

Normetanephine Plasma ELISA (EIA-4319)

1. ВВЕДЕНИЕ И ПРИНЦИП МЕТОДА

Сначала проводится осаждение белков плазмы, затем производится количественное ацилирование норметанефрина (норметадреналина). Тест Норметанефрин плазмы ИФА представляет собой твердофазный конкурентный метод иммуноферментного анализа. Норметанефрин иммобилизован на поверхности лунок планшета (твердой фазе). Ацилированный норметанефрин, содержащийся в стандартах, контролях и исследуемых образцах, и иммобилизованный на твердой фазе норметанефрин конкурируют за ограниченное число центров связывания специфичных антител. Когда система достигнет равновесия, несвязавшийся антиген и несвязавшиеся комплексы антиген-антитело удаляются промывкой. Антитела, связавшиеся с норметанефрином, иммобилизованным на твердой фазе, выявляют конъюгатом антикроличьих IgG с пероксидазой. В качестве субстрата используется ТМБ. Интенсивность реакции измеряют при длине волны 450 нм. Количество норметанефрина в исследуемых образцах рассчитывается по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям в стандартов.

Используемая в данном наборе антисыворотка распознает только биологически активные L-формы норметанефрина. Имеющиеся коммерческие синтетические норметанефрин или метанефрин всегда представляют собой смесь D- и L-форм. Соотношение между двумя формами различно в разных партиях препаратов. Это обстоятельство имеет важное значение в тех случаях, когда синтетический норметанефрин используются для обогащения нативных образцов! Так как с помощью данного набора будет обнаруживаться только около 50% синтетического норметанефрина (т.е. L-форма), все образцы будут недоопределяться. Поэтому следует использовать только нативные образцы.

2. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2 – 8 °С до конца срока годности. Не используйте компоненты набора по истечении срока годности, указанного на этикетке.

3. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Стандарт А (М – 0 пг/мл)	2x1,25 мл	лиофилизированный
Стандарт В (М – 30 пг/мл)	2x1,25 мл	лиофилизированный
Стандарт С (М – 100 пг/мл)	2x1,25 мл	лиофилизированный
Стандарт D (М – 300 пг/мл)	2x1,25 мл	лиофилизированный
Стандарт E (М – 1000 пг/мл)	2x1,25 мл	лиофилизированный
Стандарт F (М – 6000 пг/мл)	2x1,25 мл	лиофилизированный
Концентрат ацилирующего реагента	1x1,5 мл	концентрат
Осадитель 1	2x4 мл	готов к использованию
Осадитель 2	2x4 мл	готов к использованию
Контроль 1	2x1,25 мл	лиофилизированный
Контроль 2	2x1,25 мл	лиофилизированный
Реакционные пробирки	2x50	готовы к использованию
Плакша для проведения реакции	1x96 лунок	готов к использованию
Корректирующий буфер	1x4 мл	готов к использованию
Концентрат промывочного буфера	1x20 мл	Концентрат. Разведите содержимое флакона дистиллированной водой до конечного объема 500 мл
Ферментный конъюгат	1x11 мл	готов к использованию, конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к IgG кролика
Субстрат	1x11 мл	готов к использованию, содержит ТМБ
Стоп-раствор	1x11 мл	готов к использованию, содержит 0,25 М серную кислоту
Пленка для заклеивания стрипов	1x4 шт.	
Плакша с иммобилизованным норадреналином –норметанефрином	1x96 лунок	12 стрипов 8-луночных (разделяемых на отдельные лунки), покрытых норадреналином-норметанефрином, желтого цвета
Антисыворотка к Норметанефрину	1x11 мл	Кроличья, готовая к использованию, желтого цвета, желтая крышка

4. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- Откалиброванные автоматические пипетки различной точности (например, 10-100 мкл/100-1.000 мкл)
- Устройство для промывки плашек
- Планшетный спектрофотометр, измеряющий оптическую плотность при длинах волн: 450 и 620-650 нм
- Центрифуга, дающая не менее 3000xg
- Орбитальный шейкер (со скоростью около 600 об/мин; амплитуда встряхивания 3 мм)
- Абсорбирующий материал (фильтровальная бумага, бумажные полотенца)
- Дистиллированная вода
- Вращательная мешалка

5. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Плазма

Необходимо использовать плазму с ЭДТА или цитратом в качестве антикоагулянта. Не используйте гемолизированные и особенно жирные образцы. Хранение: не более 6 часов при температуре 2 – 8 °С, не более 6 месяцев при температуре – 20 °С. Избегайте повторного замораживания и оттаивания образцов.

6. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Перед использованием дайте всем реагентам прогреться до комнатной температуры и тщательно перемешайте, аккуратно переворачивая. Промаркируйте нужное количество Реакционных пробирок. Рекомендуется постановка анализа в дублях.

6.1. Приготовление реагентов

Промывочный буфер

Разведите 20 мл Концентрата промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 500 мл. Храните разведенный буфер при температуре 2 – 8 °С, годен до окончания срока годности (указан в наборе).

Уравнивающий реагент

Восстановите Уравнивающий реагент 10 мл дистиллированной воды. Восстановленный Уравнивающий реагент, не использованный сразу после восстановления, должен быть разбит на аликвоты и храниться при -20 °С. Разморожен он может быть только один раз.

Ацилирующий реагент

Добавьте 80 мкл Концентрата ацилирующего реагента к 3 мл дистиллированной воды и тщательно перемешайте. Используйте немедленно!

Ацилирующий реагент стабилен не более 3 минут.

6.2. Осаждение

1. Внесите в соответствующие Реакционные пробирки по 500 мкл стандартов, контролей и образцов плазмы.
2. Внесите во все пробирки по 50 мкл Осадителя 1.
3. Внесите во все пробирки по 50 мкл Осадителя 2.
4. Аккуратно закройте Пробирки и тщательно перемешайте на вортексе.
5. Инкубируйте в течение 60 минут при комнатной температуре (20-25°C).
6. Центрифугируйте в течение 10 минут при 3000 × g.

Отберите по 100 мкл каждого супернатанта для ацилирования.

6.3. Ацилирование

1. Внесите по 100 мкл каждого супернатанта в соответствующие лунки Планшет для проведения реакции ацилирования.
2. Внесите во все лунки по 25 мкл Корректирующего буфера.
3. Внесите по 25 мкл Ацилирующего реагента (см. 6.1.) во все лунки.

Ацилирующий реагент стабилен не более 3 минут.

4. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре (20-25°C) на орбитальном шейкере (около 600 об/мин).

Отберите по 10 мкл жидкости из каждой лунки для проведения иммуноферментного анализа.

6.4. Иммуноферментный анализ - Норметанефрин

1. Внесите в соответствующие лунки Планшета с иммобилизованным норадреналином – норметанефрином по 10 мкл Ацилированных стандартов А – F, контролей и исследуемых образцов плазмы.
2. Внесите во все лунки по 100 мкл Антисыворотки к норметанефрину.
3. Закройте планшет Пленкой и инкубируйте 40 часов при температуре 2 – 8°C.
4. Снимите пленку, удалите содержимое лунок и тщательно промойте 3 раза, добавляя по 300 мкл разведенного Промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
5. Внесите во все лунки по 100 мкл Конъюгата фермента.
6. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре (20-25°C) на орбитальном шейкере (около 600 об/мин).
7. Удалите содержимое лунок и тщательно промойте 3 раза, добавляя по 300 мкл разведенного Промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
8. Внесите во все лунки по 100 мкл Субстрата, инкубируйте в течение 20 - 30 минут при комнатной температуре (20-25°C) на орбитальном шейкере (около 600 об./мин). Избегайте воздействия прямых солнечных лучей!
9. Добавьте во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента и встряхните планшет для обеспечения гомогенного распределения раствора.

7. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стандарт	Концентрации стандартов					
	A	B	C	D	E	F
Норметанефрин (пг/мл)	0	30	100	300	1000	6000
Норметанефрин (пмоль/л)	0	164	546	1638	5460	32760
Пересчет	Норметанефрин (пг/мл) × 5,46 = Норметанефрин (пмоль/л)					

Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого стандарта, контроля или исследуемого образца. На миллиметровой бумаге постройте калибровочную кривую зависимости средней оптической плотности стандартов (по оси Y) от логарифма концентрации норметанефрина в стандартах в пг/мл (по оси X). Для построения кривой можно использовать различные типы нелинейной регрессии (напр., сплайн, 4х параметрическая логистика, Акима).

7.1. Контроль качества

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормативами. Используйте контроли как с нормальными, так и с патологическими уровнями. Концентрации контролей набора и других коммерческих контролей не должны выходить за рамки доверительных интервалов. Доверительные интервалы контролей в листе контроля качества (QC Report).

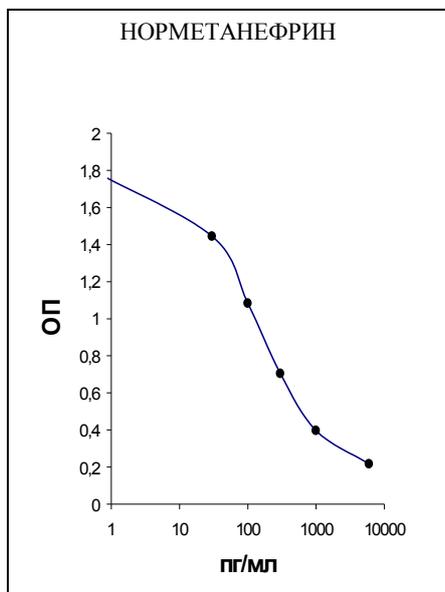
7.2. Калибровка

Связывание антисывороток и конъюгатов фермента, а также активность использованного фермента термозависимы, поэтому значения оптических плотностей могут изменяться, если не используется термостат. Чем выше температура, тем будут выше значения оптических плотностей. Сходные колебания связаны и с изменением времени инкубации. Оптимальная температура при иммуноферментном анализе 20 – 25°C.

При превышении максимальных значений оптической плотности, измеряемых прибором при длине волны 450 нм, можно измерить оптическую плотность в лунках не более чем через 10 минут, используя длину волны 405 нм.

7.3. Типичная калибровочная кривая

■ Пример! Пожалуйста, не используйте эту кривую для определения концентрации.

**8. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Ожидаемые значения		Норметанефрин
	Плазма	< 200 пг/мл

Чувствительность (Предел обнаружения)		Норметанефрин
	Плазма	30 пг/мл

Специфичность (Перекрестная реактивность)	Вещество	Перекрестная реактивность (%)
		Норметанефрин
	Дериватизированный метанефрин	0,087
	Дериватизированный норметанефрин	100
	Дериватизированный 3-метокситирамин	1,74
	Адреналин	0,0032
	Норадреналин	< 0.001
	Допамин	< 0.001
	Ванилинминдальная кислота	< 0.001
	Гомованилиновая кислота	< 0.001
	L-Допа	< 0.001
L-Тирозин	< 0.001	
Тирамин	< 0.001	

Воспроизводимость							
Вариабельность в пределах постановки				Вариабельность между постановками,			
	Образец	Интервал (пг/мл)	КВ (%)		Образец	Интервал (пг/мл)	КВ (%)
Норметанефрин	1	38 ± 4.2	11	Норметанефрин	1	44 ± 6.2	14
	2	189 ± 12	6,1		2	84 ± 5.6	6.7
	3	593 ± 40	6,7		3	433 ± 36	8.3

Линейность		Интервал	Серийные разведения до	Интервал (%)
	НорНорметанефрин	Плазма	58 – 2010 пг/мл	1:32

Открытие		Среднее (%)	Интервал (%)	% Открытие после усиления
	Норметанефрин	Плазма	109	

Сравнение метода по РИА	Норметанефрин	Плазма	ИФА = 1.0 x РИА – 6,9	r = 0.99; n = 30
-------------------------	---------------	--------	-----------------------	------------------

9. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**9.1 Надежность результатов анализа**

Для того чтобы обеспечить надежные результаты анализа, его следует проводить в соответствии с прилагающимися инструкциями, а также с текущими правилами и нормативами (GLP, RILIBAK и т.д.). Особое внимание следует обращать на контрольные исследования точности и правильности во время проведения анализа; результаты этих контрольных исследований не должны выходить за рамки нормальных диапазонов. В случае значительных расхождений

в характеристиках анализа, указанных производителем и реально полученных Вами, пожалуйста, свяжитесь с производителем набора для получения дальнейших инструкций.

9.2. Рекламации

В случае рекламации, пожалуйста, приложите письменный отчет, содержащий все данные по проведению анализа, полученным результатам, а также копии оригиналов распечаток. Пожалуйста, свяжитесь с представителем производителя для получения формы рекламации и верните эту форму полностью заполненной производителю.

9.3. Гарантии

Набор произведен в соответствии с последними достижениями в технологии и подвергается обязательным внутренним и внешним проверкам контроля качества. Любые изменения в наборе или в процессе постановки анализа, а также использование реагентов непредусмотренного назначения могут отрицательно сказаться на результатах анализа и, таким образом, не подпадают под действие гарантии. Производитель не отвечает за повреждения, произошедшие при транспортировке.

9.4 Утилизация отходов

Остатки материалов и/или все остатки реагентов и готовых к использованию растворов являются специальными отходами. Обращение с ними регулируется местными и государственными нормативами. Об удалении специальных отходов имеется информация соответствующих структур органов власти. Утилизация набора должна быть проведена в соответствии с действующими на территории страны нормативами. Законодательной базой утилизации специальных отходов является пакет социально-экономических законов. Данные по безопасности набора можно производитель может предоставить. Данные по безопасности соответствуют стандарту ISO 11014-1.

9.5 Возможные отклонения

Не используйте в одном анализе реагенты и растворы из разных серий набора. Учитывайте разные условия транспортировки и хранения набора. Отступление от инструкции при обработке образцов и работе с набором могут привести к получению искаженных результатов. Не используйте компоненты набора по истечении срока годности. Избегайте микробной контаминации реагентов и промывочного раствора. Соблюдайте указанные в инструкции режимы инкубации и промывки.

9.6 Меры предосторожности

Соблюдайте указанные в инструкции режимы инкубации и промывки. Никогда не пейте и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей. Не курите, не ешьте и не пейте в зоне работы с образцами или тестовыми пробирками к набору. При работе с компонентами набора или с образцами всегда используйте одноразовые перчатки, тщательно мойте руки сразу после окончания работы. Избегайте разбрызгивания реагентов и образцов! Избегайте контактов реагентов с кожей, используйте защитные перчатки и одежду.

Все стадии необходимо выполнять согласно протоколу, необходимо точно соблюдать объемы всех реагентов и образцов, указанные в различных разделах инструкции (объемы при отборе пипеткой или в процессе подготовки).

Правильные результаты также зависят от использования поверенных откалиброванных пипеточных дозаторов.

Азид натрия может взаимодействовать свинцом и медью пробирок с образованием взрывчатых соединений, для предотвращения этого необходимо промывать их большим объемом воды.

Все реагенты набора, содержащие человеческую или животную сыворотку или плазму протестированы и имеют подтвержденный отрицательный результат по ВИЧ (I/II), HbsAg, HCV. Тем не менее, все реагенты должны рассматриваться как потенциально инфицированные и соответственно утилизироваться.

Современная литература, информация о клиническом значении и другие сведения о наборе обращайтесь к производителю.