



Набор ИФА для определения в цельной крови динамики общей иммунореактивности трипсина (ИРТ)

Каталог. № : EIA-1278
Количество : 96
Производитель: DRG (США)

Методика от 21-10-2008

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

**ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ.
РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭТОГО ИЗДЕЛИЯ НЕ БЫЛИ УСТАНОВЛЕНЫ.**

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА DRG[®] blood spot Trypsin-MW специально разработан для измерения человеческого иммунореактивного трипсина (ТРТ) в образцах пятен крови, собранных на фильтровальную бумагу #903 Шляйхера и Шюэля.

ВВЕДЕНИЕ И ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Трипсин первоначально синтезируется и секретируется ацинарной клеткой экзокринной поджелудочной железы как предшественник или профермент, трипсиноген (MW - 24 000). Были утверждены два различных изофермента трипсиногена. Обе формы преобразовываются в ферментоактивный трипсин действием дуоденальной энтерокиназы. В присутствии ионов Ca^{++} энтерокиназа устраняет из трипсиногена гексапептид Val-(Asp)4-Lys, освобождая активную форму(ы) трипсина.

В крови встречаются три определенных ингибитора "ферментной активности" трипсина: $\alpha 1$ -анти-трипсин, $\alpha 2$ -макроглобулин и промежуточный- α -ингибитор трипсина. Поскольку конкуренция и переменное поглощение серологического трипсина встречается между эндогенными факторами и в определенном используемым антителом трипсина, и поскольку некоторая часть трипсиногена поступает в кровообращение неизменной, настоящий набор ИФА совместим с ранее проведенным анализом, в котором описывались измеренные компоненты как "полная иммунореактивная, подобная трипсину активность" или ИРТ.

В качестве образца анализом используется один 3 мм диск прессованной фильтровальной бумаги. Анализ состоит из ночной и 11/4 часовой инкубации. Анализ может быть значительно автоматизирован, используя оборудование для компрессии диска, раскапывания и промывки планшета. Нормальный диапазон должен быть определен каждой лабораторией, которая оборудована для использования имеющихся в наличии реагентов. Из-за расхождений значений калибровки между различными системами анализа, трудно сейчас утверждать об универсальном диапазоне нормы.

ПРИНЦИП ИФА ТРИПСИНА-MW

Набор ИФА DRG[®] blood spot Trypsin-MW использует методику ферменто-связанного иммуносорбентного анализа (ИФА), чтобы количественно определить человеческий трипсин в образце пятна крови. В анализах типа ИФА производятся две дополнительные конфигурации антител относительно различных частей того же самого антигена. В ИФА компании DRG одна система антител связана с лункой микропланшета, а другое антитело маркировано ферментом. Когда антиген присутствует, он одновременно связывает оба антитела способом "моста" или "сэндвича". Этот весь комплекс остается связанным с лункой. После смывания "несвязанного" фермента добавляется определенный субстрат и преобразовывается в конечный продукт определенного цвета, а реакция быстро останавливается стоп-раствором. Спектральная поглощательная способность (абсорбция) каждой лунки считывается при 450 нм и результаты выводятся на миллиметровке против спектральной поглощательной способности как концентрация ИРТ в нг/мл.

В процедуре DRG[®] диск надавливается на пятно крови, собранное на фильтровальную бумагу #903 Шляйхера и Шюэля. Этот диск помещается в лунку с антителами вместе с элюирующим буфером. После ночной инкубации элюирующий буфер и пятно крови аспирируются, лунка промывается и добавляется маркированное ферментом антитело. После второй инкубации лунка промывается и в нее добавляется субстрат. Ферментная реакция быстро останавливается останавливающим раствором и считывается абсорбция. Затем строится стандартная кривая, из которой могут быть вычислены неизвестные концентрации трипсина.

Антитело кролика анти-ИРТ

Наиболее примечательно, что набором ИФА DRG[®] blood spot Trypsin-MW используется ICN-антитело ИРТ с уникальными особенностями специфичности "молекулярных структур" ИРТ. Начиная с первоначальной разработки поликлонального антитела DRG[®] к ИРТ в пределах гранта Национального Института Здравоохранения (NIH), мы зафиксировали разнообразные уникальные аспекты нашего антитела с его усиленной реактивностью с "патологической" формой ИРТ по отношению к нормальной циркулирующей форме. Эта "патологическая специфичность" независима от количественных различий в абсолютном показателе используемых стандартов и является функцией антитела. Результаты обширного анализа ICN-антитела доводят, что "патологическая ИРТ" - относительно его молекулярных разновидностей или взаимодействий - демонстрирует больший "потенциал" нашего антитела, чем очищенный интактный трипсин.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

Примечание: следующие реагенты включены и в единичный набора ИФА трипсина в пятне крови, и в оптовый набор анализа. Количество реагентов для оптового набора указаны курсивом.

А. Концентрат ферментного конъюгата ИФА трипсина - 0.5 мл (5.0 мл): пероксидаза хрена, конъюгированная моноклональным антителом к трипсину в фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7.4. При использовании влить все содержимое флакона ферментного разбавителя (реагент В) во флакон ферментного концентрата, накрыть флакон, и перевернуть осторожно несколько раз, чтобы перемешать. Стабильность разбавленного ферментного реагента - 1 неделя (7 дней) в 2-8°C. Стабильность герметично закрытого ферментного конъюгата указана на этикетке.

1. Единичный набор анализа:

При использовании влить все содержимое флакона ферментного разбавителя (реагент В) во флакон ферментного концентрата, накрыть флакон, и перевернуть осторожно несколько раз, чтобы перемешать. Стабильность разбавленного ферментного реагента - 1 неделя (7 дней) в 2-8°C. Стабильность герметично закрытого ферментного конъюгата указана на этикетке.

2. Оптовый набор анализа:

При использовании разбавить ферментный концентрат (x 50) разбавителем фермента.

Например: 4 планшета=45 мл разбавленного фермента. Разбавить 0.9 мл ферментного концентрата до полного объема ферментного разбавителя 45.0 мл. При использовании хорошо перемешать. Стабильность разбавленного ферментного реагента - 1 неделя (7 дней) в 2-8°C.

Примечание: при снятии колпачка с флакона необходимо соблюдать осторожность, чтобы ни капли ферментного концентрата, держащегося на нем, не было утеряно. Если требуется более чем один флакон ферментного реагента, объединить и смешать весь разбавленный фермент до использования.

В. Ферментный разбавитель 22.0 мл (220.0 мл):

Стабильность при использовании с ферментным концентратом - 1 неделя при 2-8°C.

С. Элюирующий буфер 40.0 мл (400.0 мл):

Стабильность буфера при 2-8°C указана на этикетке.

Д. Концентрат промывочного буфера 50.0 мл (500.0 мл):

Фосфатный буфер, содержащий 0.5% твин 20. Разбавить 10-кратно (к 500 мл) дистиллированной водой перед использованием. Стабильность разбавленного промывочного буфера при 2-8°C как и срок годности набора.

Примечание: При постоянных заказах оптовый концентрат промывочного буфера доступен для использования в автоматизированных промывочных машинах, таких как промывочная машина M96V от ICN.

Е. Цветной субстрат 22.0 мл (220.0 мл):

Готовый 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ). Стабильность ТМБ после вскрытия - 1 неделя при 2-8°C.

Ф. Останавливающий раствор 22.0 мл (220.0 мл):

H₂SO₄ в деионизированной воде. Стабильность при 2-8°C как указано на этикетке.

Г. Микролуночные планшеты, покрытые поликлональным античеловеческим (96 лунок) 2 в каждом наборе (20 в каждом наборе):

Стабильность невскрытых стрипов при 2-8°C соответствует сроку годности набора после открытия изолированного мешочка из фольги.

Н. Стандарты [7 уровней], контроли [3 уровня], по 1 карточке (по 5 карточек):

Цельная кровь, насыщенная человеческим трипсином, нанесена на фильтровальную бумагу. Концентрации указаны на этикетке. Стабильность невскрытой карточке указана на этикетке. Стабильность карточки после вскрытия мешочка меньше чем -15°C согласно срока годности набора.

Примечание: Фактические уровни калибровки могут изменяться между сериями, этикетка текущей партии стандартов должна ссылаться на значения калибровки, используемые в вычислениях.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: МАТЕРИАЛЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Обращаться как со способными передавать инфекции. Исходный материал, из которого был получен этот продукт, не- реактивный к антителам ВИЧ1, ВИЧ2 и не реактивны к HBsAg и гепатиту С когда исследовались лицензированными донорскими реагентами. Ни один из известных методов исследования не может предоставить гарантии, что продукты, полученные из человеческой крови, не будут инфекционными. См. публикацию CPC/NIH Bio-Safety in Microbiological and Biochemical Laboratories (HHS издание №. CPC 84-8395).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: АЗИД НАТРИЯ

Эти реагенты содержат азид натрия, у которого наблюдается способность к нагромождению в свинцовой или медной водосточной системе, образуя потенциально взрывчатые металлические азиды. После утилизации этих реагентов всегда смывать раковину большим количеством воды.

КАЛИБРОВКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Количество ИРТ в образце (пятне крови) вычисляется из стандартной кривой, подготовленной от известного количества трипсина, калиброванного в сравнении капли крови ИРТ с нашими утвержденными наборами РИА. В настоящее время международной референтной подготовки трипсина не существует.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- А. Чтобы обеспечить точные и надежные результаты, удостоверьтесь, что все диски пятна крови находятся в растворе реакции во время инкубационного периода.
- В. Рекомендуется строго следовать процедуре анализа, чтобы получить надежные результаты. За любые перестановки или изменения в наборе или процедуре анализа ответственность несет пользователь.
- С. Этот анализ разработан для использования с образцами, которые ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО собраны на ФИЛЬТРОВАЛЬНУЮ БУМАГУ Шляхера и Шюэля #903.

НЕОБХОДИМЫЕ ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ

A. Планшет-ридер, способный считать спектральную поглощательную способность при 450 нм.

B. Многоканальные и одноканальные микропипетки, калиброванные на 100, 200, и 300 мкл.

Примечание: 200 или 300 мкл являются приемлемыми для этапа промывки.

C. Автоматизированный планшет-вошер (на выбор).

СБОР И ОБРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ КРОВИ

Перенести достаточно крови на фильтровальную бумагу, чтобы полностью заполнить по крайней мере два круга. Крайне важно, чтобы кровь проникла через фильтровальную бумагу на другую сторону. Кровь должна быть в центре круга и распространиться наружу. Избегать разрыва или разрушения поверхности фильтровальной бумаги.

Позволить препарату полностью высохнуть на воздухе (в течение ночи), и не помещать вблизи источника повышенной температуры, под прямым солнечным светом, или на гигроскопичных поверхностях. После высыхания в течение ночи, препараты должны храниться до анализа в воздухонепроницаемом пластмассовом контейнере при *менее чем -15°C*.

ЭТАПЫ АНАЛИЗА (Рекомендуется проводить анализ в дубликате)

Примечание: использовать максимумально два последовательных планшета. Для более объемных анализов выбор времени капания из пипетки должен быть выдержан, чтобы обеспечить одинаковую обработку планшета.

A. Для каждого калибратора, контроля и неизвестного значения, в двойном экземпляре:

1. Вставить один 1/8" (3 мм) пропитанный кровью диск фильтровальной бумаги в соответствующие лунки микротитрационного стрипового планшета.
2. Добавить в каждую лунку по 200 мкл элюирующего буфера.
3. Накрывать планшет, осторожно потрясти рукой в течение 30 секунд и инкубировать в течение ночи при комнатной температуре.
*Убедитесь, что все пятна крови погружены в элюирующий буфер.
4. Аспирировать содержимое всех лунок. Промыть 3 раза 300 или 200 мкл промывочного буфера и аспирировать или "трясти" планшетом до высыхания после каждой промывки.
5. Добавить в каждую лунку по 100 мкл разбавленного ферментного конъюгата.
6. Накрывать планшет, осторожно помешать вручную (30 секунд) и инкубировать 1 час при комнатной температуре.
7. Аспирировать содержимое всех лунок или "трясти" планшетом до высыхания после каждой промывки.
8. Промыть 3 раза 300 мкл промывочного буфера и аспирировать или "трясти" планшетом до высыхания после каждой промывки.
9. Добавить в каждую лунку по 100 мкл свежего субстрата.
10. Инкубировать 15 минут при комнатной температуре.
11. Добавить в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора и встряхивать горизонтально вручную в течение 10 секунд.
12. Считать спектральную поглощательную способность при 450 нм и вывести на полулогарифмической миллиметровке (абс. против дозы в нг/мл). Спектральная поглощательная способность может быть считана в любое время после добавления стоп-раствора максимум до 60 минут.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Внешние контроли пятна крови, содержащие ИРТ трех различных уровней (низкий, средний, высокий), должны обычно включаться в каждую процедуру анализа. Результаты контроля должны быть зарегистрированы и оценены в соответствии с установленными протоколами, например, Westgard, J.O. и др., *Clinical Chemistry* 27: 493-501, 1981.

Внутренние контроли:

Аналогично трехуровневые контроли, включенные в наборе, должны обычно проверяться на соответствие установленным значениям. Контроли набора предоставляют ценную информацию по соответствию работы набора спецификациям изготовителя.

ПРОТОКОЛ

Wells	Sample	Eluting Buffer	Wash Buffer	Enzyme Conjugate	Wash Buffer	Color Substrate	Stopping Solution	Read
A ₁ , B ₁	Calibrator 1	200 µL	INCUBATE OVERNIGHT AT ROOM TEMPERATURE 3 TIMES, 200 µL or 300 µL	100 µL	INCUBATE ONE HOUR AT ROOM TEMPERATURE 3 TIMES, 200 µL or 300 µL	100 µL	INCUBATE 15 MIN. AT ROOM TEMPERATURE	READ ABS. at 450 nm
C ₁ , D ₁	Calibrator 2							
E ₁ , F ₁	Calibrator 3							
G ₁ , H ₁	Calibrator 4							
A ₂ , B ₂	Calibrator 5							
C ₂ , D ₂	Calibrator 6							
E ₂ , F ₂	Calibrator 7							
G ₂ , H ₂	Level I							
A ₃ , B ₃	Level II							
C ₃ , D ₃	Level III							
E ₃ , F ₃	Unknown							

ВЫЧИСЛЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ

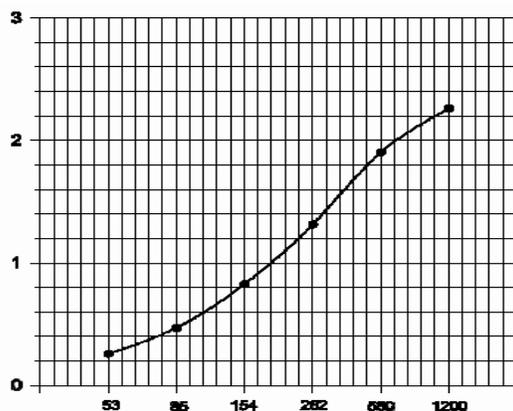
A. Считать абсорбцию образцов сыворотки непосредственно с кривой в нг/мл. Анализ образца и калибровочная кривая предоставлены в разделе ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА, ТОЧНОСТЬ И НАДЕЖНОСТЬ.

B. Образцы с уровнями трипсина вне самого высокого стандарта нужно ИНТЕРПРЕТИРОВАТЬ как "больше чем.....".

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА, ТОЧНОСТЬ И НАДЕЖНОСТЬ

А. Анализ образца

<u>Калибратор</u>	<u>Калибратор или неизвестное</u>	<u>Абс.</u>	<u>Чистая Абс.</u>	<u>Значение графика</u>
NSB	0.0 нг/мл	0.100		
1	53.0	0.361	0.261	
2	85.0	0.574	0.474	
3	154.0	0.932	0.832	
4	282.0	1.418	1.318	
5	580.0	2.007	1.907	
6	1200.0	2.368	2.268	
	Первый уровень	0.662	0.562	98
	Уровень	1.235	1.135	224
	Уровень	1.497	1.397	310



В. Точность:

Вариабельность в анализе различных образцов, содержащих очищенный трипсин, указана в В1. Вариабельность между анализами различных образцов, содержащих добавленный или эндогенный трипсин (ИРТ) указана в В2.

1. В анализе (Абс.):

Образец	N	нг/мл ИРТ	Х Абс.	С. О.	К. В. (%)
A	12	44	0,330	0,026	7,9
B	10	79	0,520	0,050	9,6
C	10	143	0,760	0,037	4,9
D	10	242	1,420	0,105	7,4

2. Между анализами (нг/мл ИРТ)

Образец	N	ИРТ нг/мл	С. О.	К. В. (%)
A	10	50,0	2,70	5,4
B	10	85,0	7,10	8,4
C	10	142,0	4,80	3,4
D	10	270,0	21,40	7,9

С. Восстановление:

Процент восстановления стабилизированных образцов, к которым было добавлено известное количество трипсина, указан в следующей таблице.

Образец	N	Ожидаемая ИРТ нг/мл	Наблюдаемая ИРТ	% восстановления
A	10	44	50	113,6
B	10	79	85	107,6
C	10	143	142	99,3
D	10	242	270	111,6

Среднее восстановление - все образцы $G \times = 108.0 \%$

D. Чувствительность - минимальная обнаруживаемая доза:

Минимальная поддающаяся обнаружению доза настоящего набора - <5 нг/мл, как определено повторным анализом нулевого калибратора.

ЭЛЕМЕНТЫ АНТИТЕЛА

Набор ИФА DRG[®] blood spot Trypsin-MW использует поликлональную конфигурацию антитела "захвата" на микролуночном планшете и комплементарное маркированное пероксидазой хрена моноклональное антитело в качестве трейсера. Моноклональное антитело произведено от мышей, иммунизированных человеческим трипсином. Поликлональное антитело было выращено в иммунизированных трипсином кроликах.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua