

ME E-0500 ИФР-1 (Инсулиноподобный фактор роста-1)

Набор реагентов для ИФА для количественного определения ИФР-1 в сыворотке человека.
Только для in vitro диагностики.

Клиническое значение:

ИФР-1 представляет собой полипептид из 70 аминокислот (7650 дальтон), один из видов циркулирующих инсулиноподобных факторов роста. Молекула имеет примерно 50% гомологичную последовательность с проинсулином и имеет схожую биологическую активность с инсулином. Секреция зависит от гормона роста, но появляется все большее количество данных о Гормон роста – независимой секреции. ИФР-1 имеет ряд стимулирующих рост эффектов, в том числе митогенные эффекты и стимуляция сульфатации хряща. Он также может быть причастен к скорости обмена в костной ткани.

Почти все количество (>95%) сывороточного ИФР-1 циркулирует в виде специфических ИФР-связывающих белков, в настоящее время выделяют шесть классов таких белков (ИФР-ВР (ИФР-Связ.Белок) 1-6). ВР-3 – является основным белком, связывающим ИФР-1, формирующий тройной комплекс 140 000 дальтон с ИФР-1 и кислотно-лабильной субъединицей.

Клиническое применение:

Уровень ИФР-1 в сыворотке определяют у детей с нарушением роста и для диагностики и мониторинга акромегалии. Концентрация ИФР-1 меняется в зависимости от возраста, питания комплекции тела и секреции Гормона Роста. Определение одного базального ИФР-1 полезно при оценке небольшого роста у детей и исследованиях при поддерживающем питании остро больных. Для диагностики акромегалии определение одного ИФР-1 считается более надежным, чем случайные определения Гормона Роста (ГР)

Принцип теста:

Набор IGF-1 ELISA основан на методе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), основанный на принципе конкурентного связывания.

Образцы пациента, стандарты и контроли подкислены и нейтрализуются непосредственно перед анализом.

Лунки покрыты моноклональными антителами к антигенам расположенным на молекуле ИФР-1. Предварительно подготовленные образцы инкубируются при комнатной температуре с конъюгатом (биотинилированного ИФР-1). Лунки промываются и инкубируются с Ферментным комплексом (Стрептавидин-HRP-комплекс).

После добавления раствора субстрата интенсивность цвета раствора обратно пропорциональна концентрации ИФР-1 в образце.

Состав набора:

НСI **ME E-0519** **1 M HCl**
1 флакон, 3 мл, готов к использованию, для подкисления образца

NaOH **ME E-0587** **1 M NaOH**
1 флакон, 3 мл, готов к использованию, для нейтрализации

96 **ME E-0531** **Микротитровальный планшет**
12x8 (96 лунок), разборный; лунки покрыты моноклональными анти-ИФР антителами

Стандарты:

	Кат.номер	Стандарт	Концентрация (нг/мл)	Объем/флаконе
STANDART A	ME E-0501	Стандарт A	0	1 мл
STANDART B	ME E-0502	Стандарт B	5	1 мл
STANDART C	ME E-0503	Стандарт C	10	1 мл
STANDART D	ME E-0504	Стандарт D	50	1 мл
STANDART E	ME E-0505	Стандарт E	150	1 мл
STANDART F	ME E-0506	Стандарт F	300	1 мл
STANDART G	ME E-0507	Стандарт G	600	1 мл

Стандарты откалиброваны согласно рекомендациям International Reference Reagent для ИФР-1, NIBSC code: 87/518.

Пересчет: $1 \text{ нг/мл} \times 0,13 = \text{нмоль / л}$

содержат 0,03% проклин 300 + 0.005% гентамицина сульфата в качестве консерванта.

CONJUGATE **ME E-0540** **Ферментный конъюгат**

1 флакон, 20 мл, готов к использованию; стрептавидин-HRP комплекс содержит 0,01% MIT и 0,02% BND в качестве консерванта.

BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane

MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

SUBSTRATE **FR E-0055** **Раствор субстрата**

1 флакон, 14 мл, готов к использованию; тетраметилбензидин (ТМБ).

STOP-SOLN **FR E-0080** **Стоп-раствор**

1 флакон, 14 мл, готов к использованию, содержит 0,5 М серной кислоты. Избегайте контакта со Стоп-раствором. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.

WASH-CONC 40x **FR E-0030** **Промывочный раствор**

1 флакон, 30 мл (40X концентрированный), см. "Подготовка реагентов".

Оборудование и материалы необходимые, но не входящие в комплект

- Микропланшетный анализатор (450±10)
- Откалиброванные переменные прецизионные микропипетки
- Одноразовые наконечники пипеток
- Абсорбирующая бумага
- Дистиллированная вода
- 1,5 мл реакционная пробирка для подготовки образца (подкисление и нейтрализация)
- универсальная индикаторная бумага

Хранение и стабильность набора:

При хранении при температуре 2-8 °С закрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. Не используйте реагенты после этой даты.

Открытые реагенты должны храниться при температуре 2-8 °С.

Микротитровальный планшет должен храниться при температуре 2-8 °С в закрытом фольгированном пакете. При соблюдении этих условий срок хранения – 6 недель.

Подготовка реагентов:

Перед использованием все реагенты и необходимое количество стрипов должны быть комнатной температуры.

Промывочный раствор:

Добавьте к 30 мл концентрата промывочного раствора 1170 мл деионизированной воды, до конечного объема 1 200 мл.

Разведенный промывочный раствор стабилен 2 недели при комнатной температуре.

Образцы:

Используется сыворотка.

Хранение: Образцы должны быть использованы немедленно.

Возможно более длительное хранение (до 2 месяцев) замороженных образцов при -20°C .

Размораживание должно проводиться непосредственно перед исследованием.

Разведение образцов:

Если при анализе установлено, что образец содержит более высокую концентрацию, чем стандарты, то образцы можно разбавить Стандарт 0 и провести повторное исследование, как описано в процедуре анализа.

При расчете результата должен учитываться фактор разведения

Пример:

а) разведение 1:10: 10 мкл Образца + 90 мкл Стандарт 0 (тщательно перемешать)

б) разведение 1:100: 10 мкл разведения а) + 90 мкл Стандарт 0 (тщательно перемешать)

Процедура теста:

Общая информация:

- Перед применением все реагенты должны быть комнатной температуры. Все реагенты необходимо тщательно смешать без образования пены.
- Как только процедура анализа была начата, она должна быть завершена без перерыва.
- Используйте одноразовые наконечники пипеток для каждого стандарта, контроля и образца
- ОП является функцией от инкубации и температуры. Рекомендуется перед началом анализа подготовить все реагенты, снять крышки, закрепить лунки и т.д. Это позволит обеспечить равные интервалы времени на каждом этапе пипетирования.
- как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

Подкисление и нейтрализация стандартов и образцов:

1. Добавьте по 100 мкл образцов, стандартов и контролей в 1,5 мл реакционные пробирки.
2. Добавьте по 20 мкл 1 М HCl
3. Перемешайте и инкубируйте 15 минут
4. Для нейтрализации добавьте по 20 мкл 1М NaOH в каждую пробирку и перемешайте
5. После нейтрализации уровень pH должен быть от 7 до 8.
Определите уровень pH при помощи универсальной индикаторной бумаги

Процедура анализа:

1. Закрепите необходимое количество стрипов на штативе.
2. Добавьте по 50 мкл подкисленных и нейтрализованных стандартов, контролей и образцов в соответствующие лунки новыми одноразовыми наконечниками.

3. Добавьте по 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку.
Тщательно перемешайте в течении 10 секунд. Важно добиться полного смешивания на этом этапе.
4. Инкубируйте 120 минут при комнатной температуре.
5. Резко вытряхните содержимое лунок.
Промойте каждую лунку 4 раза разведенным промывочным раствором (по 400 мкл на лунку). Для удаления остатков жидкости резко переверните планшет и прижмите к абсорбирующей бумаге.
Важно: чувствительность и точность данного анализа зависит от правильного выполнения процедуры промывки.
6. Добавьте по 150 мкл Ферментного комплекса в каждую лунку.
7. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
8. Резко вытряхните содержимое лунок.
Промойте каждую лунку 4 раза разведенным промывочным раствором (по 400 мкл на лунку). Для удаления остатков жидкости резко переверните планшет и прижмите к абсорбирующей бумаге.
9. Добавьте по 100 мкл Субстрата в каждую лунку
10. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
11. Для остановки ферментной реакции добавьте по 100 мкл Стоп-раствора в каждую лунку.
12. Измерьте ОП на микропланшетном анализаторе при 450 ± 10 нм в течение 10 минут после добавления стоп-раствора.

Расчет результатов:

1. рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого стандарта, контроля и неизвестного
2. 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.
3. Рассчитайте значение неизвестных при помощи калибровочной кривой.
4. Если концентрация образца выше стандартов, то образец должен быть разведен. При расчете результата необходимо учитывать фактор разведения.

Пример типичной стандартной кривой:
(не используйте для расчета)

Стандарт	ОП (450 нм)
Стандарт А (0 нг/мл)	1.94
Стандарт В (5 нг/мл)	1.69
Стандарт С (10 нг/мл)	1.49
Стандарт D (50 нг/мл)	0.93
Стандарт Е (150 нг/мл)	0.56
Стандарт F (300 нг/мл)	0.44
Стандарт G (600 нг/мл)	0.33

Ожидаемые нормальные значения:

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

Дети пре-пубертатного возраста (3-8 лет)	20 – 250 нг/мл
Маленькие дети с низкой массой тела	До 50 нг/мл
Дети пубертатного возраста (11-16 лет)	130-600 нг/мл
Взрослые	150-350 нг/мл

с возрастом уровень ИФР-1 может снижаться.

Чувствительность: 1.292 нг/мл