



## Набор ИФА для определения в цельной крови динамики общей иммунореактивности трипсина (ИРТ)

Каталог. № : EIA-1278  
Количество : 96  
Производитель: DRG (США)

Методика от 21-10-2008

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

**ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ.  
РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭТОГО ИЗДЕЛИЯ НЕ БЫЛИ УСТАНОВЛЕНЫ.**

### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА DRG<sup>®</sup> blood spot Trypsin-MW специально разработан для измерения человеческого иммунореактивного трипсина (ТРТ) в образцах пятен крови, собранных на фильтровальную бумагу #903 Шляйхера и Шюэля.

### ВВЕДЕНИЕ И ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Трипсин первоначально синтезируется и секретируется ацинарной клеткой экзокринной поджелудочной железы как предшественник или профермент, трипсиноген (MW - 24 000). Были утверждены два различных изофермента трипсиногена. Обе формы преобразовываются в ферментоактивный трипсин действием дуоденальной энтерокиназы. В присутствии ионов  $Ca^{++}$  энтерокиназа устраняет из трипсиногена гексапептид Val-(Asp)<sub>4</sub>-Lys, освобождая активную форму(ы) трипсина.

В крови встречаются три определенных ингибитора "ферментной активности" трипсина:  $\alpha 1$ -анти-трипсин,  $\alpha 2$ -макроглобулин и промежуточный- $\alpha$ -ингибитор трипсина. Поскольку конкуренция и переменное поглощение серологического трипсина встречается между эндогенными факторами и в определенном используемым антителом трипсина, и поскольку некоторая часть трипсиногена поступает в кровообращение неизменной, настоящий набор ИФА совместим с ранее проведенным анализом, в котором описывались измеренные компоненты как "полная иммунореактивная, подобная трипсину активность" или ИРТ.

В качестве образца анализом используется один 3 мм диск прессованной фильтровальной бумаги. Анализ состоит из ночной и 11/4 часовой инкубации. Анализ может быть значительно автоматизирован, используя оборудование для компрессии диска, раскапывания и промывки планшета. Нормальный диапазон должен быть определен каждой лабораторией, которая оборудована для использования имеющихся в наличии реагентов. Из-за расхождений значений калибровки между различными системами анализа, трудно сейчас утверждать об универсальном диапазоне нормы.

### ПРИНЦИП ИФА ТРИПСИНА-MW

Набор ИФА DRG<sup>®</sup> blood spot Trypsin-MW использует методику ферменто-связанного иммуносорбентного анализа (ИФА), чтобы количественно определить человеческий трипсин в образце пятна крови. В анализах типа ИФА производятся две дополнительные конфигурации антител относительно различных частей того же самого антигена. В ИФА компании ДРГ одна система антител связана с лункой микропланшета, а другое антитело маркировано ферментом. Когда антиген присутствует, он одновременно связывает оба антитела способом "моста" или "сэндвича". Этот весь комплекс остается связанным с лункой. После смывания "несвязанного" фермента добавляется определенный субстрат и преобразовывается в конечный продукт определенного цвета, а реакция быстро останавливается стоп-раствором. Спектральная поглощательная способность (абсорбция) каждой лунки считывается при 450 нм и результаты выводятся на миллиметровке против спектральной поглощательной способности как концентрация ИРТ в нг/мл.

В процедуре DRG<sup>®</sup> диск надавливается на пятно крови, собранное на фильтровальную бумагу #903 Шляйхера и Шюэля. Этот диск помещается в лунку с антителами вместе с элюирующим буфером. После ночной инкубации элюирующий буфер и пятно крови аспирируются, лунка промывается и добавляется маркированное ферментом антитело. После второй инкубации лунка промывается и в нее добавляется субстрат. Ферментная реакция быстро останавливается останавливающим раствором и считывается абсорбция. Затем строится стандартная кривая, из которой могут быть вычислены неизвестные концентрации трипсина.

### Антитело кролика анти-ИРТ

Наиболее примечательно, что набором ИФА DRG<sup>®</sup> blood spot Trypsin-MW используется ICN-антитело ИРТ с уникальными особенностями специфичности "молекулярных структур" ИРТ. Начиная с первоначальной разработки поликлонального антитела DRG<sup>®</sup> к ИРТ в пределах гранта Национального Института Здравоохранения (NIH), мы зафиксировали разнообразные уникальные аспекты нашего антитела с его усиленной реактивностью с "патологической" формой ИРТ по отношению к нормальной циркулирующей форме. Эта "патологическая специфичность" независима от количественных различий в абсолютном показателе используемых стандартов и является функцией антитела. Результаты обширного анализа ICN-антитела доводят, что "патологическая ИРТ" - относительно его молекулярных разновидностей или взаимодействий - демонстрирует больший "потенциал" нашего антитела, чем очищенный интактный трипсин.

### РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

**Примечание:** следующие реагенты включены и в единичный набор ИФА трипсина в пятно крови, и в оптовый набор анализа. Количество реагентов для оптового набора указаны курсивом.

**A. Концентрат ферментного конъюгата ИФА трипсина - 0.5 мл (5.0 мл):** пероксидаза хрена, конъюгированная моноклональным антителом к трипсину в фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7.4. При использовании влить все содержимое флакона ферментного разбавителя (реагент В) во флакон ферментного концентрата, накрыть флакон, и перевернуть осторожно несколько раз, чтобы перемешать. Стабильность разбавленного ферментного реагента - 1 неделя (7 дней) в 2-8°C. Стабильность герметично закрытого ферментного конъюгата указана на этикетке.

**1. Единичный набор анализа:**

При использовании влить все содержимое флакона ферментного разбавителя (реагент В) во флакон ферментного концентрата, накрыть флакон, и перевернуть осторожно несколько раз, чтобы перемешать. Стабильность разбавленного ферментного реагента - 1 неделя (7 дней) в 2-8°C. Стабильность герметично закрытого ферментного конъюгата указана на этикетке.

**2. Оптовый набор анализа:**

При использовании разбавить ферментный концентрат (x 50) разбавителем фермента.

Например: 4 планшета=45 мл разбавленного фермента. Разбавить 0.9 мл ферментного концентрата до полного объема ферментного разбавителя 45.0 мл. При использовании хорошо перемешать. Стабильность разбавленного ферментного реагента - 1 неделя (7 дней) в 2-8°C.

**Примечание:** при снятии колпачка с флакона необходимо соблюдать осторожность, чтобы ни капли ферментного концентрата, держащегося на нем, не было утеряно. Если требуется более чем один флакон ферментного реагента, объединить и смешать весь разбавленный фермент до использования.

**В. Ферментный разбавитель 22.0 мл (220.0 мл):**

Стабильность при использовании с ферментным концентратом - 1 неделя при 2-8°C.

**С. Элюирующий буфер 40.0 мл (400.0 мл):**

Стабильность буфера при 2-8°C указана на этикетке.

**D. Концентрат промывочного буфера 50.0 мл (500.0 мл):**

Фосфатный буфер, содержащий 0.5% твин 20. Разбавить 10-кратно (к 500 мл) дистиллированной водой перед использованием. Стабильность разбавленного промывочного буфера при 2-8°C как и срок годности набора.

**Примечание:** При постоянных заказах оптовый концентрат промывочного буфера доступен для использования в автоматизированных промывочных машинах, таких как промывочная машина M96V от ICN.

**E. Цветной субстрат 22.0 мл (220.0 мл):**

Готовый 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ). Стабильность ТМБ после вскрытия - 1 неделя при 2-8°C.

**F. Останавливающий раствор 22.0 мл (220.0 мл):**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в деионизированной воде. Стабильность при 2-8°C как указано на этикетке.

**G. Микролуночные планшеты, покрытые поликлональным античеловеческим (96 лунок) 2 в каждом наборе (20 в каждом наборе):**

Стабильность невскрытых стрипов при 2-8°C соответствует сроку годности набора после открытия изолированного мешочка из фольги.

**H. Стандарты [7 уровней], контроли [3 уровня], по 1 карточке ( по 5 карточек):**

Цельная кровь, насыщенная человеческим трипсином, нанесена на фильтровальную бумагу. Концентрации указаны на этикетке. Стабильность невскрытой карточке указана на этикетке. Стабильность карточки после вскрытия мешочка меньше чем -15°C согласно срока годности набора.

**Примечание:** Фактические уровни калибровки могут изменяться между сериями, этикетка текущей партии стандартов должна ссылаться на значения калибровки, используемые в вычислениях.

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: МАТЕРИАЛЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Обращаться как со способными передавать инфекции. Исходный материал, из которого был получен этот продукт, не- реактивный к антителам ВИЧ1, ВИЧ2 и не реактивны к HBsAg и гепатиту С когда исследовались лицензированными донорскими реагентами. Ни один из известных методов исследования не может предоставить гарантии, что продукты, полученные из человеческой крови, не будут инфекционными. См. публикацию CPC/NIH Bio-Safety in Microbiological and Biochemical Laboratories (HHS издание №. CPC 84-8395).

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: АЗИД НАТРИЯ**

Эти реагенты содержат азид натрия, у которого наблюдается способность к нагромождению в свинцовой или медной водосточной системе, образуя потенциально взрывчатые металлические азиды. После утилизации этих реагентов всегда смывать раковину большим количеством воды.

**КАЛИБРОВКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ**

Количество ИРТ в образце (пятне крови) вычисляется из стандартной кривой, подготовленной от известного количества трипсина, калиброванного в сравнении капли крови ИРТ с нашими утвержденными наборами РИА. В настоящее время международной референтной подготовки трипсина не существует.

**ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ**

- Чтобы обеспечить точные и надежные результаты, удостоверьтесь, что все диски пятна крови находятся в растворе реакции во время инкубационного периода.
- Рекомендуется строго следовать процедуре анализа, чтобы получить надежные результаты. За любые перестановки или изменения в наборе или процедуре анализа ответственность несет пользователь.
- Этот анализ разработан для использования с образцами, которые ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО собраны на ФИЛЬТРОВАЛЬНУЮ БУМАГУ Шляхера и Шюэля #903.

**НЕОБХОДИМЫЕ ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ**

A. Планшет-ридер, способный считать спектральную поглощательную способность при 450 нм.

B. Многоканальные и одноканальные микропипетки, калиброванные на 100, 200, и 300 мкл.

**Примечание:** 200 или 300 мкл являются приемлемыми для этапа промывки.

C. Автоматизированный планшет-вошер (на выбор).

**СБОР И ОБРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ КРОВИ**

Перенести достаточно крови на фильтровальную бумагу, чтобы полностью заполнить по крайней мере два круга. Крайне важно, чтобы кровь проникла через фильтровальную бумагу на другую сторону. Кровь должна быть в центре круга и распространиться наружу. Избегать разрыва или разрушения поверхности фильтровальной бумаги.

Позволить препарату полностью высохнуть на воздухе (в течение ночи), и не помещать вблизи источника повышенной температуры, под прямым солнечным светом, или на гигроскопичных поверхностях. После высыхания в течение ночи, препараты должны храниться до анализа в воздухонепроницаемом пластмассовом контейнере при *менее чем -15°C*.

**ЭТАПЫ АНАЛИЗА** (Рекомендуется проводить анализ в дубликате)

**Примечание:** использовать максимумально два последовательных планшета. Для более объемных анализов выбор времени капания из пипетки должен быть выдержан, чтобы обеспечить одинаковую обработку планшета.

A. Для каждого калибратора, контроля и неизвестного значения, в двойном экземпляре:

1. Вставить один 1/8" (3 мм) пропитанный кровью диск фильтровальной бумаги в соответствующие лунки микротитрационного стрипового планшета.
2. Добавить в каждую лунку по 200 мкл элюирующего буфера.
3. Накрывать планшет, осторожно потрясти рукой в течение 30 секунд и инкубировать в течение ночи при комнатной температуре.  
\*Убедитесь, что все пятна крови погружены в элюирующий буфер.
4. Аспирировать содержимое всех лунок. Промыть 3 раза 300 или 200 мкл промывочного буфера и аспирировать или "трясти" планшетом до высыхания после каждой промывки.
5. Добавить в каждую лунку по 100 мкл разбавленного ферментного конъюгата.
6. Накрывать планшет, осторожно помешать вручную (30 секунд) и инкубировать 1 час при комнатной температуре.
7. Аспирировать содержимое всех лунок или "трясти" планшетом до высыхания после каждой промывки.
8. Промыть 3 раза 300 мкл промывочного буфера и аспирировать или "трясти" планшетом до высыхания после каждой промывки.
9. Добавить в каждую лунку по 100 мкл свежего субстрата.
10. Инкубировать 15 минут при комнатной температуре.
11. Добавить в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора и встряхивать горизонтально вручную в течение 10 секунд.
12. Считать спектральную поглощательную способность при 450 нм и вывести на полулогарифмической миллиметровке (абс. против дозы в нг/мл). Спектральная поглощательная способность может быть считана в любое время после добавления стоп-раствора максимум до 60 минут.

**КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

Внешние контроли пятна крови, содержащие ИРТ трех различных уровней (низкий, средний, высокий), должны обычно включаться в каждую процедуру анализа. Результаты контроля должны быть зарегистрированы и оценены в соответствии с установленными протоколами, например, Westgard, J.O. и др., *Clinical Chemistry* 27: 493-501, 1981.

**Внутренние контроли:**

Аналогично трехуровневые контроли, включенные в наборе, должны обычно проверяться на соответствие установленным значениям. Контроли набора предоставляют ценную информацию по соответствию работы набора спецификациям изготовителя.

**ПРОТОКОЛ**

Wells	Sample	Eluting Buffer	Wash Buffer	Enzyme Conjugate	Wash Buffer	Color Substrate	Stopping Solution	Read
A <sub>1</sub> , B <sub>1</sub>	Calibrator 1	200 µL	INCUBATE OVERNIGHT AT ROOM TEMPERATURE 3 TIMES, 200 µL or 300 µL	100 µL	INCUBATE ONE HOUR AT ROOM TEMPERATURE 3 TIMES, 200 µL or 300 µL	100 µL	INCUBATE 15 MIN. AT ROOM TEMPERATURE	READ ABS. at 450 nm
C <sub>1</sub> , D <sub>1</sub>	Calibrator 2							
E <sub>1</sub> , F <sub>1</sub>	Calibrator 3							
G <sub>1</sub> , H <sub>1</sub>	Calibrator 4							
A <sub>2</sub> , B <sub>2</sub>	Calibrator 5							
C <sub>2</sub> , D <sub>2</sub>	Calibrator 6							
E <sub>2</sub> , F <sub>2</sub>	Calibrator 7							
G <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>	Level I							
A <sub>3</sub> , B <sub>3</sub>	Level II							
C <sub>3</sub> , D <sub>3</sub>	Level III							
E <sub>3</sub> , F <sub>3</sub>	Unknown	V	V	V	V			

**ВЫЧИСЛЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ**

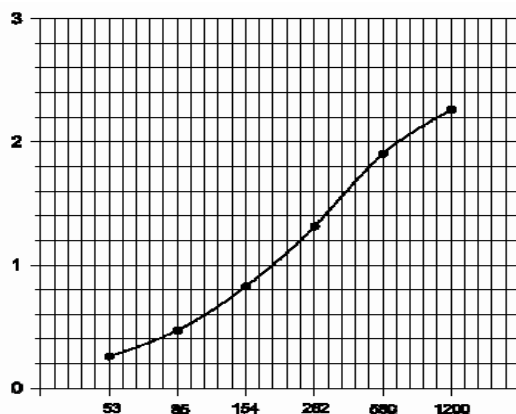
A. Считать абсорбцию образцов сыворотки непосредственно с кривой в нг/мл. Анализ образца и калибровочная кривая предоставлены в разделе ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА, ТОЧНОСТЬ И НАДЕЖНОСТЬ.

B. Образцы с уровнями трипсина вне самого высокого стандарта нужно ИНТЕРПРЕТИРОВАТЬ как "больше чем.....".

## ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА, ТОЧНОСТЬ И НАДЕЖНОСТЬ

## А. Анализ образца

<u>Калибратор</u>	<u>Калибратор или неизвестное</u>	<u>Абс.</u>	<u>Чистая Абс.</u>	<u>Значение графика</u>
NSB	0.0 нг/мл	0.100		
1	53.0	0.361	0.261	
2	85.0	0.574	0.474	
3	154.0	0.932	0.832	
4	282.0	1.418	1.318	
5	580.0	2.007	1.907	
6	1200.0	2.368	2.268	
	Первый уровень	0.662	0.562	98
	Уровень	1.235	1.135	224
	Уровень	1.497	1.397	310



## В. Точность:

Вариабельность в анализе различных образцов, содержащих очищенный трипсин, указана в В1. Вариабельность между анализами различных образцов, содержащих добавленный или эндогенный трипсин (ИРТ) указана в В2.

## 1. В анализе (Абс.):

Образец	N	нг/мл ИРТ	X Абс.	С. О.	К. В. (%)
A	12	44	0,330	0,026	7,9
B	10	79	0,520	0,050	9,6
C	10	143	0,760	0,037	4,9
D	10	242	1,420	0,105	7,4

## 2. Между анализами (нг/мл ИРТ)

Образец	N	ИРТ нг/мл	С. О.	К. В. (%)
A	10	50,0	2,70	5,4
B	10	85,0	7,10	8,4
C	10	142,0	4,80	3,4
D	10	270,0	21,40	7,9

## С. Восстановление:

Процент восстановления стабилизированных образцов, к которым было добавлено известное количество трипсина, указан в следующей таблице.

Образец	N	Ожидаемая ИРТ нг/мл	Наблюдаемая ИРТ	% восстановления
A	10	44	50	113,6
B	10	79	85	107,6
C	10	143	142	99,3
D	10	242	270	111,6

Среднее восстановление - все образцы  $G \times = 108.0 \%$

**D. Чувствительность - минимальная обнаруживаемая доза:**

Минимальная поддающаяся обнаружению доза настоящего набора - <5 нг/мл, как определено повторным анализом нулевого калибратора.

**ЭЛЕМЕНТЫ АНТИТЕЛА**

Набор ИФА DRG<sup>®</sup> blood spot Trypsin-MW использует поликлональную конфигурацию антитела "захвата" на микролуночном планшете и комплементарное маркированное пероксидазой хрена моноклональное антитело в качестве трейсера. Моноклональное антитело произведено от мышей, иммунизированных человеческим трипсином. Поликлональное антитело было выращено в иммунизированных трипсином кроликах.

**ЛИТЕРАТУРА**

*(См. в оригинале инструкции).*

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
**Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005**  
**Тел.: (0342) 775122**  
**Тел/факс: (0342) 775612**  
**E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)**  
**[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)**