

НАБОР

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ L-ЦИТРУЛЛИНА

K6600, L-Citrulline Kit

Каталог. № : K 6600

Методика от 29-04-2010

Количество : 96

Производитель: Immundiagnostik

AG (Германия)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Для диагностического использования в *in-vitro* диагностике

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный анализ предназначен для количественного определения L-цитруллина в моче. Только для диагностики In-Vitro.

2. ВВЕДЕНИЕ

Оксид азота (NO) является внутри- и межклеточной сигнальной молекулой. Она реагирует со свободными радикалами, металлопротеинами и характерными аминокислотными остатками белка. NO играет важную роль в регуляции сосудистого тонуса. Эндотелиальный NO (eNO) производится эндотелием сосудов. Он диффундирует в соседние гладкомышечные клетки сосудов (VSMC), где NO активирует растворимый гуанилат циклазы (sGC), который впоследствии увеличивает производство внутриклеточного cGMP из GTP, и который, в свою очередь, вызывает расслабление гладких мышц и **расширение кровеносных сосудов**.

Таким образом, функциональные изменения эндотелия при ишемической болезни сердца могут быть важным фактором в развитии **спазма сосудов**, ишемии и тромбоза.

L-цитруллин в качестве суррогатного маркера NO

NO синтезируется в citrullin-NO-цикле, когда L-аргинин окисляется до цитруллина путем NO-синтазы (NOS). Во второй части цикла мочевины, аргинин повторно синтезируется из цитруллина. Формирование катализируемой формации NOS L-цитруллина и NO происходит в два этапа, в результате чего продукт стехиометрии L-цитруллина и NO составляет 1:1. Таким образом, превращение L-аргинина в L-цитруллин может быть использовано в качестве суррогатного маркера для NO синтеза.

Патологически высокие уровни цитруллина служат показателем нитрозативного стресса.

Показания

- Оценка активности NOS (NO производства)
- Обнаружение нитрозативного стресса из-за повышенного синтеза индуцибельного оксида азота (iNO)

3. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Кат. №	Содержание	Компоненты набора	Кол-во
K6600F	PREC	Осадочный реагент	1 x 10 мл
K6600ST	STD	Концентрат Стандарта (40 ммоль/л L-цитруллина)	1 x 50 мкл
K6600VP	STDBUF	Буфер для разведения стандарта	1 x 20 мл
K6600LA	SOL A	Раствор А	1 x 10 мл
K6600LB	SOL B	Раствор В	1 x 40 мл
K6600MTP	PLATE	Микропланшет	2 x
K6600PVP	SAMDIL	Буфер для разведения образцов, лиофилизированный	1 x 4,5 мл
K6600KO1	CTRL	Контроль, готов к использованию	2 x 200 мкл
K6600KO2	CTRL	Контроль, готов к использованию	2 x 200 мкл

4. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Бидистиллированная вода (аква-бидистиллированная)
- Прецизионные пипетки и одноразовые наконечники 10-1000 мкл
- Многоканальный дозатор или повторный дозатор
- Охлаждающая центрифуга со способностью 20000 x g
- Мешалка Vortex
- Инкубатор с подогревом 90 °C
- Стандартные лабораторные стеклянные или пластиковые флаконы, пробирки и т.д.

- Микропланшетный ридер при 540 нм
- Водяная баня 37 °C

5. ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Воспроизвести **SAMDIL** (буфер для разведения образца) с 4,5 мл деионизированной воды, аккуратно перемешать, позволить содержимому флакона раствориться в течение **5 минут** при комнатной температуре и снова перемешать. Хранить восстановленный образец (SAMDIL) при температуре -20 °C. Использовать его в течение недели. Избегать оттаивания и замораживания несколько раз.

Подготовка Стандартной кривой

Подготовить из основного раствора L-цитруллина (**STD**) стандартную кривую в соответствии со следующей схемой:

Стандарт 1 (400 мкмоль/л): разбавить основной раствор L-цитруллина (STD) (40 ммоль/л) 1:100 со стандартным буфером разбавления (STDBUF)

Стандарт 2 (200 мкмоль/л):	Стандарт 1 1:2 разбавленный с STDBUF
Стандарт 3 (100 мкмоль/л):	Стандарт 2 1:2 разбавленный с STDBUF
Стандарт 4 (100 мкмоль/л):	Стандарт 3 1:2 разбавленный с STDBUF
Стандарт 5 (100 мкмоль/л):	Стандарт 4 1:2 разбавленный с STDBUF
Стандарт 6 (100 мкмоль/л):	Стандарт 5 1:2 разбавленный с STDBUF
Стандарт 7 (100 мкмоль/л):	Стандарт 6 1:2 разбавленный с STDBUF

Для **Стандарта 8** используется буфер разведения стандартов.

- **Подготовка цветового раствора**
- Смешайте 1 часть раствора А (SOL A) с 3 частями раствора В (SOL B). (Приготовьте свежий цветовой раствор для каждого анализа, потому что он устойчив только около 30 минут). Хранить SOL A и SOL B при температуре 2-8 °C и привести к комнатной температуре перед использованием.
- **STD** (основной раствор L-цитруллина), **CTRL** (контроли) и **SAMDIL** (буфер для разведения образцов) следует хранить при температуре от -20 °C до использования.
- Все другие реагенты теста готовы к использованию. Тестовые реагенты стабильны до окончания срока годности (см. этикетку тестового пакета) при температуре **2-8 °C**.

6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

- Внесите 500 мкл образца в 1,5 мл реакционный флакон
- Добавить 100 мкл восстановленного буфера (SAMDIL) к образцу
- Тщательно перемешать
- Инкубировать в течение 1 часа при 37 °C
- Добавить 150 мкл холодного (2-8 °C) осадочного реагента (PREC)
- Тщательно перемешать
- Инкубировать в течение 30 мин при температуре 2-8 °C
- Центрифугировать в течение 10 мин при 20,000 x g и 4 °C
- Использовать супернатант в тестировании

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Принцип теста

После предварительной обработки образца для устранения интерферирующих веществ, к образцу добавляется развивающийся раствор, состоящий из двух компонентов. Цвет меняется на интенсивный красный в связи с реакцией L-Цитруллина с DAMO. Интерференция побочных продуктов реакции снижается при помощи TSC.

Интенсивность окраски пропорциональна концентрации анализируемого вещества. Поглощение измеряется при 540 нм с контрольным фильтром при 620 нм. Концентрация образцов оценивается с помощью калибровочной кривой. Для того, чтобы исключить влияние матрицы образца на поглощение, индивидуальный пустой образец должен быть запущен. Полученное пустое значение вычитается из результата образца.

Процедура теста

1. Приведите все реагенты и образцы к комнатной температуре (18-26 °C) и смешайте хорошо
2. Отметьте позиции STD/CTRL/SAMPLE (Стандарт/Контроль/Образец) в двух экземплярах в протоколе
3. Внесите 2 x 60 мкл STD/CTRL (Стандарт/Контроль) на микропланшет (MTP) (2 лунки на стандарт/контроль; 60 мкл в каждой)
4. Внесите 4 x 60 мкл подготовленной пробы в MTP (4 лунки на

	образец; 60 мкл в каждой)
5.	Добавить 200 мкл цветового раствора во все стандартные лунки и в 2 лунки образцов
6.	Добавить 200 мкл SOL B в 2 оставшиеся лунки образцов (эти без цветового раствора) (пустой образец)
7.	Накрыть микропланшетные полоски и поместить в металлический держатель, предварительно нагретый 90 °С
8.	Инкубировать при 90 °С в течение 15 минут
9.	Извлечь микропланшетные полоски из нагревателя и поместить в оригинальный держатель
10.	Дайте остыть до комнатной температуры в течение 10 минут (Образцы стабильны в течение ок. 30 минут)
11.	Считайте поглощение с ИФА – считывающее устройство при 540 нм



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

Окончательная концентрация L-цитруллина в мкмоль/л рассчитывается как разница между концентрацией образца с цветовым решением и концентрацией образца бланка (образца с SOL B), умноженного на 1,5.

$L\text{-цитруллин [мкмоль/л]} = ([\text{измеренное содержание}] - [\text{измеренное содержание бланка}]) * 1,5$

9. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контрольные образцы должны быть проанализированы при каждом тестировании. Результаты, полученные при анализе контрольных проб, должны быть оценены на приемлемость использования соответствующих статистических методов. Результаты образцов пациента могут считаться недействительным, если в течение одного и того же анализа одно или несколько значений контроля качества образца находятся вне допустимых пределов.

Ожидаемые значения

Нормальный диапазон

Мы рекомендуем каждой лаборатории установить свой собственный нормальный диапазон концентрации.

10. МЕРЫ

- Только для использования в In-Vitro диагностике.
- Руководящие принципы контроля качества должны быть соблюдены.
- Раствор B (SOL B) содержит сильную кислоту; обращаться с ним с осторожностью. Может вызвать ожоги; использовать перчатки, защитную одежду и очки. Любое разливание должно быть немедленно устранено с большим количеством воды.

11. ТЕХНИЧЕСКИЕ СОВЕТЫ

- Не смешивайте компоненты из разных наборов и партий.
- Не использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Для обеспечения точности результатов необходимо плотное герметичное соединение пластин во время инкубации.
- Избегайте вспенивания при смешивании реагентов.
- Анализ всегда должен быть выполнен в соответствии с прилагаемым руководством.

12. ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ ТЕСТИРОВАНИЯ

- Данный анализ был подготовлен и распространен в соответствии с руководящими принципами IVD 98/79/EC.
- Все реагенты в комплекте набора предназначены только для использования в In-Vitro диагностике.
- Руководящие принципы для медицинских лабораторий должны быть соблюдены.
- Время инкубации, температура инкубации и объемы пипетирования компонентов определяются производителем. Любое изменение процедуры теста, не согласованное с производителем, может повлиять на результаты теста. Immundiagnostik AG в таком случае не несет ответственности за любой ущерб в результате не правильного использования.
- Претензии и жалобы в отношении недостатков должны быть предъявлены в течение 14 дней после получения товара. Продукт должен быть отправлен компании Immundiagnostik AG наряду с письменной жалобой.