

ME E-0400 IGFBP-1 (Белок 1, связывающий Инсулиноподобный фактор роста)
Набор реагентов для ИФА для количественного определения IGFBP1 в сыворотке человека.
Только для in vitro диагностики.

Принцип теста:

IGFBP-1 ELISA основан на методе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), основанный на принципе двухэтапного захвата или «сэндвича».

Для анализа используются два вида высокоспецифичных моноклональных антител: А моноклональные антитела специфичные для IGFBP-1, иммобилизованные на лунках микропланшета, и другие моноклональные антитела IGFBP-1 специфические для разных регионов, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP). IGFBP-1 из стандартов и образцов связываются в лунках микропланшета, затем промываются и инкубируются с HRP-конъюгатом. После второй промывки добавляют ферментный субстрат. Ферментная реакция останавливается добавлением стоп-раствора. ОП измеряется в микропланшетном анализаторе. Интенсивность цвета образцов и ОП прямо пропорциональны концентрации IGFBP-1. Значение Концентрации образцов определяются непосредственно с калибровочной кривой.

Клиническое применение:

IGFBP-1 - один из шести белков, которые специфически связываются с ИФР 1 и 2 в биологических жидкостях и тканях.

IGFBP-1 содержит 234 аминокислоту, с предикативной молекулярной массой 25 kDa.

Вырабатывается IGFBP-1 плодом, печенью взрослых и децидуальным эндометрием.

Уровень IGFBP-1 в сыворотке, связанный с синтезом в печени, имеет значительные суточные колебания. Уровень циркулирующего IGFBP-1 имеет самое высокое значение утром и самое низкое – вечером. Также высокое значение IGFBP-1 наблюдается у плода и новорожденных, который неуклонно снижается к моменту половой зрелости. Средний уровень IGFBP-1 у здоровых взрослых составляет 4,4 мкг/л (диапазон 0.6-14.4 мкг/л). Примерно после 65 лет уровень в сыворотке начинает увеличиваться. Также существует обратная корреляция между индексом массы тела (ИМТ) и концентрацией в сыворотке, взятой натощак.

Наиболее важным регулятором циркулирующего IGFBP-1 является инсулин. Уровень инсулина натощак обратно пропорционален концентрации IGFBP-1. Во время 3-часового теста на толерантность к глюкозе, наблюдает снижение примерно на 50% содержания в сыворотке IGFBP-1. Прием пищи также вызывает снижающий эффект.

При инсулинозависимом сахарном диабете (ИЗСД) уровень IGFBP-1 в сыворотке повышен. При инсулиннезависимом сахарном диабете, при котором наблюдает высокий уровень инсулина, концентрация IGFBP-1 в сыворотке снижается.

Низкие уровни IGFBP-1 наблюдаются также в следующих случаях:

акромегалия, синдром Кушинга и поликистозный овариальный синдром.

Забор и хранение образцов:

Сыворотка:

Возьмите кровь из вены, дайте ей свернуться и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре.

Хранение: при +4 °C до 24 часов

более длительное хранение при -10 °C.

Предварительная подготовка образцов:

Данный анализ является прямым. Предварительная подготовка образцов не требуется.

Дополнительные материалы и оборудование, необходимые, но не поставляемые в комплекте

- Прецизионные микропипетки со сменным одноразовыми наконечниками на 20, 50, 80, 100 и 300 мкл
- Дистиллированная или деионизированная бумага
- Микропланшетный шейкер
- Микропланшетный анализатор на 450 нм и пределом ОП 3,0 или больше.

Реагенты, входящие в состав набора:

AA E-0030 Концентрат промывочного буфера – x10

Содержит: 1 бутыл с не ионным промывочным раствором и консервантом, не содержащим ртуть.
Объем: 50 мл/бутылка
Хранение: 2-8°C
Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке
Способ приготовления: Перед использованием разведите дистиллированной или деионизированной водой 1:10. Если будет использован весь планшет, то разбавьте 50 промывочного буфера с 450 мл воды.

AA E-0055 ТМБ-субстрат – Готов к использованию

Содержит: Один флакон, содержащий тетраметилбензидин и перекись водорода в не- DMF или DMSO содержащем буфере.
Объем: 16 мл/флаконе
Хранение: 2-8°C
Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке

AA E-0080 Стоп-раствор

Содержит: 1 флакон, содержащий 1 М серной кислоты.
Объем: 6 мл/флаконе
Хранение: 2-8°C
Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке

Калибраторы и контроли – готовы к использованию

Ниже приведены примерные концентрации, пожалуйста, обратитесь к этикетке на флаконе для точной концентрации:

Кат.номер	Калибратор	Концентрация (мкг/л)	Объем
ME E-0401	Калибратор А	0	2,0 мл
ME E-0402	Калибратор В	1	0,5 мл
ME E-0403	Калибратор С	5	0,5 мл
ME E-0404	Калибратор D	30	0,5 мл
ME E-0405	Калибратор E	100	0,5 мл
ME E-0406	Калибратор F	250	0,5 мл
ME E-0451	Контроль 1	См. этикетку флакона	0,5 мл
ME E-0452	Контроль 2		0,5 мл

Содержит: сыворотку с IGFBP-1 в основном буфере с консервантом не содержащем ртуть.

Содержат сыворотку с заданной концентрацией IGFBP-1.

Хранение: 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке. Открытые стандарты или аликвоты должны быть использованы в течении 14 дней или заморожены. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

ME E-0413 Буфер для анализа – Готов к использованию

Содержит: 1 флакон, содержащий основной белковый буферный раствор с консервантом, не содержащим ртуть.

Объём: 26 мл/флаконе
Хранение: 2-8°C
Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке

ME E-0431 Разборный микропланшет, покрытый мышиными анти-IGFBP-1 антителами.

Готов к использованию

Содержит: Один 96 луночный (12x8) микропланшет с моноклональными антителами в закрывающемся пакете с осушителем.

Хранение: 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке

ME E-0440 Концентрированный конъюгат IGFBP-1-HRP – x100

Содержит: конъюгат мышиных моноклональных анти-IGFBP-1 антител - HRP в буферном растворе с консервантом не содержащем ртути.

Объём: 0,25 мл/флаконе

Хранение: 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке

Способ приготовления: развести 1:100 с буфером для анализа перед использованием (например. 20 мкл концентрата в 2 мл буфера). Если будет использоваться весь планшет то нужно развести 120 мкл концентрата в 12 мл буферного раствора для анализа. Не использовать, что осталось.

Процедура анализа:

Все реагенты должны быть комнатной температуры. Исследование стандартов, контролей и образцов должны осуществляться в дублях. Как только процедура анализа начата, то все этапы должны быть завершены без перерыва.

1. Приготовьте рабочие растворы конъюгата и промывочного буфера
2. Извлеките необходимое количество микро луночных стрипов. Неиспользуемые поместите обратно в пакет, герметично запечатайте и верните в холодильник.
3. Добавьте по 25 мкл каждого калибратора, контроля и разведенного образца в соответствующие лунки в дублях.
4. Добавьте по 100 мкл буфера для анализа в каждую лунку (мы рекомендуем использовать многоканальную пипетку)
5. Инкубируйте в шейкере (200 об./мин) 30 минут при комнатной температуре.
6. Промойте каждую лунку по 3 раза: внося по 300 мкл приготовленного раствора промывочного буфера, удаляя остатки влаги абсорбирующей бумагой до сухого пятна (мы рекомендуем использовать вошер).
7. Добавьте по 100 мкл рабочего раствора конъюгата в каждую лунку (мы рекомендуем использовать многоканальную пипетку)
8. Инкубируйте в шейкере (200 об./мин) 30 минут при комнатной температуре.
9. Промойте каждую лунку по 3 раза: внося по 300 мкл приготовленного раствора промывочного буфера, удаляя остатки влаги абсорбирующей бумагой до сухого пятна (мы рекомендуем использовать вошер).
10. Добавьте по 150 мкл ТМБ-субстрата в каждую лунку через заданные интервалы времени.
11. Инкубируйте планшет в шейкере при комнатной температуре 10-15 минут.
(или до того момента, когда Калибратор F станет темно-синим, достигнет нужной ОП)
12. Добавьте по 50 мкл Стоп-раствора в каждую лунку через те же интервалы, что и в этапе 10
13. Считайте результат на микропланшетном анализаторе при 450 нм в течение 20 минут после добавления Стоп-раствора.
Если ОП превышает верхний предел обнаружения или фильтр 450 нм недоступен, то можно заменить на фильтр 405 или 415nm. Оптические плотности будут ниже, однако, это не повлияет на результаты пациентов/контрольные пробы.

Расчет результатов

1. рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого калибратора в дублях
2. рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого неизвестного в дублях.
3. Вычтите среднее значение абсорбции "0" калибратора из средних значений оптической плотности остальных калибраторов, контроля и образцов сыворотки.
4. Нарисуйте калибровочную кривую на логарифмической бумаге со средней оптической плотности на Y-оси и концентрацией калибратора на X-оси. Если для анализа используется программное обеспечение, то рекомендуется кривая на 4-параметра.
5. Рассчитайте значение неизвестных при помощи калибровочной кривой.
6. Если концентрация образца получается более 220 мкг/л, то разведите его буфером для анализа в соотношении не более 1:10. Полученный результат следует умножить на фактор разведения.

5. Типичная таблица данных (не используйте для расчета)

Стандарт	ОП 1	ОП 2	Средняя ОП	Концентрация (мкг/л)
A	0.077	0.075	0.076	0
B	0.086	0.088	0.087	1
C	0.120	0.125	0.123	5
D	0.459	0.452	0.456	30
E	1.404	1.356	1.380	100
F	2.591	2.639	2.615	250
Неизвестная	0.120	0.117	0.119	4.5

Типичная калибровочная кривая (не используйте для расчета)
см. оригинал инструкции.

Чувствительность: 0,5 мкг/л

Ожидаемые нормальные значения:

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория определяла свои границы нормальных и аномальных значений.

Группа	N	Среднее значение (мкг/л)	Диапазон (мкг/мл)
взрослые	55	4,4	0,6-14,4