

НАБОР ИФА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
N-MID ОСТЕОКАЛЬЦИНА
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

AC-11F1, N-MID Osteocalcin ELISA

Каталог. № : **AC-11F1**
Количество : **96**
Производитель: **IDS**
(Великобритания)

Методика от **27-04-2010**
Версия **4**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Для использования в in-Vitro диагностике

ВВЕДЕНИЕ

Тест-система IDS N-MID™ Osteocalcin ELISA - иммуноферментный тест для количественного определения Osteocalcin в сыворотке или плазме человека и предназначен для использования в качестве показателя активности остеобластов в терапии остеопороза.

Ограничения

Концентрация Osteocalcin может варьировать в зависимости от возраста (постменопаузальное состояние), циркадных ритмов, скорости клубочковой фильтрации и длительности лечения.

Результаты данного теста должны быть интерпретированы в совокупности с клиническими данными и результатами других диагностических процедур. Не рекомендуется использовать остеокальцин для скрининга остеопороза в общей популяции. Также, измеренный уровень Osteocalcin не должен использоваться в качестве единственного критерия для начала или изменения терапии.

Для наибольшей воспроизводимости при анализе последовательных образцов используйте один и тот же тип образца (сыворотку или плазму) и проводите забор образца в одно и то же время дня.

Краткое пояснение к тесту

Osteocalcin или костный Gla протеин (BGP) - это основной неколлагеновый белок костной ткани. Он имеет молекулярную массу 5800 Da и состоит из 49 аминокислотных остатков, включая три остатка γ-карбоксиглутаминовой кислоты.

Osteocalcin синтезируется остеобластами. После образования он частично включается в костную ткань, частично попадает в систему циркуляции. Точно физиологическая функция Osteocalcin всё еще не установлена. Во многих исследованиях показано, что уровень циркулирующего Osteocalcin отражает скорость образования кости.

Установлено, что измерение сывороточного Osteocalcin позволяет определять риск развития остеопороза у женщин; проводить мониторинг костного метаболизма во время менопаузы и после нее; гормональной заместительной терапии.

Принцип метода

Тест-система основана на использовании двух высоко специфических моноклональных антител (Mabs) к человеческому остеокальцину. Одни антитела распознают среднюю часть (аминокислотный фрагмент 20-29) полипептида, захватывая его, а другие, конъюгированные с пероксидазой, узнают N-терминальную область (аминокислотные остатки 10-16). Дополнительно к интактному остеокальцину (1-49) детектируется N-концевой - средний фрагмент (1-43).

Сначала стандарты, контроли и образцы вносятся в соответствующие ячейки, покрытые стрептавидином. Затем в ячейки добавляется смесь биотинилированных антител и антител, конъюгированных с пероксидазой. Следом идет 2-х часовая инкубация при комнатной температуре, во время которой образовавшийся комплекс между антигеном и антителами сорбируется на поверхности, покрытой стрептавидином, через биотинилированные антитела. Далее ячейки промываются. После добавления субстрата (ТМБ) и остановки реакции измеряются оптические плотности в ячейках.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

В лаборатории должны соблюдаться следующие предостережения:
■ *нельзя есть, пить, курить, применять косметику там, где находится иммунодиагностический материал*
■ *не набирайте раствор в пипетку ртом*
■ *работайте в перчатках с иммунодиагностическим материалом и тщательно мойте руки после работы*
■ *покрывайте рабочую поверхность одноразовой фильтровальной бумагой*

Хранение

Не вскрытые диагностические наборы следует хранить при 2-8°C. В этих условиях наборы стабильны до срока, указанного на каждом флаконе.

После растворения стандарты и контроли следует хранить замороженными при температуре <-18°C до 3 месяцев, размораживать для использования их можно не более двух раз. Когда компоненты Раствора Антител смешиваются, Раствор Антител, оставшийся после использования, можно хранить при 2-8°C не более месяца или заморозить при -18°C. Остальные реагенты и стрипы следует хранить при 2-8°C.

Внимание

Набор предназначен только для диагностики *in vitro*.

- Со всеми реагентами и лабораторным оборудованием следует обращаться как с потенциально инфицированными.
- Не используйте компоненты набора после окончания их срока годности. Не смешивайте реагенты из разных лотов.

МАТЕРИАЛЫ

Сбор образцов

Кровь из вены следует собирать, избегая гемолиза. Отделить сыворотку от клеток необходимо в течение 3 часов после сбора крови. Образцы лучше немедленно заморозить при температуре < -18°C. Если анализируется плазма, можно использовать и гепарин, и ЭДТА.

Материалы, входящие в состав набора

Перед тем, как открыть набор, пожалуйста, прочитайте раздел МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ. Это касается безопасности внесения и удаления реагентов. Тест-система содержит реагенты для 96 определений. При растворении лиофилизированных препаратов после добавления дистиллированной воды флаконам надо дать постоять 10 минут до перемешивания. При перемешивании избегайте вспенивания.

Микроплашет с ячейками, покрытыми стрептавидином:

Стрипы (в пластиковой рамке, 12x8), покрытые стрептавидином.

Стандарт 0 Osteocalcin:

Один флакон (лиофилизированный препарат), содержащий буфер PBS с белковыми стабилизаторами и консервантами. Растворите в 5 мл дистиллированной воды. Храните при температуре ниже -18°C после восстановления.

Стандарты 1-5 Osteocalcin:

5 флаконов (лиофилизированные препараты) содержащих синтетический человеческий остеокальцин в PBS буфере с белковыми стабилизаторами и консервантами. Растворите содержимое каждого флакона в 0.5 мл дистиллированной воды. Храните при температуре ниже -18°C после использования, размораживайте не более двух раз. Концентрации Osteocalcin проверьте по вкладышу технических данных (сертификату качества).

Контроль 1-2:

Два флакона (лиофилизированный препарат), содержащих синтетический человеческий остеокальцин в том же буфере, что и стандарты. Растворите в 0.5 мл дистиллированной воды. Храните при температуре ниже -18°C после использования, размораживайте не более двух раз. Диапазон концентраций указан во вкладыше технических данных.

Конъюгат антител с пероксидазой:

Один флакон (0.25 мл) концентрированного раствора конъюгата пероксидазы и моноклональных мышиных антител, специфических для N-терминального региона Osteocalcin в TRIS-буфере с белковыми стабилизаторами, детергентом и консервантами. Перед использованием добавьте 10 мл **Разбавителя конъюгата**.

Биотинилированные антитела:

Один флакон (0.25 мл) концентрированного раствора биотинилированных мышиных моноклональных антител, специфичных к средней части Osteocalcin в TRIS-буфере с

белковыми стабилизаторами, детергентом и консервантом. Перед использованием добавьте 10 мл **Разбавителя конъюгата**.

Разбавитель конъюгата (Conjugate Diluent Solution):

Один флакон (22 мл) готового к использованию PBS-буфера с белковым стабилизатором, детергентом и консервантом.

Раствор субстрата (Флакон ТМБ):

Один флакон (не менее 12 мл) готового к использованию тетраметилбензидаина (ТМБ) в кислом растворе. Пожалуйста, заметьте, что раствор субстрата может быть лёгкого голубого оттенка.

Останавливающий реакцию раствор:

Один флакон (не менее 12 мл) готовый к использованию 0.18 M серной кислоты.

Промывочный буфер:

Один флакон (не менее 20 мл) концентрированного буфера для промывки, содержащего детергент и консерванты. Перед использованием разбавляется дистиллированной водой в соотношении 1:50.

Пленка изоляционная:

для закрывания стрипов во время инкубации.

Материалы необходимые, но не входящие в набор

- Емкости для приготовления раствора антител и промывочного буфера.
- Микропипетки объемом 20 μL
- Дистиллированная вода.
- 8-ми или 12-ти канальные пипетки для внесения растворов объемом 100 и 150 μL
- Микропланшетный фотометр для измерения при 450 нм и 650 нм.

МЕТОДИКА

Для оптимальных результатов принципиально строгое выполнение протокола, приведённого ниже

Перед использованием набора позвольте всем компонентам достичь комнатной температуры (18-22 $^{\circ}\text{C}$).

Определите количество стрипов, необходимых для анализа. Рекомендуется все образцы анализировать в дублях, при этом учтите, что 16 ячеек потребуется для стандартов и контролей. Стрипы поместите в держатель. Неиспользуемые стрипы следует хранить в плотно закрытой упаковке с осушителем.

1. Приготовление Раствора Антител:

- 1) Добавьте по 10 мл Разбавителя конъюгата во флаконы **Конъюгат антител с пероксидазой** и **Биотинилированные антитела** и
- 2) смешайте равные объемы обоих растворов.

2. **Инкубация стрипов:** Внесите по 20 μL стандартов 0-5, контролей (флаконы 1-2) и образцов в соответствующие ячейки, затем добавьте по 150 μL **Раствора Антител**. Заклейте стрипы пленкой и инкубируйте 120 \pm 5 мин при комнатной температуре (18-22 $^{\circ}\text{C}$) без встряхивания.

3. **Промывка:** Промойте стрипы 5 раз по 300 мкл промывочного буфера, (разбавив его концентрат предварительно 1:50 дистиллированной водой). Убедитесь, что ячейки полностью осушаются после каждого цикла промывки. При работе с автоматическим промывочным устройством точно следуйте инструкции по работе с прибором. Обычно достаточно 5 циклов промывки.

4. **Инкубация с хромогенным субстратом:** Внесите 100 μL раствора **Субстрата** (Флакон ТМБ) в каждую ячейку и инкубируйте 15 \pm 2 мин в темноте при комнатной температуре (18-22 $^{\circ}\text{C}$) без встряхивания, заклеив стрипы пленкой. Не пипетируйте прямо из флакона, содержащего субстрат ТМБ, но перенесите необходимое для данной серии анализов количество субстрата в чистую посуду. Остатки неиспользованного субстрата из этой посуды выбросьте, не возвращая их во флакон ТМБ.

5. **Остановка цветной реакции:** Добавьте по 100 μL раствора, останавливающего реакцию, во все ячейки.

6. **Измерение оптической плотности:** Измерение можно проводить в течение двух часов при 450 нм с референс-длиной волны 650 нм.

Ограничения метода

Если оптическая плотность образца превышает таковую для стандарта 5, образец надо разбавить стандартом 0 и проанализировать заново.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Хорошая лабораторная практика требует использования образцов для контроля качества в каждой серии измерений, чтобы проверить качество анализа. Контроли следует обрабатывать так же, как и образцы пациентов, а результаты - подходящими статистическими методами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Расчет результатов

Для расчёта может быть использована 4-параметрическая Лог-регрессия.

Альтернативно, рассчитайте средние значения для дублей оптических плотностей шести стандартов (0-5). Постройте стандартную кривую, откладывая по оси ординат оптические плотности против соответствующих концентраций Остеокальцина по оси абсцисс. Интерполяцией определите концентрации Остеокальцина контролей и образцов пациентов.

Пример полученных данных:

Standards/ Controls/ Samples	Osteocalcin (ng/mL)	A _{450nm-650nm} Obs 1/ Obs 2	Mean A _{450nm-650nm}	Interpolated Osteocalcin (ng/mL)
Standard 0	0.0	0.019 / 0.020	0.020	
Standard 1	4.2	0.108 / 0.096	0.102	
Standard 2	7.6	0.183 / 0.177	0.180	
Standard 3	19.4	0.627 / 0.656	0.642	
Standard 4	35.4	1.271 / 1.278	1.275	
Standard 5	56.1	1.988 / 1.873	1.931	
Control 1		0.474 / 0.459	0.467	15.1
Control 2		1.147 / 1.132	1.140	31.8
Sample I		0.099 / 0.105	0.102	4.6
Sample II		0.899 / 0.850	0.875	25.1
Sample III		1.412 / 1.375	1.394	38.7

Замечание: Данные приведены только в качестве иллюстрации, и их не следует использовать для расчетов.

Характеристики метода

Чувствительность (предел детекции): 0,5 нг/мл.

Эта концентрация соответствует трем стандартным отклонениям от среднего 21 определения Стандарта 0.

Воспроизводимость:

Воспроизводимость метода была установлена для трех образцов сыворотки (с низкой, средней и высокой концентрациями) в 13 отдельных сериях анализа по 21 определению в каждой серии. Результаты представлены в таблице:

InterAssay Variation (n=10)

Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
6.7	0.2	5.1
26.2	0.7	2.7
53.9	2.3	4.2

IntraAssay Variation (n=10)

Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
6.7	0.1	1.3
26.2	0.4	1.8
53.9	1.2	2.2

Разбавление/линейность

Была исследована чувствительность метода к каким-либо воздействиям на сыворотку. Четыре образца сыворотки были разбавлены трижды Стандартом А и концентрации были определены методом N-MIDTM Osteocalcin ELISA. Результаты даны в таблице:



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
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

Sample	Dilution	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (% of expected value)
1	1/1	12.0	12.0	100
	1/2	5.1	6.0	84
	1/4	2.7	3.0	89
	1/8			
2	1/1	36.1	36.1	100
	1/2	18.1	18.1	106
	1/4	9.0	9.0	105
	1/8	4.7	4.5	104
3	1/1	38.2	38.2	100
	1/2	20.5	19.1	107
	1/4	9.9	9.6	104
	1/8	4.3	4.8	90
4	1/1	48.1	48.1	100
	1/2	23.8	24.1	99
	1/4	12.2	12.0	101
	1/8	6.3	6.0	105

Извлечение

Точность данной иммуноферментной тест-системы была определена путем добавления разных количеств синтетического Остеокальцина в сыворотку человека. Три образца сыворотки были смешаны с равными объемами 4-х стандартных растворов и проанализированы методом N-MID™ Osteocalcin ELISA.

Результаты приведены в таблице:

Sample	Standards synthetic osteocalcin (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (% of expected value)
1	50	26.9	30.5	88
	25	16.4	18.0	91
	12.5	10.7	11.7	92
	6.3	8.4	8.6	98
2	50	30.8	35.6	87
	25	19.9	20.6	97
	12.5	14.6	14.3	102
	6.3	11.0	11.2	98
3	50	37.5	40.5	93
	25	26.6	28.0	95
	12.5	21.2	21.7	98
	6.3	18.6	18.6	100

Измеряемый диапазон

0,5 – 100 нг/мл

Интерференция

Были исследованы следующие вещества, и для указанной концентрации не обнаружена интерференция с данным методом:

Липиды 15 г/л
Билирубин 200 мг/л
Гемоглобин 5 г/л

Ожидаемые значения

Советуем каждой лаборатории установить свой собственный диапазон нормальных и патологических величин. Как пример, средние значения, стандартные отклонения и 95%-ные доверительные интервалы для разных групп даны ниже. Ответы на другие вопросы можно найти в публикациях, список которых приведен в английском варианте инструкции.

Группа, количество пациентов	N	Среднее, нг/мл	95% доверительный интервал, нг/мл
Женщины в пременопаузе	77	17.4	8,4-33,9
Женщины в постменопаузе ¹	131	28.4	12,8-55,0
Мужчины	85	19,8	9,6-40,8

1) Период после наступления менопаузы в среднем 10,3 лет.

N – количество обследованных человек в группе,

SD – стандартное отклонение,

Повседневное различие между пациентами

Повседневное различие между пациентами оценивали путем анализа образцов сыворотки (утром натощак) от 11 здоровых женщин в постменопаузе в течение 5 временных промежутков в течение 2 недель.

Subject	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
1	22.0	3.5	16
2	13.4	1.0	7
3	19.6	1.3	7
4	18.0	3.1	17
5	12.9	1.1	9
6	9.9	0.9	9
7	14.4	2.2	15
8	7.5	0.4	5
9	15.3	2.2	15
10	14.5	1.6	11
11	14.8	0.6	4

Все графики См. в оригинале инструкции.