



Набор для количественного определения концентрации нейрон специфичной енолазы (NSE)

Кат. № : 105-4610
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

Методика от 07-2007

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения нейрон специфичной енолазы (NSE) в человеческой сыворотке.

1.1 клиническое значение

Нейрон специфичная енолаза (2-фосфо-D-глицерат гидролаза) существует в виде нескольких димерных изоферментов ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$, $\beta\beta$ и $\gamma\gamma$) образованных из трех субъединиц α , β и γ . γ -единица обнаружена или в гомологических $\gamma\gamma$ - или в гетерологических аг-изоферментах и известна как нейрон-специфическая енолаза (NSE). Моноклональные антитела, используемые в данном наборе, связаны с γ -субъединицей фермента и, следовательно, детектируют и $\gamma\gamma$ и $\alpha\gamma$ формы (1).

Уровни NSE низки у здоровых людей и пациентов с легкими заболеваниями. Повышенные уровни обычно обнаруживаются у пациентов с сильными нейроэндокринными опухолями, особенно с мелкоклеточным раком легких (2) и нейробластомой (3).

Количественное определение NSE в сыворотке важно для пациентов с подозрением на мелкоклеточный рак легких или нейробластому для подтверждения диагноза, контроля за эффективностью лечения и обнаружения рецидивов болезни.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор является твердофазным, неконкурентным методом, основанным на двух моноклональных антителах (полученных из мыши), направленных против двух различных антигенных детерминант в молекуле NSE. Используемые моноклональные антитела связываются с γ -субъединицей фермента и следовательно, детектируют и $\gamma\gamma$ и $\alpha\gamma$ формы. Стандарты и сыворотки пациентов инкубируются вместе с биотинилированными анти-NSE антителами E21 и пероксидазой хрена, меченой моноклональными антителами E17 в покрытых стрептавидином ячееках микропланшета. После промывки в каждую ячейку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментативная реакция. В процессе реакции развивается голубая окраска, если присутствует антиген. Интенсивность окраски пропорциональна количеству NSE, присутствующей в образце.

Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном ридере при 620 нм (или, что необязательно, при 405 нм после добавления стоп-раствора).

Стандартные кривые строятся для каждого анализа в координатах оптическая плотность против концентрации для каждого стандарта. Концентрация NSE в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТЫ

3.1 Поставляемые с набором реагенты и материалы

1. Стандарты и контроли NSE

STD 0 (2 флакона) 2x0.75 мл
STD 1 (2 флакона) 2x0.75 мл
STD 2 (2 флакона) 2x0.75 мл
STD 3 (2 флакона) 2x0.75 мл
STD 4 (2 флакона) 2x0.75 мл
CTR1 (2 флакона) 2x0.75 мл
CTR2 (2 флакона) 2x0.75 мл

2. **Инкубационный буфер** (1 бутылка), 50 мл. Фосфатный буфер 50 mM pH 7.4; BSA 1 г/л.

3. **Ферментный конъюгат** (1 бутылка) 0.4 мл. Пероксидазы хрена анти моноклональный конъюгат NSE человека.

4. **Покрытый микропланшет** (1 микропланшет, делимый).

Анти моноклональная NSE человека, адсорбированная на делимом микропланшете.

5. **Раствор ТМВ субстрата** (1 бутылка), 12 мл.

H₂O₂-ТМВ 0.25 г/л (избегайте любого контакта с кожей).

6. **Стоп-раствор** (1 бутылка), 12 мл. Серная кислота 0.15 моль/л (избегайте любого контакта с кожей).

7. **Концентрат промывочного раствора 50x** (1 бутылка), 20 мл. NaCl 45 г/л; Tween-20 55 г/л.

3.2 Требуемые, но не поставляемые реагенты

- Дистиллированная вода.

3.3 Дополнительные материалы и инструменты

- Автоматический дозатор.
- Микропланшетный считыватель.

3.4 Примечания

Стандарты содержат NSE человека в белковом стабилизирующем матричном растворе.

Хранить все реагенты между 2-8 °C в темноте.

Вскройте пакет с реагентом 4 (Покрытый микропланшет) только в комнатной температуре и немедленно закройте после использования.

Не удаляйте защитную пленку из неиспользованных полосок.

После вскрытия набор стабилен до окончания срока годности.

4. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Реагенты содержат Проклин 300 и гентамицин как консервант.
- Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера партий.
- Не используйте высоко гемолизированные образцы.
- Для реобавления и распределения реагентов требуется максимальная точность.
- Данный метод позволяет определять NSE человека в пределах от 4 до 100 нг/мл.
- Избегайте попадания реагентов ТМВ/H₂O₂ под прямой солнечный свет, на металлы и оксиданты.
- Обращайтесь с образцами пациентов как с потенциально инфекционно опасными, используя защитные средства как лабораторные халаты и одноразовые перчатки.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1 Приготовление реагентов

1. Стандарты и контроли

Перед использованием разведите стандарты и контроли 0.75 мл неионизированной воды. Концентрации откалиброванных стандартов следующие (нг/мл):

S0	S1	S2	S3	S4
0	4	20	50	100

Точные концентрации для вычисления кривой характерны для отдельной партии и напечатаны на этикетках флаконов стандартов.

После вскрытия стандарты стабильны две недели если хранить при 2-8 °C. Рекомендуется распределять стандарты и контроли без остатка; избегать длительных влияний комнатной температуры.

2. Разбавленный конъюгат

Приготовить непосредственно перед использованием.

Добавить 20 мкл ферментного конъюгата (реагент 3) к 1.0 мл инкубационного буфера (реагент 2). Количество разбавленного конъюгата пропорциональна количеству анализов.

Легко перемешайте, оставив на вращающемся встряхивателе по крайней мере на 5 минут.

3. Промывочный раствор

Разбавте содержимое концентрата промывочного раствора дистиллированной водой до 1 л. После разбавления он стабилен при 2-8 °C до окончания срока годности набора.

5.2 Подготовка образца

Определение NSE человека должно быть проведено на сыворотке. Сыворотку следовало бы отделить от крови в течении 60 минут, чтобы избежать приращивания NSE человека от высвобождения клеток крови.

Не используйте гемолизированные образцы. Избегайте использования плазмы до тех пор, пока необходимое количество NSE человека можно получить из тромбоцитов.

Образцы могут храниться при 2-8 °C в течение 1 дня; для более длительных периодов храните при -20 °C. Избегайте повторных замораживаний-размораживаний. Не оставляйте надолго образцы при комнатной температуре.

5.3 ПРОЦЕДУРА

Поскольку необходимо провести определение в двух экземпляре, приготовьте две лунки для каждой из пяти точек стандартной кривой (S0-S4), два лунки для каждого образца, одну для бланка.

1. Внесите:

	Стандарт	Образец/контроль	Бланк
Образец/контроль	---	25 мкл	---
Стандарты S0-S4	25 мкл	---	---
Разбавл. конъюгат	100 мкл	100 мкл	---

2. Инкубировать при комнатной температуре в течение 1 часа.
3. Удалить содержимое каждой лунки; промойте лунки 300 мкл разбавленного промывочного раствора. Повторите процедуру промывки два раза, полностью осушив воду.

4. Внесите:

	Стандарт	Образец/контроль	Бланк
Раствор субстрата	100 мкл	100 мкл	100 мкл

5. Инкубировать при комнатной температуре (25-28°C) в течение 15 часов в темноте.

6. Внесите:

	Стандарт	Образец/контроль	Бланк
Стоп раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл

7. Считайте абсорбцию (E) при 450 нм по отношению к бланку.

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для контроля эффективности анализа каждая лаборатория должна анализировать контроли при нормальном, высоком и низком уровнях НСЕ человека. Эти контроли должны рассматриваться как неизвестные величины и значения должны определяться в каждой процедуре анализа. Для контроля эффективности поставляемых реагентов необходимо вести таблицы контроля качества. Для выведения тенденции нужно использовать подходящие статистические методы. Каждая лаборатория должна установить приемлемые границы работоспособности анализа. Другие параметры, которые должны быть проверены, включают 80, 50 и 20% отсекающие калибровочной кривой для контроля воспроизводимости в каждой процедуре. Кроме того, максимальная абсорбция должна совмещаться с прошлым опытом. Значительное отклонение от установленной работоспособности может указывать на незаметное изменение в экспериментальных условиях или некачественности реагентов набора. Для определения причины вариативности должны использоваться новые реагенты.

7. ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

7.1 Эффективность анализа

Образец(цы), которые микробиологически загрязнены, не должны использоваться в анализе. Высоко липемический(е) или гемолизированный(е) образцы также не должны использоваться. Важно, чтобы время реакции в каждой лунке было стабильным для воспроизводимых результатов. Во избежание отклонения в анализе пипетирование образцов не должно превышать 10 минут. При использовании более чем одного планшета рекомендуется повторить кривую отклика дозы. Добавление раствора субстрата провоцирует кинетическую реакцию, которая прекращается добавлением стоп раствора. Поэтому, добавление субстрата и стоп раствора должно проводится в строгой последовательности, чтобы избежать любого отклонения во времени в течение реакции. Спектрофотометры изменяют вертикально. Не касайтесь дна лунок. Неправильное удаление соответствующего раствора во время этапов аспирации и декантации может привести к неполному копированию и неадекватным результатам.

7.2 Интерпретация результатов

При использовании контролируемой компьютером обработке данных для вычисления результатов анализа, обязательно, чтобы ожидаемые значения калибраторов находились в пределах 10 % от установленных концентраций.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Средняя абсорбция

Вычислите среднюю абсорбцию (Em), соответствующую отдельным точкам стандартной кривой (S0-S4) и каждому образцу.

2. Стандартная кривая

Выведите значения абсорбции стандартов против концентрации. Нарисуйте соответствующую кривую через выведенные точки. (т.е.: кубический сплайн, сигмоидально-логистическую, или 4-параметровочную логистическую).

3. Вычисление результатов

Интерполируйте значения образцов на стандартной кривой, чтобы получить соответствующие значения концентраций, выраженных в нг/мл.

9. КОНТРОЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Значения сыворотки находятся в следующих пределах:

Диапазон нормы: 0 – 12 нг/мл

Патологическое значение: > 12 нг/мл

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Специфичность

Антитело распознает определенно нейрон специфичную енолазу. Значения перекрестной реактивности вычислены на принципе вес/вес:

НСЕ Фицджеральда (Кат. номер 30AN10 Партия A99052602 100 %

НСЕ биогенеза (Кат. 6880-1004 Партия 991105A) < 0.22 %.

10.2 Чувствительность

Самая низкая обнаруживаемая концентрация НСЕ человека, которая может быть выведена из нулевого стандарта - 4 нг/мл, при доверительной границе 95 %.

10.3 Корреляция

данный набор был сравнен с другим имеющимся в продаже аналогичным набором. Был проанализирован 31 образец сыворотки в обеих анализируемых системах.

Была рассчитана кривая линейной регрессии

$$y = 1.5656 x - 1.1681$$

$$r = 0.98 (r^2 = 0.95)$$

10.4 "Хук-эффект"

Обработчика прерываний

H-NSE ELISA набор не продемонстрировал «хук-эффекта» при концентрации НСЕ человека до 200 нг/мл.

11. ПРАВИЛА УНИЧТОЖЕНИЯ

Реагенты должны уничтожаться в соответствии с местными правилами.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97,
г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: +38 (0342) 77 51 22
Тел/факс: +38 (0342) 77 56 12
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com

