ADMA Xpress ELISA Kit
Асимметричный диметиларгинин (ADMA), 96
Иммуноферментный набор для определения ADMA в образцах плазмы и сыворотки.

Кат. № K7860

96 определений
Хранить при 2 - 8 °C

Замечание от ЗАО «БиоХимМак»
Уважаемые коллеги! Русская версия инструкции переведена с английского варианта. Обратите внимание на соответствие номера и даты версии английской инструкции, вложенной в набор, с русским переводом. Если версии на русском и английском языках не совпадают, обратитесь в ЗАО «БиоХимМак» за исправленным русским вариантом или используйте инструкцию на английском языке.

Версия от 24.04.2014

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для количественного определения **асимметричного диметиларгинина (АДМА, ADMA) в** образцах ЭДТА плазмы и сыворотки. Набор предназначен только диагностики in vitro.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Асимметричный диметиларгинин (ADMA) является эндогенным ингибитором NO-синтазы. Он образуется в процессе протеолиза метилированных белков и выводится с мочой или метаболизируется под действием фермента диметиларгинин диметиламиногидролазы (DDAH). Различные типы клеток, включая эндотелиальные и тубулярные клетки, способны синтезировать и метаболизировать ADMA. Повышенные концентрации ADMA в крови выявляют при многих заболеваниях, ассоциированных с дисфункций эндотелия. Например, повышенный уровень ADMA в крови у пациентов, проходящих диализ, достоверно коррелирует с тяжестью атеросклероза, с заболеваемостью и смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, повышение уровня ADMA выявлено у пациентов с гиперхолистеринемией, гипертензией, атеросклерозом, хронической почечной недостаточностью и сердечной недостаточностью, и ассоциированы с недостаточным расширением сосудов.
В последние годы было показано клиническое значение регуляции сосудистого тонуса и структуры окисью азота (NO). Кроме того, в некоторых исследованиях показано, что эндотелиальные клетки продуцируют и ADMA, и окись азота, что указывает на эндогенную эндотелиальную NO-регуляцию с участием ADMA. Был сделан вывод о том, что гипертензия, атеросклероз и иммунологическая дисфункция у пациентов с хронической почечной недостаточностью связаны с нарушением L-аргинин/NO-метаболизма и накоплением ADMA. Причины дисрегуляции L-аргинин/NO-метаболизма выяснены толко частично. Действительно, существует множество факторов, участвующих в регуляции L-аргинин/NO-метаболизма, как например повышение концентрации свободных супероксидных радикалов (OB2PB-P), накопление ADMA и снижение активности NO-синтазы.
Проведенные в последние годы проспективные клинические исследования показали повышающуюся важность использования измерения ADMA в качестве нового фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Показания

- атеросклероз
- гипертензия
- хроническая сердечная недостаточность
- болезнь коронарных артерий
- гиперхолистеринемия
- хроническая почечная недостаточность
- сахарный диабет
- окклюзионное поражение артерий

3. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Кат. №	обозначение	компонент набора	количество
K 7860MTP	PLATE	Стрипы с покрытыми лунками и рамкой-держателем	12 x 8 лунок
K 7860ST	STD	Стандарты, готовые к использованию (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 2.0 мкМ).	6 x 200 мкл
K 7860KO1 K 7860KO2	CTRL 1 CTRL2	Контроли, готовые к использованию (диапазоны указаны в спецификации).	2 x 200 мкл
K 7860WP	WASHBUF	Концентрат промывающего буфера, 10X	2x100 мл
K7860K	CONJ	POD конъюгат (концентрат, 200x)	65 мкл

© Перевод на русский язык
ЗАО «БиоХимМак», Москва
E-mail: elisa@biochemmack.ru
тел./ факс: 647-27-40
www.biochemmack.ru

K7860KV	CONJBUF	Буфер, стабилизирующий конъюгат, готовый к использованию	13 мл
K7860RP	REABUF	Реакционный буфер, готовый к использованию	12 мл
K7860DR	DER	Реагент для дериватизации, лиофидизированный	2 флакона
K7860LM	DMSO	Диметилсульфоксид (DMSO)	3 мл
K7860SL	CODIL	Буфер для разведения после дериватизации	18 мл
K7860TMB	SUB	Субстратный раствор (ТМБ).	15 мл
K7860AC	STOP	Стоп-раствор, готовый к использованию	15 мл

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Вода высокой степени очистки.*
- Калиброванные пипетки переменного объема на 10-1000 мкл и одноразовые сменные наконечники к ним.
- Пленки для заклеивания лунок микропланшета.
- Многоканальная пипетка или автоматический диспенсер.
- Центрифуга для центрифугирования при 3000 g
- Вортекс
- Лабораторные стеклянные или пластиковые цилиндры, стаканы и т.д.
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм (референсный фильтр 620 или 690 нм)

*Immundiagnostik AG рекомендует использовать воду высокой степени очистки (Тип воды 1; ISO 3696), которая свободна от нерастворимых и коллоидных ионов и органических молекул (свободна от частиц > 0.2 мкм), электропроводность 0.055 мкS/см при 25°C (≤18.2 MΩ см).

5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Если набор используется для нескольких постановок, убедитесь, что реагенты хранятся именно так, как это указано в данной инструкции. Приготовьте только то количество реагентов, которое необходимо для текущей постановки. Компоненты набора могут быть использованы только 2 раза в течение всего срока хранения.
- Реагенты, поставляемые в количестве менее 100 мкл, перед открытием необходимо центрифугировать, чтобы избежать потерь.
- Перед использованием концентрат буфера для промывок должен быть разведен в 10 раз дистиллированной водой (например, 900 мл воды и 100 мл концентрата). В концентрате из-за высокой концентрации солей могут образовываться кристаллы. Их необходимо растворить до разведения концентрата буфера. Для растворения кристаллов можно использовать водяную баню (37^0C). Концентрат буфера стабилен при 2-8^0C до истечения срока годности, указанного на этикетке. Готовый буфер может храниться в закрытых флаконах при 2-8^0C в течение 1 месяца.
- Храните стандарты и контроли замороженными при –20°C, размораживайте перед использованием и замораживайте сразу после использования. Стандарты и контроли могут быть заморожены/разморожены до трех раз.
- Храните реакционный буфер (REABUF) при 4°C. Перед использованием дайте нагреться до комнатной температуры и растворите имеющиеся кристаллы.
- В DMSO при 4°C могут образовываться кристаллы. Растворите кристаллы при комнатной температуре или на водяной бане.
- Храните реагент для дериватизации (DER) при -20°C. Перед открытием дайте нагреться до комнатной температуры. Растворите содержимое флакона в DMSO, как указано на этикетке флакона. Дайте содержимому флакона раствориться в течение 10 минут и тщательно перемешайте на вортексе. DER должен быть подготовлен непосредственно перед использованием. Если необходимо использовать более одного флакона, объедините содержимое флаконов и смешайте перед использованием. После использования удалите оставшийся реагент. ИФА тест-набор может быть использован в две постановки, поэтому в состав тест-набора входят два флакона DER. Обратите внимание: DMSO разъедает пластик, но не изделия из полипропилена и лабораторного стекла.
- Концентрат конъюгата необходимо развести 1:200 буфером, стабилизирующим конъюгат (60 мкл CONJ + 12 мл CONJBUF). Концентрат стабилен при 2–8°C до истечения срока годности, указанного на этикетке. Разведенный POD конъюгат стабилен в течение 1 недели при 2-8^0C.
- Все остальные реагенты готовы к использованию, стабильны при 2-8^0C до истечения срока годности, указанного на этикетке.

6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

ЭДТА плазма и сыворотка

• Для тестирования данным методом может быть использована кровь, взятая из вены натощак. Образцы стабильны в течение одной недели при температуре 2-8°C. Для длительного хранения образцы должны быть заморожены и храниться при -20°C до тестирования.

• Липемичные, или гемолизированные образцы могут давать неправильные результаты и не должны быть использованы для анализа.

• Образцы с видимым преципитатом должны быть центрифугированы.

• Образцы ЭДТА плазмы или сыворотки тестируются данным методом без дополнительного разведения. При необходимости разведения образцов используйте в качестве дилюента нулевой стандарт (STD1).

© Перевод на русский язык
ЗАО «БиоХимМак», Москва
E-mail: elisa@biochemmack.ru
тел./ факс: 647-27-40
www.biochemmack.ru

• При подготовке образцов для дериватизации в образцы вносится ADMA, реагент DER (подробно указано в разделе подготовка образцов).

7. ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный набор основан на конкурентном иммуноферментном анализе. Подготовка образцов включает внесение дериватизирующего реагента для дериватизации ADMA, добавляется реакционный буфер, содержащий дериватив-ADMA (трейсер). Затем обработанные образцы и поликлональную анти-ADMA-антисыворотку инкубируют в лунках микропланшета, покрытых производным ADMA (трейсер). Во время инкубации ADMA, присутствующий в образцах, конкурирует с трейсером, иммобилизованным в лунках, за связывание с поликлональными антителами. ADMA, присутствующий в образцах, не позволяет антителам связываться с трейсером. Таким образом, концентрация антител, связанных с трейсером, обратно пропорциональна концентрации ADMA в образце. Во время второй инкубации, в лунки вносят антитела, конъюгированные с пероксидазой, для выявления анти-ADMA антител. При промывке удаляется несвязавшийся конъюгат, а затем добавляется субстрат тетраметилбензидин (TMB). Затем энзиматическая реакция останавливается добавлением кислого стоп-раствора. Окрашивание изменяется с голубого на желтое, и оптическая плотность в лунках считывается при длине волны 450 нм. Интенсивность желтого окрашивания обратно пропорциональна концентрации ADMAв образце; это означает, что высокая концентрация ADMA в образце снижает количество антител, связавщихся с трейсером и, соответственно, ОП. Калибровочную кривую строят, используя полученные значения оптической плотности (ОП, при 450 нм) стандартов и соответствующие значения их концентраций. Концентрация ADMA, присутствующего в образцах, определяется непосредственно их калибровочной кривой.

Процедура подготовки образцов

Дериватизация стандартов (STD), контролей (CTRL) и образцов (SAMPLE) проводится при однократном анализе в пробирках (например, в пробирках 1.5 мл) следующим образом:

1. Перед тестированием все реагенты и образцы должны достичь комнатной температуры (15-30°C). Хорошо перемешайте.
2. Внесите в соответствующие пробирки по 25 мкл стандартов (STD), 25 мкл контролей (CTRL) и 25 мкл образцов (SAMPLE).
3. Внесите 200 мкл реакционного буфера (REABUF) в каждую пробирку (STD, CTRL, SAMPLE).
4. Внесите 25 мкл свежеприготовленного реагента для дериватизации (DER) в каждую пробирку (STD, CTRL, образец) и тщательно перемешайте при повторном переворачивании или на вортексе в течение нескольких секунд. Инкубируйте на горизонтальном шейкере (180-240 rpm) в течение 30 мин при комнатной температуре (15-30°C).

2 x 50 мкл каждого обработанного образца (STD, CTRL, образец) используются в ИФА анализа в дублях.

Процедура анализа

1. Отметьте расположение стандартов, образцов и контролей (STD/SAMPLE/CTRL) на схеме проведения анализа в дублях.
2. Отберите из набора необходимое для проведения анализа количество стрипов. Храните неиспользованные стрипы закрытыми при 2-8°C. Стрипы стабильны в течение всего срока годности, указанного на этикетке набора.
3. Промойте используемые для постановки стрипы, 5 раз внося по 250 мкл буфера для промывок на каждую лунку на один цикл промывки. После последней промывки переверните микропланшет и постучите им по фильтровальной бумаге, для полного удаления буфера.
4. Внесите в каждую лунку микропланшета 150 мкл буфера для разведения (CODIL).
5. При анализе в дублях внесите по 2x50 мкл дериватизированных стандартов (STD) /контролей (CTRL)/образцов (SAMPLE) в соответствующие лунки микропланшета.
6. Плотно закройте микропланшет и инкубируйте в течение **2 часов** на горизонтальном шейкере (180-240 rpm), при комнатной температуре (15-30^{0}C).
7. Промойте используемые для постановки стрипы, 5 раз внося по 250 мкл буфера для промывок на каждую лунку на один цикл промывки. После последней промывки переверните микропланшет и постучите им по фильтровальной бумаге, для полного удаления буфера.
8. Внесите во все лунки микропланшета по 100 мкл разведенного конъюгата пероксидазы (CONJ). Аккуратно перемешайте.
9. Плотно закройте микропланшет и инкубируйте в течение **30 минут** на горизонтальном шейкере (180-240 rpm), при комнатной температуре (15-30^{0}C).
10. Промойте используемые для постановки стрипы, 5 раз внося по 250 мкл буфера для промывок на каждую лунку на один цикл промывки. После последней промывки переверните микропланшет и постучите им по фильтровальной бумаге, для полного удаления буфера.
11. Внесите во все лунки по **100 мкл** раствора субстрата TMB (SUB).
12. Инкубируйте в течение **8-12 минут**, при комнатной температуре (15-30^{0}C) в темноте.
13. Внесите во все лунки по **100 мкл** стоп-раствора (STOP) и аккуратно перемешайте.
14. Немедленно считайте ОП с помощью микропланшетного спектрофотометра (ридера) при длине волны 450 нм, используя длину волны сравнения 620 нм. Если ОП самого высокого стандарта превышает предел измерений ридера, необходимо

© Перевод на русский язык
ЗАО «БиоХимМак», Москва
E-mail: elisa@biochemmack.ru
тел./ факс: 647-27-40
www.biochemmack.ru

немедленно считать ОП при длине волны 405 нм, используя длину волны сравнения 620 нм (возможно использование длины сравнения 595 нм, 630 нм, 650 нм и 690).

Интенсивность окрашивания зависит от температурных условий. Рекомендовано наблюдать за развитием окрашивания и остановить реакцию при хорошо видимой разнице.

8. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если анализ выполняется в строгом соответствии с инструкцией изготовителя (т.е. с внесением точных объемов стандартов, контролей и образцов, правильной обработкой проб), стандарты, контроли и образцы требуют одинакового разведения. Таким образом, пересчета результатов с учетом коэффициента разведения не требуется.

Для расчетов результатов можно использовать один из следующих методов. Рекомендовано использовать четырех параметрический алгоритм.

1. Четырех параметрический алгоритм

Рекомендовано использовать линейную ось ординат для значений ОП и логарифмическую ось абсцисс для концентраций. При использовании логарифмической оси абсцисс, нулевой калибратор должен соответствовать уровню меньше 1 (например, 0.001).

2. Калибровка от точки к точке

Рекомендовано использовать линейную ось ординат для значений ОП и линейную ось абсцисс для концентраций.

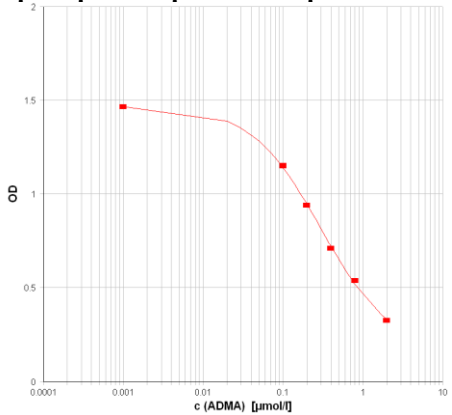
3. Сплайн алгоритм

Рекомендовано использовать логарифмическую ось ординат для значений ОП и логарифмическую ось абсцисс для концентраций.

Достоверности измеренных пар значений должна проверяться до автоматической оценки результатов. Если эта опция в используемой программе не доступна, контроль парных значений должен быть осуществлен вручную.

Концентрация в контролях и образцах может быть определена непосредственно по калибровочной кривой в мкмоль/л. Ниже представлен пример калибровочной кривой; не используйте его для расчета результатов.

Пример калибровочной кривой



9. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

При тестировании гемолизированные и липемичных образцов могут быть получены неточные результаты. Не используйте для анализа гемолизированные и липемичные образцы. Образцы, в которых концентрация выше измеряемого диапазона, необходимо развести в Стандарте 1 (нулевой стандарт) и повторно протестировать.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендовано, по возможности, использовать внешние контроли для проведения внутреннего контроля качества. Контрольные образцы должны анализироваться при каждой постановке. Достоверность результатов, полученных при анализе контрольных образцов, необходимо оценивать соответствующими статистическими методами. Если в ходе анализа для одного или нескольких контрольных образцов были получены значения, не попадающие в установленный диапазон допустимых значений, то результаты, полученные для тестируемых образцов, могут быть недостоверными.

Референсные значения

На основании результатов внутренних исследований образцов плазмы крови практически здоровых лиц (n = 70) было вычислено среднее значение 0,45 мкмоль/л. Стандартное отклонение составило 0,095 мкмоль / л.

Среднее значение в плазме крови ± 2 x стандартных отклонения: ± 0,45 0,19 мкмоль / л

Диапазон нормальных значений: 0,26 - 0,64 мкмоль/л

Рекомендовано в каждой лаборатории устанавливать свои собственные диапазоны нормальных значений.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Точность и воспроизводимость:

Внутри серии (n=12)		
образец	ADMA [мкмоль/л]	Стандартное отклонение (SD)
1	0,12	7,9
2	0,48	5,8
Между сериями (n=6)		
образец	ADMA [мкмоль/л]	Стандартное отклонение (SD)
1	0,19	10,8
2	0,47	7,6

Извлечение при обогащении

Один образец был обогащен различными концентрациями ADMA и проанализирован данным методом. В среднем извлечение для всех концентраций составило 103,8 % (n=10).

Обогащенная[мкмоль/л]	Ожидаемая концентрация ADMA [мкмоль/л]	Измеренная концентрация ADMA [мкмоль/л]	Извлечение [%]
0		0.365	
0.32	0.685	0.732	106.9
0.55	0.915	0.921	100.7

Извлечение при разведении

Один обогащенный образец плазмы был разведен стандартом 1 (нулевой стандарт) и проанализирован данным методом. В среднем извлечение составило 96,7 % (n=10).

Обогащенная [мкмоль/л]	Ожидаемая концентрация ADMA [мкмоль/л]	Измеренная концентрация ADMA [мкмоль/л]	Извлечение [%]
неразведенный		1.275	
1:2	0.638	0.567	88.9
1:3	0.425	0.456	107.2
1:4	0.319	0.300	94.0

Аналитическая чувствительность

Нулевой стандарт был измерен 46 раз. Лимит детекции определялся как B0 - 2 SD, его значение составило 0.04 мкмоль/л.

Образец	Среднее значение [ОП] ADMA	Стандартное отклонение [SD]	Лимит детекции [мкмоль/л]
Нулевой стандарт	2.2	0.14	0.04

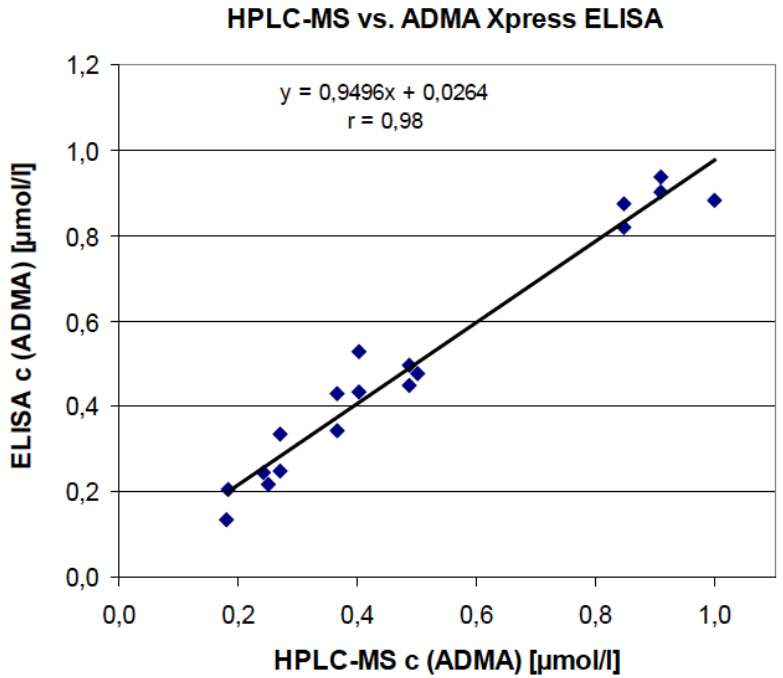
Специфичность

Специфичность была оценена при измерении перекрестной реактивности с соединениями, структурно схожими с ADMA. Специфичность вычислена в процентах по отношению к активности связывания ADMA.

L-Arginine < 0.02 %
SDMA < 0.6 %

Корреляция с результатами HPLC-MS

13 образцов были измерены с помощью данного ИФА тест-набора и HPLC-MS. Коэффициент корреляции составил r = 0.98.



12. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- Все реагенты, входящие в состав тест-набора, предназначены только для диагностики in vitro.
- При каждом проведении серии анализов необходимо тестировать контрольные материалы.
- Материалы человеческого происхождения, входящие в состав набора, были протестированы на наличие ВИЧ и вируса гепатита В, был получен отрицательный результат. Тем не менее, из соображений безопасности, все компоненты набора должны рассматриваться как потенциально инфекционно опасные.
- Реагенты в качестве бактерицидных добавок содержат азид натрия или тимеросал. Азид натрия и тимеросал являются токсичными соединениями. Субстрат для ферментной цветной реакций является токсичным и канцерогенным. Избегайте попадания на кожу или слизистые оболочки.
- Стоп раствор содержит серную кислоту, которая является сильной кислотой. Даже в разбавленном виде, с ней по-прежнему необходимо обращаться с большой осторожностью. Реагент может вызвать химические ожоги, с ним необходимо работать в защитных перчатках, с использованием защитных очков для глаз и соответствующей защитной одежды. При разливе реагента его необходимо немедленно удалить большим количеством воды.

13. ТЕХНИЧЕСКИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- Не заменяйте или не смешивайте отдельные компоненты из разных лотов. Не рекомендуется использовать для серии анализов стрипы из разных микропланшетов, даже если они одного лота так как открытые и запечатанные стрипы хранились в разных условиях.
- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности, указанном на этикетке набора.
- Раствор субстрата перед использованием должен быть бесцветным.
- Для получения точных результатов, во время инкубации используйте пленку для заклеивания микропланшета.
- При пипетировании реагентов избегайте образования пены.
- Выполняйте анализ согласно актуальной версии инструкции, поставляемой с набором.

14. ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ И НАБОРУ

- Данный набор произведен и поставляется в соответствии с рекомендациями для IVD 98/79/EC.
- Необходимо соблюдать рекомендации по проведению контроля качества.
- Время инкубаций, температура инкубаций и пипетируемые объемы различных компонентов установлены производителем. Любые отклонения от процедуры анализа, описанной в данной инструкции, не согласованные с производителем, могут повлиять на результаты тестирования. Производитель не несет ответственности за какой-либо ущерб, причиненный в случае неправильного использования набора.

15. ЛИТЕРАТУРА

Смотрите английскую версию инструкции.

Информация для заказа

Набор можно заказать в
ЗАО «БиоХимМак»:
***119192,* г. Москва, Ломоносовский пр., д.29, стр.1**
Тел. (495) 6472740,
E-mail: elisa@biochemmack.ru