

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕПТИНА

CAN-L-4260, Leptin ELISA

Каталог. № : **CAN-L-4260**
Производитель: **Diagnostics Biochem
Canada Inc., (Канада)**

Методика от **26-10-2010**
Версия **8.0**



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

ВВЕДЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения Лептина в сыворотке человека методом иммуноферментного анализа.

Только для диагностики *in-vitro*.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный метод основан на иммуноферментном анализе типа «сэндвич». Анализ использует два высоко специфических моноклональных антитела: моноклональное антитело, специфичное для Лептина, иммобилизованное в лунках микропланшета, и другое моноклональное антитело, специфичное для отличного эпитопа лептина, конъюгировано с биотином. Во время первого шага лептин, присутствующий в образцах и стандартах, связывается с иммобилизованным антителом и биотинилированным антителом, формируя сэндвич-комплекс. Излишние и несвязанные антитела удаляются во время промывки. Во втором шаге добавляется стрептавидин-HRP, который специфически связывается с любым связанным биотинилированным антителом. Снова несвязанный стрептавидин-HRP удаляется во время промывки. Добавляется ферментный субстрат (ТМБ), формируя продукт с синим окрасом, количество которого прямо пропорционально количеству Лептина в образце. Энзиматическая реакция останавливается добавлением стоп-раствора, изменяя цвет с синего на желтый. Абсорбция измеряется с помощью микропланшетного анализатора при 450 нм. Набор стандартов используется для построения стандартной кривой, из которой определяется количество Лептина в образце пациента и контролях.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ (См. оригинал инструкции).

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ МЕТОДА И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Данный набор предназначен только для использования *in-Vitro*.
2. При работе с реагентами соблюдать следующие правила:
 - Не пипетировать ртом.
 - Не курить, не пить и не употреблять пищу в местах, где проходит работа с реагентами или образцами.
 - Использовать защитную одежду и одноразовые перчатки.
 - Тщательно вымыть руки после проведения анализа. Избегать контакта с глазами; использовать защитные очки; в случае контакта немедленно промыть водой и обратиться к врачу.
3. Для успешного проведения анализа необходимо полное понимание данной инструкции пользователями. Достоверные результаты могут быть получены только при строгом и тщательном соблюдении данной инструкции, поставляемой с набором.
4. Избегать микробного загрязнения реагентов.
5. Калибровочная кривая должна быть включена в каждую постановку.
6. Контрольные материалы или пулы сывороток, с высоким и низким значениями, должны быть включены в каждую постановку, для оценки достоверности результатов.
7. Контроли (входят в набор) должны включаться в каждый анализ и попадать в установленные границы.
8. Используйте деионизированную или дистиллированную воду, там, где в инструкции указано использование воды для разведения или растворения.
9. Все образцы и реагенты набора должны достичь комнатной температуры и быть аккуратно, тщательно перемешаны перед использованием. Избегайте повторных замораживания и оттаивания образцов и реагентов.
10. Неточное соблюдение процедур, техники анализа, неточное пипетирование, неполные промывки, а также несоблюдение

условий хранения реагентов набора может привести к недостоверным результатам, к тому, что результат, полученный для контроля, не попадет в диапазон допустимых значений.

11. Присутствие пузырьков воздуха в лунках микропланшета влияет на результаты при считывании оптической плотности (ОП) с использованием микропланшетного анализатора. Перед считыванием результатов тщательно удалите все пузырьки с поверхности жидкости.
12. Раствор субстрата (ТМБ) чувствителен к свету и должен оставаться бесцветным при правильном хранении. Нестабильность или загрязнение реагента могут проявиться в виде окрашивания реагента в голубой цвет. В этом случае реагент использовать нельзя.
13. При внесении субстрата и стоп-раствора не используйте пипетки, в которых эти растворы могли бы контактировать с металлическими частями.
14. Для предотвращения контаминации реагентов и образцов используйте новые одноразовые сменные наконечники для каждого реагента, контроля, стандарта или образца.
15. Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов, не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке.
16. Реагенты набора должны считаться опасными веществами и с ними необходимо работать, соблюдая принятые в лаборатории правила безопасности.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены для непосредственного определения Лептина в сыворотке человека. Данный набор не предназначен для определения Лептина в слюне, плазме или других образцах человеческого или животного происхождения.
2. Не используйте образцы с сильным гемолизом, липемией, желтухой, или неправильно хранившиеся образцы.
3. Любые образцы или контрольные сыворотки, содержащие азид натрия или тимерозал, не совместимы с данным набором. Их анализ может привести к ложным результатам.
4. Только Буфер для анализа может быть использован для разведения образцов с высоким содержанием сыворотки. Использование любого другого реагента может привести к получению ложных результатов.
5. Результаты, полученные с помощью данного набора, никогда не должны использоваться как единственное основание для постановки диагноза. Например, присутствие гетерофильных антител у пациентов, регулярно контактирующих с животными или с материалами животного происхождения, потенциально может влиять на результаты иммунологического анализа. Следовательно, клиническая диагностика должна базироваться на полном обследовании пациента, учитывая, в том числе, интенсивность контактов с животными/продуктами, если можно подозревать ложные результаты.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИООПАСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Все образцы сыворотки должны рассматриваться как биологически опасные материалы и обращаться с ними необходимо в соответствии с нормами, принятыми в лаборатории для образцов крови.

ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ

Избегайте контактов с реагентами, содержащими ТМБ, перекись водорода и соляную кислоту. При контакте с такими реагентами тщательно промойте место контакта большим количеством воды. ТМБ может быть канцерогенным веществом.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Для проведения анализа в дублях необходимо приблизительно 0.1 мл сыворотки. Соберите 4-5 мл крови в соответствующую надписанную пробирку и дайте ей свернуться. Центрифугируйте и аккуратно соберите сыворотку. Храните при 4 °C не более 24 часов или при 10 °C или ниже, если анализ будет проводиться позже. Считайте все образцы крови человека потенциально инфекционно опасными и обращайтесь с ними с соответствующими предосторожностями.

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Высокоточные пипетки на 20 - 100 мкл
2. Одноразовые сменные наконечники
3. Деионизированная или дистиллированная вода
4. Шейкер
5. Микропланшетный вошер
6. Микропланшетный фотометр с длиной волны измерения 450 нм и верхним пределом ОП 3.0 или выше.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

- 1. Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к анти-Лептину (с «ломаемыми» стрипами)** - готовый к использованию.
Содержит: 96-ячеечный микропланшет (8x12), покрытый поликлональными антителами в закрываемом пакете с осушителем.
Хранение: охлажденным при 2 – 8°C
Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.
- 2. Конъюгат Моноклональный Анти-Лептин-Биотин**
Содержимое: Одна бутылка, содержащая антитела анти-Лептина, конъюгированные с биотином в белковом буфере с консервантом, не содержащим меди.
Объем: 10 мл/флакон
Хранение: охлажденным при 2 – 8°C
Стабильность: Не вскрытый при 2-8 °C до срока годности, указанного на этикетке.
- 3. Концентрат конъюгата Стрептавидин-HRP**
Содержимое: Один флакон, содержащий Стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена в белковом буфере с консервантом, не содержащим меди.
Объем: 0.4 мл/флакон
Хранение: охлажденным при 2 – 8°C
Стабильность: Не вскрытый при 2-8 °C до срока годности, указанного на этикетке.
Приготовление: Перед использованием развести в соотношении 1:50 в рабочем буфере (например, 40 мкл концентрата конъюгата в 2 мл рабочего буфера). При использовании всего микропланшета разведите 240 мкл HRP в 12 мл рабочего буфера. Разведенный неиспользованный конъюгат должен быть выброшен.
- 4. Калибраторы Лептина**
Содержание: 6 флаконов, содержащих Лептин в буфере на основе сыворотки человека, с консервантом, не содержащим меди. Приготовлены добавлением известных количеств Лептина в сыворотку.
В таблице приведены приблизительные концентрации, точные значения указаны на этикетках флаконов.

Стандарт	Концентрация (нг/мл)	Объем/в пробирке
Стандарт А	0	0.5 мл
Стандарт В	1	0.5 мл
Стандарт С	5	0.5 мл
Стандарт D	10	0.5 мл
Стандарт E	20	0.5 мл
Стандарт F	50	0.5 мл
Стандарт G	100	0.5 мл

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C
Стабильность: Не вскрытый при 2-8 °C до срока годности, указанного на этикетке.

- 5. Контроли**
Содержимое: 2 флакона, содержащие Лептин в буфере на основе сыворотки человека, с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлены добавлением определенного количества Лептина в сыворотку. Допустимый диапазон указан на этикетке флакона.
Объем: 0.5 мл во флаконе.
Хранение: охлажденным при 2 – 8°C
Стабильность: Не вскрытый при 2-8 °C до срока годности, указанного на этикетке.
- 6. Концентрат промывочного буфера**
Содержание: 1 бутылочка, содержащая буфер с неионным детергентом и консервантом, не содержащим ртути.
Объем: 50 мл в бутылочке.
Хранение: охлажденным при 2 – 8°C
Стабильность: Не вскрытый при 2-8 °C до срока годности, указанного на этикетке.
Приготовление: Развести в соотношении 1:10 дистиллированной или деионизированной водой перед использованием. Если для анализа используется весь микропланшет, разведите 50 мл концентрата промывочного буфера в 450 мл воды.
- 7. Рабочий буфер**
Содержание: 1 флакон, содержащий белковый буфер с консервантом, не содержащим ртути.
Объем: 20 мл во флаконе.
Хранение: охлажденным при 2 – 8°C
Стабильность: Не вскрытый при 2-8 °C до срока годности, указанного на этикетке.
- 8. Субстрат ТМБ**
Содержание: 1 флакон, содержащий тетраметилбензидин и перекись водорода в не-DMF или DMSO содержащем буфере.

Объем: 16 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: Не вскрытый при 2-8 °C до срока годности, указанного на этикетке.

9. Стоп-раствор

Содержание: 1 флакон, содержащий 1М серной кислоты.

Объем: 6 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: Не вскрытый при 2-8 °C до срока годности, указанного на этикетке.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

Все реагенты должны нагреться до комнатной температуры перед использованием.

Стандарты, контроли и образцы должны анализироваться в дублях.

Вся процедура анализа должна проводиться непрерывно.

1. Приготовьте рабочие растворы конъюгата стрептавидин-HRP и промывочного буфера.
2. Внесите по 20 мкл каждого стандарта, контроля и образца в соответствующим образом помеченные ячейки, в дублях.
3. Внесите по 80 мкл конъюгата моноклонального анти-Лептина-Биотина во все ячейки.
4. Инкубируйте 1 час при КТ на шейкере (приблизительно 200 об/мин).
5. Промойте ячейки 3 раза, используя по 300 мкл разведенного буфера для промывок на ячейку, а затем постучите микропланшетом по фильтровальной бумаге, убедитесь, что ячейки сухие (рекомендуется использовать автоматическое промывающее устройство).
6. Пипетировать 100 мкл подготовленного конъюгата Стрептавидин-HRP в каждую лунку.
7. Инкубируйте 30 минут при КТ на шейкере (приблизительно 200 об/мин).
8. Промойте ячейки опять как описано в шаге 5.
9. Внесите с одинаковой скоростью по 100 мкл раствора ТМБ субстрата в каждую ячейку.
10. Инкубируйте в течение 10 – 15 минут при КТ.
11. Внесите по 50 мкл стоп-раствора во все ячейки, в той же последовательности и с той же скоростью, как и в шаге 9.
12. Определите оптическую плотность ячеек с помощью микропланшетного ридера при длине волны 450 нм в течение 20 минут после внесения стоп-раствора.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого стандарта.
2. Постройте калибровочную кривую, используя полулогарифмическую бумагу, откладывая по оси Y среднее значение оптической плотности стандартов, а по оси X - их концентрацию. Если возможно, рекомендуется использование программного обеспечения для построения 4-параметрической или 5-параметрической калибровочной кривой.
3. Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого образца.
4. Определите значения концентраций аналита в образцах непосредственно из калибровочной кривой.
5. Если получены результаты со значениями, больше чем 100 нг/мл, разбавить образец Рабочим Буфером не больше, чем 1:8. Результат умножить на коэффициент разведения.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, СВЕДЕННЫЕ В ТАБЛИЦУ:

Стандарт	ОП 1	ОП 2	Средняя ОП	Значение (нг/мл)
A	0.073	0.070	0.072	0
B	0.102	0.100	0.101	1
C	0.290	0.293	0.292	5
D	0.620	0.630	0.625	10
E	1.140	1.086	1.113	20
F	1.947	1.919	1.933	50
G	2.518	2.514	2.516	100
Неизвестный	0.275	0.273	0.274	4.22

ПРИМЕР ТИПИЧНОЙ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ (См. оригинал инструкции).

Приводится только в демонстрационных целях и не должен использоваться для расчета результатов.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность:

Предел обнаружения (LoD) для Лептина составил 0.50 нг/мл. LoB = 0.42 нг/мл.

Специфичность (перекрестная реактивность):

Перечисленные ниже соединения были протестированы при 1000 нг/мл и не показали перекрестной реактивности:

Лептин мыши, TNF- α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-16, GM-CSF, CSF и EGF.

Воспроизводимость внутри серии:

4 образца были проанализированы 20 раз каждый, по одной калибровочной кривой. Результаты (в нг/мл) приведены ниже:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	2.45	0.09	3.7
2	7.94	0.34	4.3
3	11.67	0.64	5.5
4	27.51	1.37	5.0

Воспроизводимость между сериями:

4 образца анализировали 10 раз каждый в течение 10 дней.

Результаты (в нг/мл) приведены в таблице:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	2.71	0.16	5.9
2	8.24	0.48	5.8
3	12.01	0.82	6.8
4	24.98	1.45	5.8

Восстановление:

Насыщенные образцы были приготовлены добавлением определенного количества Лептина к трем образцам сывороток пациента. Результаты (в нг/мл) приведены ниже в таблице:

Образец	Полученное значение	Ожидаемое значение	% Восстановления
1 Ненасыщенный	3.89	--	--
	6.28	6.95	90.4
	10.98	11.95	91.9
	25.43	26.95	94.4
2 Ненасыщенный	7.89	--	--
	8.82	8.95	98.5
	15.03	13.95	107.7
	30.32	28.95	104.7
3 Ненасыщенный	11.61	--	--
	15.71	15.81	99.4
	25.42	24.41	104.1
	41.18	41.07	100.3

Линейность:

Три образца сыворотки пациента серийно разводили с Буфером для разведений. Результаты (в нг/мл) приведены ниже:

Образец	Полученное значение	Ожидаемое значение	% Восстановления
1	3.03	--	--
	1:2	1.52	93.4
	1:4	0.76	93.4
	1:8	0.38	92.1
2	11.27	--	--
	1:2	5.64	105.1
	1:4	2.82	108.2
	1:8	1.41	95.7
3	27.91	--	--
	1:2	13.96	106.8
	1:4	6.98	96.6
	1:8	3.49	94.3

Сравнительные исследования:

Данный метод dbc Leptin ELISA (DBC) был сравнен с другим конкурентным РИА методом (набор x). При анализе 38 образцов сывороток в диапазоне 1.05 – 75.62 нг/мл была получена следующая линейная регрессия:

Набор x = 0.9644 (DBC) + 1.5489

r=0.98

Среднее для Набора x: 21.13

Среднее для DBC: 20.30

Ожидаемые нормальные значения:

Как и для всех клинических анализов, каждая лаборатория должна самостоятельно установить свой собственный диапазон ожидаемых нормальных значений. Исследования ожидаемого диапазона нормальных значений у практически здоровых людей дали следующие результаты (в нг/мл):

Группа	Среднее значение	Диапазон
Худощавые женщины	7.4	3.7 – 11.1
Худощавые мужчины	3.8	2.0 – 5.6

Значения Лептина приблизительно в 2.5 раза выше у женщин, чем у мужчин в единицах BMI.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com