

N-концевой предшественник натрийуретического пептида *B*-типа (*Nt-proBNP*) (*Nt-proBNP*)

Иммуноферментный набор для количественного определения *NT-proBNP* в человеческой сыворотке или ЭДТА плазме

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

BNP в основном экспрессируется в желудочках миокарда в ответ на объемную перегрузку и повышение давления наполнения. BNP имеет отщепляемую сигнальную последовательность. Зрелый BNP состоит из 108 аминокислотных остатков (proBNP или BNP-108) и подвергается расщеплению, что приводит к образованию физиологически активного BNP-32 и дополнительного C-концевого фрагмента (см. http://www.uniprot.org/uniprot/P16860#PRO_0000001532), наряду с физиологически неактивным N-концевым пептидом, содержащим 1-76 аминокислот, который впоследствии разрушается протеолитически.

BNP играет ключевую роль в поддержании гомеостаза сердечно-сосудистой системы с биологическими эффектами, включая натрийурез, диурез, вазорелаксацию и ингибирование секреции ренина и альдостерона. Повышение концентрации BNP в циркуляции свидетельствует о наличии сердечной недостаточности.

ВОЗМОЖНЫЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

- Сердечная недостаточность, острый инфаркт миокарда, дисфункция левого желудочка
- Почечная недостаточность
- Ожирение и диабет
- Различные формы вторичной гипертензии
- Мониторинг эффективности терапии у пациентов с сердечной недостаточностью

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

обозначение	компонент набора	количество
PLATE	Стрипованный микропланшет с лунками, покрытыми поликлональными овечьими антителами к NT-proBNP в запечатанном пакете с осушителем	12x8 тестов
WASHBUF	Концентрат промывающего буфера (20-кратный), бесцветная крышка	1x50 мл
STD	Стандарт, содержит синтетический человеческий NT-proBNP (0/10/40/160/640 пмоль/л), лиофилизированные, белые крышки	5
CTRL	Контроли, содержат синтетический человеческий NT-proBNP, желтая крышка, лиофилизированные. Точная концентрация после разведения указана на этикетке	2 флакона
CONJ	Конъюгат (овечьи антитела к человеческому NT-proBNP-HRPO), содержит красный краситель, коричневая крышка, готов к использованию.	1x22 мл
SUB	Субстратный раствор (ТМБ-раствор), синяя крышка, готов к использованию	1x22 мл
STOP	Стоп-раствор, серная кислота, белая крышка, готов к использованию	1x7 мл

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ

- Пленка для накрывания микропланшета
- Паспорт контроля качества
- Схема микропланшета
- Инструкция по использованию

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Калиброванные пипетки переменного объема на 50-500 мкл и одноразовые сменные наконечники к ним.
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм (референсный фильтр 630 нм опционно)
- Графическая бумага или программное обеспечение для расчета результатов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство для микропланшетов, альтернативно, многоканальная пипетка или диспенсер

- Холодильник на 4°C (2-8°C)
- Дистиллированная или деионизированная вода

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ

Все реагенты стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке флаконов с реагентами, при хранении при 4°C (2-8°C).

Приготовление образцов:

NT-proBNP стабилен в цельной крови в течение нескольких часов при комнатной температуре (18-26°C). Тем не менее, мы рекомендуем как можно скорее отделить сыворотку от плазмы центрифугированием в течение 20 минут при 2000g, желательнее при 4°C (2-8°C). ЭДТА плазма или сыворотка может храниться до двух дней. Для более длительного хранения образцы необходимо замораживать при -25°C или ниже. Образцы выдерживают до 3 циклов замораживания/оттаивания без потери активности. Липемические или гемолизированные образцы могут давать ошибочные результаты. Перед анализом образцы необходимо тщательно перемешать. Анализ рекомендуется проводить в дублях. Образцы, в которых концентрация аналита превышает концентрацию самого высокого стандарта STD5 (640 пмоль/л), должны быть разведены STD1 или сывороткой, негативной по NT-proBNP.

Разведение/Приготовление реагентов:

STD (Стандарт): Внесите по 500 мкл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон. Оставьте при комнатной температуре (18-26°C) на 10 минут. Тщательно перемешайте. Концентрация стандартов указана на этикетке флаконов. Разведенные стандарты стабильны при -25°C до истечения срока годности. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

CTRL (Контроль): Внесите по 500 мкл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон. Оставьте при комнатной температуре (18-26°C) на 10 минут. Тщательно перемешайте. Конечная концентрация указана на этикетке флакона. Разведенный контроль стабилен при -25°C до истечения срока годности. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

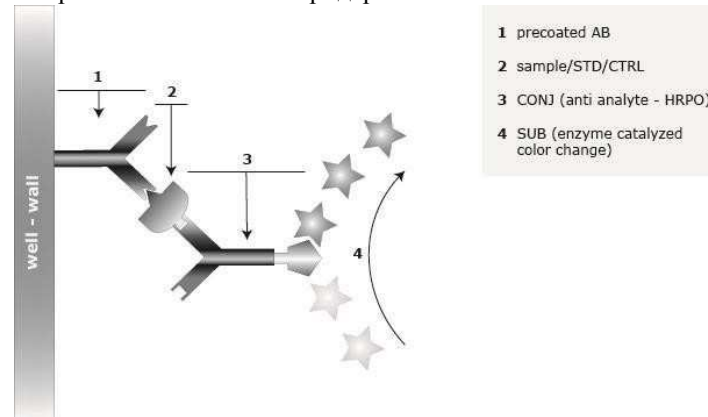
WASHBUF (Буфер для промывок): Разведите концентрат буфера для промывок в 20 раз (например, 50 мл WASHBUF + 950 мл дистиллированной воды) и тщательно перемешайте. Кристаллы, образовавшиеся в концентрате, должны раствориться при комнатной температуре (18-26°C). Неразведенный WASHBUF стабилен при 4°C (2-8°C) до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона. Для анализа используйте только разведенный WASHBUF (буфер для промывок).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный тест основан на «сэндвич»-методе иммуноферментного анализа и предназначен для количественного определения NT-proBNP в образцах человеческой сыворотки и ЭДТА плазмы.

На первом этапе образец и конъюгат (овечьи антитела к человеческому NT-proBNP-HRPO) вносят в лунки микропланшета, покрытые поликлональными овечьими антителами к NT-proBNP. NT-proBNP, присутствующий в образцах, связывается с антителами, сорбированными в лунках, и образует «сэндвич»-комплекс с конъюгатом (детектирующие антитела). При последующей промывке из лунок удаляются все несвязавшиеся компоненты.

На втором этапе в лунки микропланшета вносится субстрат ТМБ (тетраметилбензидин). Интенсивность развившейся окраски (катализируется ферментом) пропорциональна количеству NT-proBNP в образце. Интенсивность развившегося цветного окрашивания измеряют с помощью стандартного микропланшетного ИФА-ридера.



ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты должны достичь комнатной температуры (18-26°C).

Пометьте на схеме микропланшета лунки STD/SAMPLE/CTRL (стандартов, контролей и образцов).

Извлеките из алюминиевого пакета стрипы микропланшета. Неиспользованные стрипы храните при 4°C в алюминиевом пакете с осушителем. Стрипы стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке.

1. Внесите по 50 мкл STD/SAMPLE/CTRL (стандартов, образцов и контролей) в дублях в соответствующие лунки.

2. Внесите по 200 мкл CONJ (Конъюгата) во все лунки, осторожно перемешайте.

3. Закройте стрипы плотно и инкубируйте в течение 3 часов при комнатной температуре (18-26°C).

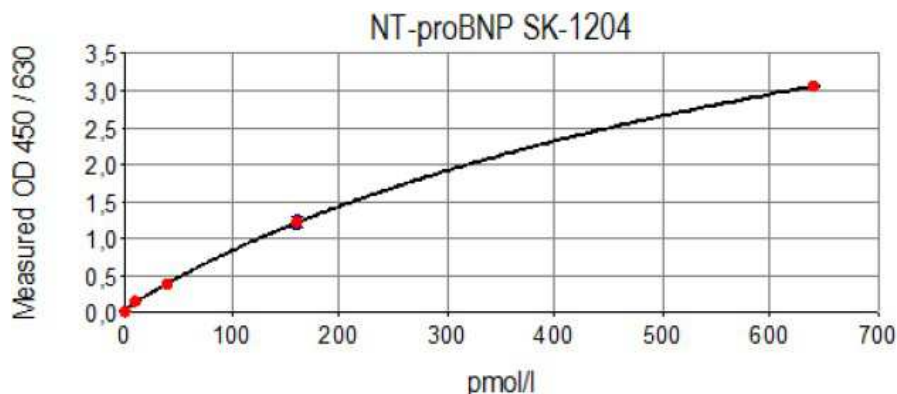
4. Полностью удалите содержимое лунок и промойте их 5 раз по 300 мкл разведенного WASHBUF (буфера для промывок). Удалите остатки буфера для промывок, постукая перевернутым микропланшетом по фильтровальной бумаге.
5. Внесите по 200 мкл SUB (субстрата) во все лунки, осторожно перемешайте.
6. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (18-26°C) в темноте.
7. Внесите по 50 мкл реагента STOP (стоп-раствора) во все лунки, осторожно перемешайте.
8. Сразу же измерьте оптическую плотность при 450 нм с фильтром сравнения 630 нм, если возможно.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) во всех лунках на микропланшетном ридере при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 630 нм). Постройте стандартную кривую по значениям ОП STD (стандартов). Используйте коммерчески доступное программное обеспечение или графическую бумагу. По этой стандартной кривой получите концентрацию аналита в образцах. Анализ был оценен по четырехпараметрическому алгоритму (4PL). Другие методы построения кривой должны быть оценены пользователем.

Образцы со значениями выше STD5 (640 пмоль/л) могут быть разведены STD1 или отрицательной по содержанию NT-proBNP человеческой сывороткой и повторно проанализированы. При расчете конечных концентраций в образцах необходимо учитывать факторы разведения.

Пример стандартной кривой



В протоколе контроля качества (QC), поставляемом с набором, указаны результаты окончательного контроля качества для каждого набора на дату производства. Значения ОП, полученные пользователями, могут отличаться из-за различных

воздействий и/или из-за нормального снижения интенсивности сигнала в течение срока годности. Однако это не влияет на достоверность результатов, если ОП STD5 1,50 или более, а значения для CTRL находятся в заданном диапазоне (целевые диапазоны см. этикетки).

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Метод:	«сэндвич» ИФА анализ, HRP/TMB, микропланшеты 12x8 лунок	
Антитела/Стандарт:	Захватывающие антитела: поликлональные овечьи антитела к NT-proBNP человека, специфически связывающиеся с участком аминокислотной последовательности 31-57 proBNP. Детектирующие антитела: поликлональные овечьи антитела к NT-proBNP человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, специфически связывающиеся с участком аминокислотной последовательности 8-29 proBNP. Стандартный материал: синтетический NT-proBNP человека (1-76).	
Тип образца:	Сыворотка человека, ЭДТА плазма	
Диапазон стандартов:	От 0 до 640 пмоль/л (0/10/40/160/640 пмоль/л)	
Фактор конверсии пмоль/л в пг/мл	1 пмоль / л = 8,475 пг / мл Соответствует NT-proBNP (1-76), детектируемому иммуноферментным методом	
Объем образца:	50 мкл/ лунка	
Время инкубации:	3 часа / 30 мин	
Чувствительность:	LOD (0 пмоль/л + 3SD): 3.0 пмоль/л; LLOQ: 3.3 пмоль/л	
Специфичность:	Этот метод детектирует эндогенный (естественный) и рекомбинантный NT-proBNP человека (1-76).	
Воспроизводимость:	Внутри серии (n=3) ≤ 4%, Между сериями (n=8) ≤ 7%	
Извлечение (среднее R, обогащенное рекомбинантным NT-proBNP)	Обогащение 80 пмоль/л	Обогащение 320 пмоль/л
	Сыворотка (n=4)	99%
Линейность при разведении (среднее значение R от ожидаемого NT-proBNP после разведения 1 + 1)	Сыворотка (рекомбинантный NT-proBNP): 117%	Сыворотка (эндогенный NT-proBNP): 82%
	ЭДТА плазма (рекомбинантный NT-proBNP): 84%	ЭДТА плазма (эндогенный NT-proBNP): 84%

Уровни у практически здоровых лиц:	Медиана (сыворотка, n=70): 5.8 пмоль/л Медиана (ЭДТА плазма, n=28): 5.6 пмоль/л Каждая лаборатория должна установить свои собственные референсные значения.
------------------------------------	---

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Эксперимент:

Внутри серии анализов: 2 образца с известными концентрациями анализировали 3 раза в одной серии анализов 1 оператором.

Между сериями анализов: 2 образца с известными концентрациями анализировали 8 раз в 2 двух сериях анализов различными операторами.

	внутри серии (n=3)		между сериями (n=8)	
	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Среднее, фмоль/мл	60.2	35.2	52.1	108.1
SD (фмоль/мл)	2.0	0.9	1.7	7.9
CV%	4	3	3	7

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

- Не используйте или не смешивайте реагенты из различных лотов или других источников.
- Не допускайте перемешивания пробок или крышек разных реагентов или одного реагента разных лотов.
- Не используйте реагенты по истечении срока годности. Защищайте реагенты от действия прямого солнечного света.
- Раствор субстрата должен оставаться бесцветным до внесения в лунки микропланшета.
- Для получения точных результатов необходимо тщательно заклеивать лунки микропланшета пленкой во время инкубаций.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Все компоненты набора человеческого происхождения протестированы на наличие антител к ВИЧ и вируса гепатита С, а также HBsAg, и при тестировании получены отрицательные результаты. Однако со всеми реагентами и образцами следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

Все жидкие компоненты набора содержат $\leq 0,01$ Проклина 950 в качестве консерванта, который не токсичен в концентрациях, используемых в данном наборе. Может оказывать аллергическое действие при контакте с кожей, избегайте попадания реагентов на кожу или глаза.

- Не пипетируйте ртом.

- В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить, курить или использовать косметику.
- Чтобы избежать контакта с реагентами, при работе используйте защитные перчатки.
- Серная кислота может вызвать раздражение глаз и кожи. При попадании промойте большим количеством воды.