекционно опасными, используя защитные средства как лабораторные халаты и одноразовые перчатки.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Перед началом исследования прочитайте инструкцию полностью и внимательно. Используйте действительную версию инструкции, приложенную к набору. Убедитесь, что вам все понятно.
- Микротитровальная плашка содержит делимые стрипы. Неиспользованные лунки должны храниться при 2 °С - 8 °С в пакете из фольги и использоваться с поставляемой рамкой.
- Пипетирование образцов и реагентов должно осуществляться как можно быстрее и с одинаковыми временными интервалами.
- Используйте резервуары только для одного компонента. Это особенно важно для резервуаров с субстратом. Использование для разлива субстрата емкости, которая прежде использовалась для раствора конъюгата, может привести к изменению цвета раствора. Не сливайте реагенты обратно во флаконы, так это может привести к контаминации реагентов.
- Для получения достоверных результатов тщательно перемешивайте содержимое лунок. Не используйте лунки повторно.
- Не позволяйте лункам высохнуть во время анализа; добавляйте реагенты сразу после промывки.
- Перед анализом доведите все компоненты до комнатной температуры (22-28°C). Температура влияет на показания абсорбции. Тем не менее, не будет влияния на образцы пациентов.
- Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
- Нельзя есть, пить, курить или наносить косметику в месте работы с реагентами.
- Надевайте одноразовые перчатки при раскапывании образцов и реагентов.
- Работа с реагентами должна проводиться в соответствии с процедурами, утвержденными соответствующим управлением биологической безопасности и регулирования.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Все указанные объемы должны соблюдаться в соответствии с инструкцией. Оптимальные результаты возможны только при использовании калибровочных пипеток и микропланшетного ридера.
- Не смешивайте и не используйте компоненты из различных лотов. Рекомендуется не менять лунки разных плашек даже одного лота. Наборы могут транспортироваться или храниться в разных условиях и в результате характеристики связывания у плашек могут отличаться.
- Избегайте контакта со стоп раствором – 0.5M H₂SO₄; 1M HCL. Это может вызвать раздражения кожи или ожоги.

- Некоторые реагенты содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ в качестве консервантов. В случае их контакта с глазами или кожей, промойте этот участок водой.
- Раствор субстрата ТМБ оказывает раздражающий эффект на кожу и слизистые. В случае контакта, промойте глаза с большим объемом воды и кожу с мылом и большим количеством воды. Промойте загрязненные объекты перед повторным использованием. В случае вдыхания реагентов, выведите человека на свежий воздух.
- Химикаты и готовые и использованные реагенты должны быть утилизированы как биологически опасные в соответствии с региональными нормами.
- Информацию об опасных реагентах, используемых в этом наборе, вы можете найти в Паспорте безопасности. Он также доступен по запросу в DRG.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1 Приготовление Стандартов и Контролей

Перед использованием разведите стандарты и контроли 0.75 мл деионизированной воды.

Важное замечание: Восстановленные Калибраторы и Контроли очень чувствительны к температуре, поэтому придерживайтесь следующего:

1. Разведите стандарты и контроли 0.75 мл деионизированной воды.
2. Оставить в миксере на 5 минут.
3. Взять необходимое количество для анализа и немедленно аликвотировать и заморозить при -20 °С неиспользуемые Стандарты и Контроли.

Восстановленные Стандарты и Контроли стабильны 1 месяц при -20 °С; избегать повторных циклов замораживания-оттаивания.

Приблизительные концентрации откалиброванных Калибраторов следующие (нг/мл):

CAL0	CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4
0	4	20	50	100

Точные концентрации для вычисления кривой характерны для отдельной партии и напечатаны на этикетках флаконов стандартов.

6.2 Разбавленный конъюгат

Приготовить непосредственно перед использованием.

Добавить 20 мкл ферментного конъюгата (реагент 4) к 1.0 мл инкубационного буфера (реагент 3). Количество разбавленного конъюгата пропорционально количеству анализов.

Легко перемешайте, оставив на вращающемся встряхивателе по крайней мере на 5 минут.

6.3 Промывочный раствор

Разбавте содержимое концентрата промывочного раствора дистиллированной водой до 1 л.

Для меньших объемов использовать разбавление 1:50.

После разбавления он стабилен при 2-8°C минимум 30 дней.

6.4 Подготовка образца

Определение НСЭ человека должно быть проведено на сыворотке.

Сыворотку следовало бы отделить от крови в течении 60 минут, чтобы избежать прирачивания НСЭ человека от высвобождения клеток крови.

Не используйте гемолизированные образцы. Избегайте использования плазмы до тех пор, пока необходимое количество НСЭ человека можно получить из тромбоцитов.

Образцы могут храниться при 2-8°C в течение 1 дня; для более длительных периодов храните при -20°C. Избегайте повторных замораживаний-размораживаний. Не оставляйте надолго образцы при комнатной температуре.

6.5 Процедура

Поскольку необходимо провести определение в двух экземплярах, приготовьте две лунки для каждой точки стандартной кривой (CAL0-CAL4), две для каждого Контроля, две лунки для каждого образца, одну для бланка.

	Калибратор	Образец/Контроли	Бланк
CAL0 - CAL4	25 мкл		
Образец/контроли		25 мкл	
Разбавл. конъюгат	100 мкл	100 мкл	
Инкубировать при комнатной температуре в течение 1 часа. Удалить содержимое каждой лунки; промойте лунки 3 раза с 300 мкл разбавленного промывочного раствора.			
Раствор субстрата	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубировать при комнатной температуре (25-28°C) в течение 15 часов в темноте.			
Стоп раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Аккуратно потрясти планшет. Считайте абсорбцию (E) при 450 нм по отношению к			

бланку в течение 5 минут.

7. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для контроля эффективности анализа каждая лаборатория должна анализировать контроли при нормальном, высоком и низком уровнях НСЭ человека. Эти контроли должны рассматриваться как неизвестные величины и значения должны определяться в каждой процедуре анализа. Для контроля эффективности поставляемых реагентов необходимо вести таблицы контроля качества. Для выведения тенденции нужно использовать подходящие статистические методы. Каждая лаборатория должна установить приемлемые границы работоспособности анализа. Другие параметры, которые должны быть проверены, включают 80, 50 и 20% отсекающие калибровочной кривой для контроля воспроизводимости в каждой процедуре. Кроме того, максимальная абсорбция должна совмещаться с прошлым опытом. Значительное отклонение от установленной работоспособности может указывать на незаметное изменение в экспериментальных условиях или некачественности реагентов набора. Для определения причины вариативности должны использоваться новые реагенты.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1 Средняя абсорбция

Вычислите среднюю абсорбцию (Em), соответствующую отдельным точкам стандартной кривой (S0-S4) и каждому образцу.

8.2 Стандартная кривая

Выведите значения абсорбции стандартов против концентрации. Нарисуйте соответствующую кривую через выведенные точки. (т.е.: кубический сплайн, сигмоидально-логистическую, или 4-параметровочную логистическую).

8.3 Вычисление результатов

Интерполируйте значения образцов на стандартной кривой, чтобы получить соответствующие значения концентраций, выраженных в нг/мл.

9. КОНТРОЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Значения свыворотки находятся в следующих пределах:

Диапазон нормы: 0 – 12 нг/мл

Патологическое значение: > 12 нг/мл

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Специфичность

Антитело распознает определенно нейрон специфичную енолазу. Значения перекрестной реактивности вычислены на принципе вес/вес:

НСЭ Фицджеральда (Кат. номер 30AN10 Партия A99052602 100 %

НСЭ биогебеза (Кат. 6880-1004 Партия 991105A) < 0.22 %.

10.2 Чувствительность

Самая низкая обнаруживаемая концентрация НСЭ человека, которая может быть выведена из нулевого стандарта – 0.19 нг/мл, при доверительной границе 95 %.

10.3 Точность

10.3.1 В анализе

Точность в анализе составила ≤4.4 %.

10.3.2 Между анализами

Точность между анализами составила ≤11.2 %.

10.4 Корреляция

Данный набор был сравнен с другим имеющимся в продаже аналогичным набором. Было проанализировано 28 образцов сыворотки в обеих анализируемых системах.

Была рассчитана кривая линейной регрессии

(EIA-2353) = 1.34 x (EIA-4610) – 0.66

$r^2 = 0.971$

10.5 “Хук-эффект”

H-NSE ELISA набор не продемонстрировал «хук-эффекта» при концентрации НСЭ человека до 5000 нг/мл.

11. ПРАВИЛА УНИЧТОЖЕНИЯ

Реагенты должны уничтожаться в соответствии с местными правилами.



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