

НАБІР РЕАГЕНТІВ

IGF-ВРЗ (ІНСУЛІНОПОДІБНИЙ ФАКТОР РОСТУ ЗВ'ЯЗУЮЧИЙ БІЛОК-3) ELISA

IGF-ВРЗ ELISA

Кат. №: **EIA-5049**

Дата випуску інструкції: **2020-08-03**

Версія: **6.0**



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз для *in vitro* кількісного вимірювання людського білка-3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту (IGFBP-3) у сироватці.

2 КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Система інсуліноподібного фактора росту (IGF) є основним регулятором нормального росту та регенерації тіла, яка впливає на клітинну проліферацію, диференціацію та апоптоз. Крім того, система IGF, модифікує чутливість до інсуліну та тривалий метаболізм глюкози. Нарешті, численні епідеміологічні, експериментальні та клінічні дані вказують на те, що система IGF, також бере участь у розвитку ряду поширених видів раку, а також частих захворювань, таких як атеросклероз та цукровий діабет 2 типу. Система IGF складається з сімейства близькородних пептидів, що включає два первинних пептиди, що стимулюють ріст, IGF-I та IGF-II, 6 специфічних високоафінних IGF-зв'язуючих білків (IGFBP-1 до -6) та великий глікопротеїн, що не зв'язує IGF, «кислотна лабільна субодиниця» (ALS). IGFBP-3 є найпоширенішим IGF-зв'язуючим білком, на нього припадає 75% і більше циркулюючої здатності IGF-зв'язування у здорових суб'єктів. IGFBP-3 поділяє функціональні властивості з IGFBP-5 тим, що обидва пептиди здатні утворювати високомолекулярні потрійні комплекси приблизно 150 кілоДальтонів з ALS та або IGF-I, або -II. Однак, IGFBP-5 циркулює у значно менших концентраціях, ніж IGFBP-3, і у здорових суб'єктів потрійні комплекси несуть до 90% IGFBP-3 та лише близько 50% IGFBP-5. Спочатку вважалося, що IGFBP служать білками-носіями IGF, стабілізуючи рівень IGF у плазмі та контролюючи вихід IGF із циркуляції у позасудинний відділ. Крім того, припускали, що IGFBP-комплексований IGF є біологічно більш-менш неактивним, позбавлений здатності взаємодіяти з рецептором IGF-1.

Однак, незабаром стало очевидним, що в деяких експериментальних умовах IGFBP стимулюють, а не гальмують опосередковані дії IGF-I, і відповідно, IGFBP зараз часто називають модуляторами біоактивності IGF-I. Крім того, більшість IGFBP, і зокрема IGFBP-3, надає незалежні від IGF-I та IGF-II ефекти, що включають взаємодію зі специфічними рецепторами, розташованими на поверхні та всередині клітини. Наприклад, сьогодні вважається, що IGFBP-3 служить протипухлинною молекулою, мабуть, захищаючи від декількох поширених видів раку, а також вважається, що IGFBP-3 впливає на передачу сигналів інсуліну в культивованих адипоцитах.

Оборот потрійних комплексів дуже повільний, і концентрація IGFBP-3 у плазмі залишається стабільною протягом дня, не зазнаючи впливу короточасних харчових змін. Таким чином, рівень IGFBP-3 можна визначити одним виміром. GH є основним регулятором IGFBP-3, а також IGF-I та ALS, а отже, усі три пептиди збільшуються під час пубертатного росту, коли зі збільшенням віку, рівні поступово знижуються. У дітей було показано, що IGFBP-3 корелює з цілодобовою інтегрованою секрецією GH, і зокрема, у дітей IGFBP-3 може бути корисним для діагностики дефіциту GH.

3 ПРИНЦИПИ МЕТОДУ

IGFBP-3-ELISA - це твердофазний імуноферментний аналіз з підсиленою чутливістю, який проводиться на мікротитрових планшетах.

Стандарти та зразки реагують із захоплюючим моноклональним антитілом (MAb 1), яке нанесене на мікротитрову лунку, та з моноклональним антитілом (MAb 2), міченим пероксидазою хрому (HRP). Після інкубаційного періоду, утворюється «сендвіч»: покритий MAb 1 - IGFBP-3 людини - MAb 2 -

HRP. Мікротитровий планшет промивають для видалення незв'язаного міченого ферментом антитіла. Зв'язані фермент-мічені антитіла вимірюють за допомогою хромогенної реакції. Додають хромогенний розчин (ТМБ) та інкубують. Реакцію зупиняють додаванням стоп-розчину і мікропланшет зчитують на відповідній довжині хвилі. Кількість оборотів субстрату визначається колориметрично, шляхом вимірювання поглинання, яке пропорційне концентрації IGFBP-3 людини.

Будується калібрувальна крива, а концентрація IGFBP-3 в зразках визначається шляхом інтерполяції з калібрувальної кривої.

4 РЕАГЕНТИ, ЯКІ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

	Реагенти	96 тестів/набір	Розведення
PLATE	Мікротитровий планшет, із 96 покритими анти IGFBP-3 (моноклональні антитіла), відірваними лунками	96 лунок	Готовий до використання
Ab HRP CONC	Кон'югат: HRP мічений анти-IGFBP-3 (моноклональні антитіла) в цитратному буфері з бичачим сироватковим альбуміном та Прокліном	1 флакон 0,5 мл	Розвести 20 х з буфером для кон'югату
CONJ BUF	Кон'югований буфер: Трис-буфер з бичачим сироватковим альбуміном і тимолом	1 флакон 10 мл	Готовий до використання
CAL N	Калібратори - N= 1 до 5, у фосфатному буфері з бичачою сироваткою і тимолом. Точні значення див. на етикетках флаконів. Калібратори попередньо розведені. !Використовувати буфер для розведення як нульовий калібратор.	5 флаконів ліофілізованих	Додати 1 мл дистильованої води
DIL BUF	Буфер для розведення: Фосфатний буфер з бичачим альбуміном, бичачою сироваткою і тимолом.	1 флакон 100 мл	Готовий до використання
CONTROL N	Контролі - N = 1 або 2 в плазмі людини з тимолом. Точні значення див. на етикетках флаконів. Контролі попередньо розведені.	2 флакони ліофілізовані	Додати 1 мл дистильованої води
WASH SOLN CONC	Промивний розчин (Трис-HCl)	1 флакон 10 мл	Розвести 200 х дистильованою водою (використовуйте магнітну мішалку).
CHROM TMB	Хромогенний ТМБ розчин (Tetramethylbenzidine)	1 флакон 12 мл	Готовий до використання
STOP SOLN	Стоп-розчин: HCl 1.0 N	1 флакон 12 мл	Готовий до використання

Примітка: використовувати буфер для розведення як нульовий стандарт. Калібратори стандартизовані до рекомбінантного IGFBP-3 NIBSC/BOO3, референсного реагенту із кодом 93/560.

5 НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

Наступний матеріал необхідний, але не постачається у наборі:

1. Високоякісна дистильована вода
2. Піпетки: 50 мкл, 100 мкл, та 1 мл (рекомендується використовувати точні піпетки з одноразовими наконечниками)
3. Пластмасові пробірки для розведення зразків
4. Міксер
5. Магнітна мішалка
6. Автомат для промивання мікротитрових планшетів.
7. Мікротитровий зчитувач на 450 нм та 650 нм (монохроматичне зчитування)

6 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

А. Калібратори:

Розведіть калібратори з 1 мл дистильованої.

! Використовувати буфер для розведення як нульовий калібратор.

В. Контролі:

Розвести контролі з 1 мл дистильованої води.

С Робочий IGFBP-3-HRP кон'югат:

Приготуйте достатній об'єм розчину кон'югату, додавши, наприклад: 100 мкл 20 х концентрованого кон'югату IGFBP-3- пероксидази хрому (HRP) до 2 мл буферу для кон'югату. Змішати міксером до однорідної маси. Рекоменується одночасне приготування.

D Робочий Промивний розчин:

Приготуйте достатній об'єм робочого Промивного розчину, додавши 199 об'ємів дистильованої води до 1 об'єму промивного розчину (200 х). Для гомогенізації використовуйте магнітну мішалку.

Утилізувати невикористаний робочий Промивний розчин в кінці дня.

7 ЗБЕРІГАННЯ ТА ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ РЕАГЕНТІВ

- Перед відкриттям або розведенням всі компоненти набору стабільні до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці флакону, якщо вони зберігаються при температурі від 2°C до 8°C.
- Невикористані смужки слід зберігати при температурі від 2 °C до 8 °C у герметично закритій упаковці з осушувачем, до закінчення терміну придатності.
- Після відновлення стандарти та контролі стабільні протягом тижня при температурі від 2 °C до 8 °C. Для більш тривалих періодів зберігання слід зробити аліквоти і тримати при -20 °C не більше 3 місяців. Уникайте послідовного заморожування та розморожування.
- Концентрований промивний розчин стабільний при кімнатній температурі (18 °C - 25 °C) до закінчення терміну придатності.
- Робочий кон'югат IGFBP-3-HRP стабільний протягом 4 годин при кімнатній температурі (18 °C - 25 °C), уникайте попадання прямих сонячних променів.
- Зміни зовнішнього вигляду реагентів можуть свідчити про нестабільність або погіршення стану.

8 ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

- Сироватку слід зберігати при температурі від 2°C до 8°C.
- Якщо тест не проводиться протягом 24 годин, рекомендується зберігати в аліквотах при температурі -20 °C. Уникайте подальших циклів заморожування-розморожування.
- Перед використанням всі зразки повинні бути кімнатної температури (18 °C - 25 °C). Рекомендується перемішати зразки перед використанням.
- Не використовувати гемолізовані зразки.

9 ПРОЦЕДУРА

9.1 Примітки щодо обробки

- Не використовуйте набір або компоненти після закінчення терміну придатності.
- Не змішуйте матеріали з різних лотів.
- Перед використанням доведіть всі реагенти до кімнатної температури (18 °C - 25 °C).
- Ретельно перемішайте всі реагенти та зразки.
- Усі стандарти, контролі та зразки слід ставити у двох примірниках. Рекомендується вертикальне вирівнювання.
- Використовуйте чистий пластиковий контейнер для приготування Промивного розчину.
- Щоб уникнути перехресного забруднення, використовувати чисті одноразові наконечники для дозаторів для додавання реагенту та зразка.
- Для дозування хромогенного розчину та стоп-розчину не використовувати дозатори з металевими частинами.
- Дозатори з високою точністю або автоматизоване обладнання для піпетування покращать точність.
- Дотримуватися вказаного часу інкубації.
- Щоб уникнути відхилень, час між піпетуванням першого стандарту та останнього зразка повинен бути в межах часу, який зазначений у пункті 5 розділу 12 (Затримка часу).
- Підготуйте калібрувальну криву для кожного запуску, не використовуйте дані попередніх.
- Додати хромогенний розчин протягом 15 хвилин після промивання мікротитрового планшету.
- Під час інкубації з Хромогенним розчином уникайте потрапляння прямих сонячних променів на мікротитровий планшет.
- Кожну лунку мікропланшету можна використовувати лише один раз.

9.2 Процедура

1. Позначити одну просту пластикову пробірку для кожного зразка.

2. Додати 1 мл Буферу для розведення у кожную пробірку.
3. Додати 10 мкл зразка у ці пробірки.
4. Помішати міксером попередньо розбавлені зразки, відновлені стандарти та контролі.
5. Виберіть необхідну кількість лунок для пробігу. Невикористані лунки слід повторно закрити в упаковці з осушувачем і зберігати при температурі від 2 °C до 8 °C.
6. Закріпити лунки у штативі.
7. Піпетувати 100 мкл буферу для розведення як нульовий калібратор. Піпетувати 100 мкл кожного калібратора, контролю та розведеного зразка у відповідні лунки.
8. Піпетувати 50 мкл розчину IGFBP-3-HRP кон'югату у всі лунки.
9. Інкубувати протягом 2 годин при кімнатній температурі (18 °C - 25 °C).
10. Аспірувати рідину з кожною лункою.
11. Промити планшет 3 рази 400 мкл промивного розчину і аспірувати.
12. Піпетувати 100 мкл розчину хромогену в кожную лунку протягом 15 хвилин після етапу промивання.
13. Інкубувати мікротитровий планшет протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (18 °C - 25 °C), уникаючи попадання прямих сонячних променів.
14. Внести у кожную лунку 100 мкл стоп-розчину.
15. Зчитати при 450 нм (референтний фільтр 630 нм або 650 нм) протягом 1 години і обчислити результати, як описано в розділі 10.

10 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Зчитайте планшет при 450 нм порівняно з референсним фільтром, встановленим на 650 нм (або 630 нм).
2. Обчисліть середнє значення повторів.
3. Побудуйте графік значень ОЩ (ординат) для кожного калібратора щодо відповідної концентрації Nu IGFBP-3 (абсциса) і проведіть калібрувальну криву через точки калібратора, з'єднавши нанесені точки прямими лініями.
4. Зчитати концентрацію для кожного контролю та зразка шляхом інтерполяції на калібрувальній кривій.
5. Скорочення даних за допомогою комп'ютера спростить ці розрахунки. Якщо використовується автоматична обробка результатів, рекомендується пристосування кривої логістичної функції з 4 параметрами.

11 ТИПОВІ ДАНІ

Тільки в якості прикладу і ніколи не повинні використовуватися замість калібрувальної кривої в режимі реального часу.

	IGFBP-3 ІФА	Одиниці ОЩ
Калібратор	0 нг/мл	0,028
	460 нг/мл	0,114
	1270 нг/мл	0,311
	3020 нг/мл	0,778
	6710 нг/мл	1,403
	16070 нг/мл	2,588

12 ХАРАКТЕРИСТИКИ І ОБМЕЖЕННЯ

12.1 Межа виявлення

Шістнадцять нульових калібраторів аналізували разом із набором інших стандартів. Межа виявлення, визначена як видима концентрація двох стандартних відхилень вище середньої ОЩ при нульовому зв'язуванні, становила 10 нг / мл.

12.2 Специфічність

Тестували деякі потенційно інтерферуючі гормони. При концентраціях до 10 мкг/мл жоден з наступних гормонів не виявляв значних інтерференцій:

- rhIGF-BP1
- rhIGF-BP2
- rhIGF-BP4
- rhIGF-BP5
- rhIGF-BP6
- rhIGF-I
- rhIGF-II

12.3 Точність

В АНАЛІЗІ				МІЖ АНАЛІЗАМИ			
Сироватка	N	<X> ± СВ (нг/мл)	КВ (%)	Сироватка	N	<X> ± СВ (нг/мл)	КВ (%)
A	22	827.3 ± 41.99	5,1	A	10	3074 ± 198.67	6,4
B	24	2081.7 ± 104.4	5,1	B	10	4951 ± 296.4	6

СВ: стандартне відхилення; КВ: коефіцієнт варіації

12.4 Правильність ВІДНОВЛЕННЯ

Зразок	Доданий GFBP-3 (нг/мл)	Відновлений GFBP-3 (нг/мл)	Відновлення (%)
Сироватка 1	3700	3880	104,8%
	5940	6680	112%
	10680	11780	109,5%
Сироватка 2	3700	3760	101,6%
	5940	6620	111%
	10680	11620	108,8%

РОЗВЕДЕННЯ

Зразок	Розведення	Теоретична концентр. (нг/мл)	Вимірна концентр. (нг/мл)
Сироватка 1	1/1		6720
	1/2	3360	3510
	1/4	1680	1540
	1/8	840	760
	1/16	420	440
Сироватка 2	1/1		6510
	1/2	3250	3190
	1/4	1620	1410
	1/8	810	710
	1/16	400	440

Послідовне розведення проводили після початкового розведення буфером для розведення, як описано в розділі процедури 9.2.

12.5 Затримка часу між останнім стандартом та додаванням зразка

Як показано далі, результати аналізу залишаються точними, навіть якщо зразок додати через 30 хвилин після додавання стандартів у покриті лунки.

ЗАТРИМКА ЧАСУ		
	0 хв	30 хв
	(нг/мл)	(нг/мл)
S1	4060	4800
S2	5930	5900

13 ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

- Якщо результати, отримані для Контролю 1 та / або Контролю 2, не знаходяться в межах, зазначених на етикетці флакона, результати не можна використовувати, якщо не надано задовільного пояснення розбіжностей.
- При бажанні кожна лабораторія може створити власні пули контрольних зразків, які слід зберігати замороженими в аликвотах. Контролі, що містять азид, будуть перешкоджати ферментативній реакції, тому їх не можна використовувати.
- Критерії прийнятності різниці між повторюваними результатами зразків повинні спиратися на належну лабораторну практику.
- Рекомендується регулярно аналізувати контролі як невідомі зразки для вимірювання мінливості аналізу. Ефективність аналізу слід контролювати за допомогою таблиць контролю якості контролів.
- Хорошою практикою є візуальна перевірка відповідності кривої, обраної комп'ютером.

14 ДОВІДКОВІ ІНТЕРВАЛИ

Ці значення наведені лише для орієнтації; кожна лабораторія повинна встановити свій нормальний діапазон значень.

Вікова група	ЧОЛОВІКИ (нг/мл)			ЖІНКИ (нг/мл)		
	Середнє	Діапазон	N	Середнє	Діапазон	N
0 – 2 роки	2639	1481-4481	15	2348	1398-3485	12
3 – 5 років	2405	1479-3053	12	2752	2059-3325	13
6-8 років	3186	2174-5128	17	3282	2469-4495	13
9-11 років	3263	2020-4705	21	3298	2342-4640	11
12-14 років	3672	2239-5971	19	4241	3000-7022	14

15-17 років	4031	2710-5235	21	4181	2539-6607	20
18-20 років	3826	2304-5537	10	3709	2272-6102	9
21-30 років	3372	2093-4553	11	3766	2704-5594	10
31-40 років	2704	1190-4140	14	3372	2659-4533	12
41-50 років	3886	2318-6897	18	3240	2322-4046	16
51-60 років	3176	2113-4625	16	3830	1602-5997	15
>60 років	2827	1155-3877	23	3621	1995-6505	21

15 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Безпека

Тільки для діагностики *in vitro*.

Компоненти людської крові, що входять до цього набору, були протестовані за європейськими методами схваленими та/або затвердженими FDA та показали негативний результат до HBsAg, анти-HCV, анти-VІL-1 та 2. Жоден відомий метод не дає повних гарантій того, що похідні крові людини не будуть передавати гепатит, СНІД та інші інфекції. Отже, поводження з реагентами, зразками сироватки або плазми повинно відповідати місцевим процедурам безпеки.

Усі продукти тваринного походження та їх похідні були зібрані від здорових тварин. Компоненти великої рогатої худоби походять з країн, де не повідомлялося про ГЕВРХ. Тим не менше, компоненти, що містять тваринні речовини, слід розглядати як потенційно інфекційні.

Уникати контакту шкіри з усіма реагентами, Стоп-розчин містить HCl. У разі контакту ретельно промити водою.

Не палити, не пити, не їсти та не наносити косметику в робочій зоні. Не піпетуйте через рот. Використовуйте захисний одяг та одноразові рукавички.

Для отримання додаткової інформації див. Паспорт безпеки (SDS).



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drg@drg-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

