

НАБОР ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ NT-proBNP В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ МЕТОДОМ ИФА

SK-1204, NT-proBNP

Каталог. № : SK-1204
Количество : 96
Производитель: **Biomedica** (
Австрия)

Методика от 18-03-2015



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

Зрелая форма мозгового натрийуретического пептида (BNP) преимущественно секретируется желудочком сердца. Он образуется из предшественника с большей молекулярной массой, proBNP (1-108). BNP оказывает диуретическое, натрийуретическое и гипотензивное воздействия, аналогичные действиям ANP. Натрийуретические пептиды являются важными факторами защиты от переизбытка жидкости и высокого давления. Контроль баланса жидкости и электролитов, а также циркуляторного гомеостаза осуществляется с помощью и других регуляторных механизмов, включая системы ренин-ангиотензин, вазопрессина и симпатическую нервную систему. Открытие натрийуретических пептидов сосредоточило внимание на дополнительном вкладе эндокринной системы в диурез и сосудистый тонус. Биология, биохимия и патофизиологическая роль натрийуретических пептидов описана во многих научных обзорах.

Возможные области применения

- Сердечная недостаточность, острый инфаркт миокарда, дисфункция левого желудочка
- Почечная недостаточность
- Заболевания печени
- Различные формы вторичных гипертензий

2) РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Обозначение	Компонент набора	Количество
PLATE	Стрипованный микропланшет с лунками, покрытыми поликлональными овечьими антителами к NT-proBNP в запечатанном пакете с осушителем	12x8 тестов
WASHBUF	Концентрат промывающего буфера (20-кратный)	1x50 мл
STD	Стандарты, содержат синтетический человеческий NT-proBNP (0/10/40/160/640 фмоль/мл), готовы к использованию, содержат зеленый краситель с разной интенсивностью, в зависимости от количества содержащегося в стандарте NT-proBNP	5 флаконов, лиофилизированный
CTRL	Контроль, содержит синтетический человеческий NT-proBNP (желтый краситель). Точная концентрация указана на флаконе	1 флакон, лиофилизированный
CONJ	Конъюгат (овечьи анти-NT-proBNP-HRPO), содержит красный краситель, готов к использованию	1x22 мл
SUB	Субстратный раствор (ТМБ-раствор), готов к использованию	1x22 мл
STOP	Стоп-раствор, серная кислота, готов к использованию	1x7 мл

3) ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ

- Пленка для накрывания микропланшета
- Паспорт контроля качества
- Схема планшета
- Инструкция

4) НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Калиброванные пипетки переменного объема на 50-500 мкл и одноразовые сменные наконечники к ним.
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм (или от 450 нм до 620 нм), графическая бумага или программное обеспечение для расчета результатов
- Графическая бумага или программное обеспечение для расчета результатов
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Ручное или автоматическое промывающее устройство

5) ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ

Все реагенты, поставляемые в наборе, стабильны при 4 °C (2-8 °C) до истечения срока годности, указанного на этикетке каждого реагента.

Подготовка реагентов:

NT-proBNP стабилен в цельной крови в течение нескольких часов при комнатной температуре (18-26 °C). Тем не менее, мы рекомендуем отделить сыворотку центрифугированием как можно скорее, например, 20 минут при 2000 x g, предпочтительно при температуре 4 °C (2-8 °C). Сыворотка может храниться при температуре 4 °C (2-8 °C) до двух дней. Для длительного хранения, алиquotировать полученные образцы сыворотки и хранить их при температуре -25 °C или ниже. Образцы могут быть подвергнуты 5 циклам замораживания-оттаивания без потери иммунологической реактивности. Липемичные или гемолизные образцы могут давать ошибочные результаты. Образцы должны быть хорошо перемешаны перед анализом. Мы рекомендуем проводить анализ в дублях для всех значений. Образцы со значениями выше STD 5 (640 пмоль/л) могут быть разбавлены STD 1 или отрицательной сывороткой NT-proBNP человека.

Разведение:

STD (Стандарт): Пипетировать 500 мкл дистиллированной или деионизированной воды в каждую пробирку. оставить при комнатной температуре (18-26 °C) на 10 минут. Аккуратно перемешать. Концентрация стандарта указана на этикетке. Восстановленный стандарт стабилен при -25 °C до окончания срока годности. Избегать циклов заморозки-оттаивания.

CTRL (Контроль): Пипетировать 500 мкл дистиллированной или деионизированной воды в каждую пробирку. оставить при комнатной температуре (18-26 °C) на 10 минут. Аккуратно перемешать. Концентрация указана на этикетке. Восстановленный Контроль стабилен при -25 °C до окончания срока годности. Избегать циклов заморозки-оттаивания.

WASHBUF (Буфер для промывок): Разбавьте концентрат буфера для промывок в 20 раз (например, 50 мл концентрата и 950 мл дистиллированной воды) и тщательно перемешайте. Кристаллы, образовавшиеся в концентрате, должны раствориться при комнатной температуре. Разведенный буфер для промывок стабилен при 4 °C (2-8 °C) до одного месяца. Используйте только разведенный буфер для промывок

6) ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный тест основан на «сэндвич»-методе иммуноферментного анализа и предназначен для количественного определения NT-proBNP в образцах человеческой сыворотки.

На первом этапе образец и конъюгат (овечьи антитела к человеческому NT-proBNP-HRPO) вносят в лунки микропланшета, покрытые поликлональными овечьими анти-NT-proBNP антителами. NT-proBNP, присутствующие в образцах, связывается с антителами и сорбирующимися в лунках и образуют «сэндвич» комплекс с выявляющими антителами (конъюгатом). При последующей промывке из лунок удаляются все не связавшиеся компоненты.

На втором этапе в ячейки вносится субстрат ТМБ. Интенсивность развившейся окраски пропорциональна количеству NT-proBNP в стандарте или образце. Интенсивность развившейся цветной реакции измеряют с помощью стандартного ИФА-ридера.

7) ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты должны достичь комнатной температуры (18-26 °C).

Пометьте на схеме планшета ячейки стандарта, контроля и образца.

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.

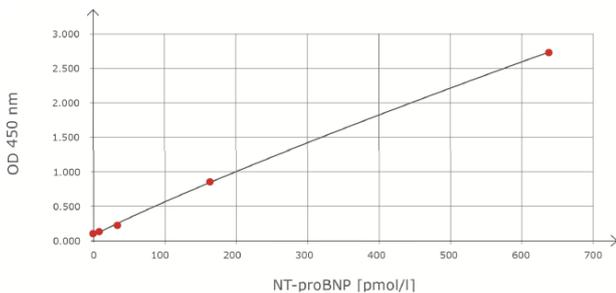
Внесите по 50 мкл образцов, стандартов и контролей в

соответствующие ячейки.
Добавьте по 200 мкл Конъюгата в каждую ячейку, осторожно перемешайте.
Накройте стрипы пленкой и инкубируйте в течение 3 часов при комнатной температуре (18-26°C)
Удалите пленку с стрипов. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте их 5 раз, используя по 300 мкл разведенного WASHBUF (буфера для промывок) на лунку для одного цикла промывок. Удалите остатки буфера для промывок, постучав перевернутым микропланшетом по чистой фильтровальной бумаге
Внесите по 200 мкл ферментного субстрата (ТМБ) во все ячейки.
Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (18-26 °C) в темноте
Добавьте по 50 мкл стоп-раствора во все ячейки
Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм с фильтром сравнения 630 нм, если возможно

8) РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Вычитите оптическую плотность (ОП) Бланка из значений ОП остальных ячеек.
- Постройте калибровочную кривую на основе результатов измерения стандартов, используя полулогарифмическую графическую бумагу или программное обеспечение для расчета результатов анализа.
- Определите результаты измерения образцов по построенной калибровочной кривой.
- Для построения калибровочной кривой рекомендуется использование 4-параметрической аппроксимации. Другие методы аппроксимации должны оцениваться пользователем. Образцы с концентрацией NT-proBNP выше 640 пмоль/л разводить и тестировать еще раз. При расчете результатов необходимо учитывать коэффициент разведения.

Пример типичной кривой:



Протокол Контроля качества (QC) поставляется с набором и показывает результаты финального релиза QC для каждого набора на дату производства. Данные для OD, полученные от клиентов, могут отличаться из-за различного рода воздействий и/или из-за нормального снижения интенсивности сигнала в течение всего срока годности. Тем не менее, это не влияет на достоверность результатов до тех пор, пока OD 1,50 или больше получено для STD 5 и значение CTRL находится в диапазоне (целевой диапазон см. на этикетке).

9) ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Референсные значения	Медиана: 3.0 пмоль/л (n = 93) Каждая лаборатория должна установить свои собственные значения нормы.
Коэффициент преобразования пмоль/л в пг/мл	1 пмоль/л = 8.475 пг/мл
Диапазон стандартов	0 - 640 пмоль/л
Объем образца	50 мкл человеческой сыворотки
Предел определения	(0 пмоль/л + 3 SD) 3 пмоль/л
Время инкубации	3 часа/30 минут

10) ТОЧНОСТЬ

Intra-assay (n=3)	Sample 1	Sample 2	Inter-assay (n=8)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	60.2	35.2	Mean (pmol/l)	52.1	108.1
SD (pmol/l)	2.0	0.9	SD (pmol/l)	1.7	7.9
CV (%)	4	3	CV (%)	3	7

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