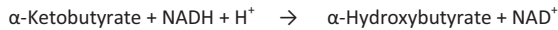


**НВДН
ХИДРОКСИБУТИРАТ ДЕХИДРОГЕНАЗА****ЗА КОЛИЧЕСТВЕНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА α -НВДН АКТИВНОСТ В СЕРУМ ИЛИ ПЛАЗМА****ПРИНЦИП НА МЕТОДА**

НВДН



p-Npp е безцветен, но p-Nitrophenol има силна абсорбция при 405 nm. Скоростта на промяна на абсорбцията измерена при 340 nm дължаща се на окисляването на NADH е право пропорционална на НВДН активността.

РЕАГЕНТИ

При разтваряне според инструкциите на опаковката реагентът съдържа:

α -Ketobutyrate 2.3 mM
NADH 0.194 mM
Phosphate Buffer (pH 7.2 \pm 0.1)
Стабилизатор и пълнители

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

Реагентите са само за "ин витро" употреба. Трябва да се спазват обичайните предпазни мерки за работа с лабораторни реагенти.

ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТИТЕ

Разтворете НВДН реагента с количеството дейонизирана вода, посочено на опаковката. Размесете като обръщате нагоре-надолу 15 секунди.

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

Реагентът е стабилен до изтичане на срока на годност, отбелязан на опаковката, ако се съхранява при 2-8°C. Разтвореният реагент е стабилен 4 дни в хладилник (2-8°C) и 1 ден при стайна температура.

Разтвореният реагент не трябва да се използва, ако абсорбцията, измерена при 340 nm спрямо вода е под 1.000. Реагентът трябва да бъде изхвърлен, ако в сухия реагент има образувани бучки, които могат да се дължат на евентуално проникване на влага. Реагентът трябва да бъде изхвърлен ако при приготвяне не се разтвори напълно или ако разтворът изглежда мътен.

СЪБИРАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ПРОБИТЕ

След вземане на пробата, отделете серума незабавно. Препоръчително е да се използва хемодиализиран серум. Може да се използва и хепаринизирана или третирана с EDTA плазма. НВДН активността е стабилна 7 дни при 4°C.

ИНТЕРФЕРИРАЩИ СУБСТАНЦИИ

За този тест не трябва да се използва хемодиализиран серум. В литературата е посочен изчерпателен списък на медикаментите, които могат да окажат интерфериращо въздействие.

ПРОЦЕДУРА ЗА МАНУАЛНА РАБОТА

1. Пригответе НВДН реагента според инструкциите.
2. Настройте спектрофотометъра на 340 nm и 37°C температура. Нулирайте с дейонизирана вода.
3. Загрейте реагента до 37°C.
4. В кюветата, означена като ТЕСТОВА добавете 1.0ml от реагента и оставете да се темперира при 37°C.
5. Добавете 0.040ml (40 μ l) от пробата, разбъркайте добре с обръщане нагоре-надолу и инкубирайте при 37°C в продължение на 30 секунди.
6. Отчетете абсорбцията при 340 nm. Върнете кюветата при 37°C. Повторете отчитането точно на всяка минута през следващите две минути.
7. Изчислете средната разлика в абсорбция на минута (Δ Abs/min).

КАЛИБРАЦИЯ

Изчислението на НВДН активността се основава на милимолярната абсорбция на NADH, която е 6.22 при 340 nm.

ИЗЧИСЛЕНИЯ

$$\text{IU/L} = \frac{\Delta\text{Abs}/\text{min} \times \text{TV} \times 1000}{6.22 \times \text{LP} \times \text{SV}} = \frac{\Delta\text{Abs}/\text{min} \times 1.040 \times 1000}{6.22 \times 1 \times 0.040} =$$

$$= \Delta\text{Abs}/\text{min} \times 4180$$

Където:

 Δ Abs/min = средна разлика в абсорбцията на минута

TV = общ обем на реакцията (1.040)

1000 = преизчисление на IU/ml в IU/L

6.22 = милимолярна абсорбтивност на NADH

LP = светлинен път (1cm)

SV = обем на пробата (0.040ml)

Пример: Ако Δ Abs/min = 0.063 то $0.063 \times 4180 = 263$ IU/L

Една единица НВДН активност се определя като количеството ензим, който катализира окисляването на 1 μ mol/L NADH на минута при условията на тази процедура.

ОГРАНИЧЕНИЯ

НВДН реагентът е линеен до 450 IU/L. За проби със стойности над това ниво, разреждете пробата 1:1 с изотоничен физиологичен разтвор и тествайте отново. Умножете получения резултат по две.

ФАКТОРИ ЗА ТЕМПЕРАТУРНА КОНВЕРСИЯ

Температура при отчитане	Фактор за конвертиране към		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1.00	1.19	1.37
30°C	0.84	1.00	1.15
37°C	0.73	0.87	1.00

ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ

111-199 IU/L при 30°C.

Препоръчително е всяка лаборатория да установи свой диапазон на очаквани стойности.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ТЕСТА

1. Линеиност: 450 IU/L.
2. Сравнения: Изследване, сравняващо настоящия метод с подобен метод даде при работа по мануална процедура коефициент на корелация 0.99 и уравнение на регресията $y = 1.13x + 7.4$, а при работа с автоматичен анализатор "Abbott VP" коефициент на корелация 0.99 и уравнение на регресията $y = 1.12x + 10.54$.
3. Чувствителност промяна в абсорбцията от 2.3×10^{-4} на минута е еквивалентна на ХБДХ активност от приблизително 1 IU/L.
4. Точност:

Мануална процедура при 37°C

	В серия		Между серии	
	Серум 1	Серум 2	Серум 1	Серум 2
Средна стойн. (IU/L)	64	323	67	325
Станд. откл. (IU/L)	2.7	4.3	3.2	4.9
C.V. (%)	4.3	1.3	4.8	1.5
Брой	20	20	20	20

Автоматична процедура при 37°C

	В серия		Между серии	
	Серум 1	Серум 2	Серум 1	Серум 2
Средна стойн. (IU/L)	65.5	328	65.7	328
Станд. откл. (IU/L)	1.7	3.7	3.1	3.7
C.V. (%)	2.6	1.1	4.8	1.1
Брой	22	22	20	20

REV:02/00

Производител: Teco Diagnostics, 1268 N. Lakeview Avenue, Anaheim, CA 92807 USA Tel. 714 693 7788 Fax: 714 693 3838

Вносител: "ЕТГ" ЕООД, София 1504, ул. Тракия №15, офис 1