



Adrenalin ELISA

Адреналин

Иммуноферментный набор для *in vitro* количественного определения адреналина в человеческой плазме крови и моче (ручной и автоматический ИФА метод)

Версия 2014-12

Замечание от ЗАО «БиоХимМак»

Уважаемые коллеги! Русская версия инструкции переведена с английского варианта. Обратите внимание на соответствие номера и даты версии английской инструкции, вложенной в набор, с русским переводом. Если версии на русском и на английском языках не совпадают, обратитесь в ЗАО «БиоХимМак» за исправленным русским вариантом или используйте инструкцию на английском языке.

1. Назначение

Данный набор фирмы IBL содержит реагенты для *in vitro* диагностического количественного определения адреналина в человеческой плазме крови или моче ручным или автоматизированным методом.

2. Введение

Катехоламины адреналин, норадреналин и дофамин синтезируются в мозговом веществе надпочечников, в симпатической нервной системе и в мозге. Они оказывают влияние фактически во всех тканях, и, совместно с другими гормональными или неврональными факторами вовлечены в регуляцию широкого спектра физиологических процессов.

Так как при различных заболеваниях катехоламины и их метаболиты метанефрин и норметанефрин секретируются в повышенных количествах, определение их концентраций может быть использовано в целях диагностики и мониторинга течения опухолевых заболеваний нервной системы, главным образом феохромоцитом, а также нейроblastом и ганглионевром.

Так как на первой стадии определения применяют процедуру экстракции, для анализа могут быть использованы образцы соответствующих биологических жидкостей любых животных. С помощью этого набора можно анализировать образцы, взятые у крыс, кроликов, мышей, коз, лошадей, собак, свиней и других животных. Химическая структура катехоламинов идентична у всех видов животных.

3. Принцип метода

Данный набор **Adrenalin ELISA** основан на твердофазном иммуно-ферментном анализе (ELISA), с использованием «сэндвич»-метода. Лунки микропланшета покрыты козьими анти-кроличьими антителами, специфическими к эпитопу на молекуле антигена. В процессе инкубации антиген, присутствующий в образце, связывается одним сайтом с антителами, сорбированными в лунках микропланшета и другим – с антителами к другому эпитопу антигена, конъюгированными с ферментом (E-Ab). После реакции с субстратом интенсивность развившегося окрашивания пропорциональна количеству антигена, присутствующего в образце. Количество антигена может быть вычислено непосредственно из калибровочной кривой.

4. Меры предосторожности

1. Набор предназначен только для диагностики *in-vitro* и только для профессионального использования.
2. Перед началом анализа полностью и тщательно прочитайте данную инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции. Убедитесь, что вы полностью поняли инструкцию.
3. В случае серьезного повреждения упаковки тест-набора, пожалуйста, свяжитесь с IBL или поставщиком в письменной форме, в течение одной недели после получения тест-набора. Не используйте поврежденные компоненты тест-набора при проведении анализа, но храните в безопасном месте для урегулирования жалоб.
4. Учитывайте лот набора и срок его годности. Не смешивайте реагенты из разных лотов. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
5. При работе с образцами и реагентами соблюдайте принципы «надлежащей лабораторной практики». Пользуйтесь защитной лабораторной одеждой, резиновыми или латексными перчатками для защиты рук.
6. Реагенты набора содержат материалы, которые могут быть причиной раздражения кожи и слизистых оболочек. Более подробная информация представлена на сайте производителя IBL International.
7. Со всеми реагентами необходимо обращаться как с потенциально биологически опасными материалами, соблюдая все правила техники безопасности.
8. Утилизация использованных реагентов должна проводиться в соответствии с национальными требованиями по работе с биологически опасными отходами.
9. Избегайте контакта со стоп - раствором, содержащим 1 M NaOH. Может быть причиной раздражения, ожога кожи и слизистых оболочек.
10. Набор содержит материалы человеческого и/или животного происхождения. Источники человеческой сыворотки были протестированы методами, одобренными FDA, на содержание поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антителам к вирусу гепатита С (HCV), вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 (HIV), и для всех тестов были получены отрицательные результаты. Так как ни один из известных тестов не гарантирует полностью отсутствие инфекционных агентов, со всеми компонентами, содержащими материалы человеческого происхождения, и образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами.

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Набор транспортируется при температуре окружающей среды и должен храниться при температуре 2-8°C. Предохраняйте от воздействия прямых солнечных лучей и нагревания. Хранение и стабильность образцов и готовых реагентов описана в соответствующих главах.

Микропланшет стабилен после вскрытия пакета вплоть до указанного срока годности. Убедитесь в том, что вскрытый пакет плотно закрыт и хранится при температуре 2-8°

6. Сбор и Хранение Образцов

	<p><i>In-vivo</i> секреция катехоламинов и метанефринов зависит от употребления различных продуктов питания и лекарственных препаратов, таких, как, например, витамин В и кофе, бананы, α-метилдопа, ингибиторы МАО и СОМТ, а также лекарственные препараты, применяемые при гипертензии, должны быть исключены не менее чем за 72 часа перед сбором образцов.</p>
--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Образцы плазмы (ЭДТА):

	Образцы крови должны храниться при 2-8°C до центрифугирования и отделения плазмы и не дольше, чем 2 часа после сбора крови.		
При взятии крови из вены соблюдайте все необходимые меры предосторожности, избегайте химического загрязнения образцов, с момента забора крови и до начала анализа. Не используйте сильно гемолизованные, иктеричные или липемичные образцы. Мутные образцы должны быть центрифугированы перед анализом для удаления содержащихся частиц.			
Хранение:	2-8°C	≤ -20°C (Аликвоты)	Предохраняйте от воздействия прямых солнечных лучей, нагревания, повторных циклов замораживания - оттаивания, перевозите образцы в замороженном виде.
Стабильность:	6 часов	1 месяц	

Образцы мочи:

Можно использовать как спонтанную, так и мочу, собранную в течение 24 часов. Общий объем мочи, выделенной в течение 24 часов, должен быть собран и смешан в один образец в бутылки, содержащей 10 - 15 мл 6 N HCl в качестве консерванта. Для подсчета результатов необходимо определить общий объем. Перемешайте и центрифугируйте образцы перед тестированием.			
Хранение:	≤ -20°C (Аликвоты)	Предохраняйте от воздействия прямых солнечных лучей, нагревания, повторных циклов замораживания - оттаивания.	
Стабильность:	6 месяцев		

7. Состав набора:

	Реагентов, поставляемых в данном наборе, достаточно для выполнения 48 (6 стандартов, 2 контроля и 40 образцов) единичных определений с экстракцией и до 48 повторных определений либо адреналина, либо норадреналина в плазме и моче. Дополнительные реагенты можно заказать отдельно.
-------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Количество	Обозначение	Компонент
1 x 12 x 8	MTP	Микропланшет. Отдельные стрипы, покрытые козьими поликлональными анти-кроличьими IgG-антителами.
1 x 6 x 2.5 мл	CAL A-F	Стандарты A-F Адреналин: 0; 1.5; 5.0; 15; 50; 150 нг/мл (0; 8; 27; 82; 273; 819 нмоль/л) Норадреналин: 0; 5.0; 15; 50; 150; 500 нг/мл (0; 30; 89; 296; 887; 2955 нмоль/л) Дофамин: 0; 60; 180; 585; 2300; 11470 нг/мл (0; 392; 1175; 3819; 15014; 74876 нмоль/л) Готовы к использованию. Содержат биологически активный адреналин [-], [-] норадреналин и [-] дофамин в 0.1 M HCl.
1 x 2 x 2.5 мл	CONTROL 1+2	Контроли 1+2 Готовы к использованию. Содержат биологически активный адреналин [-], [-] норадреналин и [-] дофамин в 0.1 M HCl. Концентрации/допустимый диапазон указан в сертификате контроля качества.
1 x 400 мкл	ENZCONJ	Ферментный конъюгат,

	CONC	концентрат (50x) Антитела, конъюгированные со щелочной фосфатазой в Трис буфере, HCl, 0.01% NaN ₃ .
2 x	EXTRPLATE	Планшет для экстракции (Макропланшет) По 24 лунки каждая. Покрыты боронат-афинным гелем.
1 x 60 мл	EXTRBUF	Буфер для экстракции Окрашен в розовый цвет. Готов к использованию. Содержит 0.016% NaN ₃ .
2 x 1.25 мл	COMT LYO	COMT, лиофилированная. Содержит: Катехол-О-метилтрансфераза из печени свиньи, NaN ₃ .
2 x 1.25 мл	COENZ	Раствор коэнзима. Готов к использованию. S-аденозил-L-метионин с добавлением стабилизаторов.
1 x 3 мл	ENZBUF	Ферментный буфер Готов к использованию. Содержит: Трис буфер, HCl, стабилизаторы.
2 x 13 мл	RELEASEBUF	Релизинг-буфер Окрашен в желтый цвет. Готов к использованию. Содержит 0.1 M HCl, индикатор.
1 x 3 мл	ACYLREAG	Реагент для ацилирования Готов к использованию. Содержит диметилформамид и этанол. Внимание! Токсичный и легко воспламеняемый реагент.
1 x 100 мл	WASHBUF CONC	Буфер для промывок, концентрат (10x) Содержит: Трис буфер, HCl, Твин и 0.2% NaN ₃ .
1 x 2 мл	COMT ADD	COMT дополнение Содержит человеческую плазму, стабилизаторы, 0.01% тимерозал.
1 x 8.0 мл	ANTISERUM AD	Антисыворотка к адреналину, окрашена в зеленый цвет, содержит кроличьи антитела к адреналину, буфер, стабилизаторы.
1 x 25 x	PNPP SUBS	Раствор PNPP субстрата, Готов к использованию. Содержит р-нитрофенил фосфат (PNPP).
1 x 15 мл	PNPP STOP	PNPP Стоп-раствор Готов к использованию. Содержит 1 M NaOH, 0.25 M ЭДТА.
3 x	FOIL	Адгезивная пленка

8. Необходимые материалы, не поставляемые с набором:

1. Автоматические пипетки обеспечивающие дозирование растворов по 10, 50, 100 и 1000 мкл, например, Multipette фирмы Eppendorf или другие подобные приспособления, обеспечивающие дозирование с погрешностью менее 3%.
2. Орбитальный шейкер (200 - 900 об/мин) (например, EAS 2/4, SLT).
3. Встряхиватель типа Вортекс.
4. 8-канальный микродозатор с емкостью для реагентов.
5. Автоматическое или полуавтоматическое промывочное устройство, емкость для промывочного буфера.
6. Фотометр для микропланшетов (ELISA ридер) с фильтром на 450 нм (и референсным фильтром 600-650 нм).
7. Бидистиллированная или деионизированная вода
8. Бумажные салфетки, одноразовые наконечники, таймер.

9. Одноразовые пробирки для разведения образцов.
10. 0,1 M HCl для разведения образцов (моча).

9. Замечания по процедуре метода:

1. Любое несоответствующее обращение с образцами или какое-либо изменение процедуры анализа может повлиять на результаты. Указанные для пипетирования объемы, время инкубаций, температура и шаги, которые необходимо произвести до начала анализа, должны быть выполнены в точности, как это описано в данной инструкции. Используйте только калиброванные пипетки и оборудование.
2. После начала анализа все этапы должны выполняться без перерывов. Убедитесь, что приготовлены все необходимые реагенты, образцы и оборудование находится в рабочем состоянии и готово к использованию. Все реагенты должны достичь комнатной температуры перед использованием (18-25 °C). Аккуратно вращая, перемешайте каждую пробирку и каждый флакон с жидким реагентом или образцом перед анализом. Перемешивайте реагенты, избегая образования пены.
3. Не допускайте контаминации реагентов, пипеток, лунок и пробирок. Используйте новый одноразовый наконечник для каждого реагента, стандарта и образца. Не меняйте крышки флаконов. Всегда закрывайте не используемые флаконы. Не используйте повторно реагенты, пробирки и лунки.
4. Некоторые компоненты набора содержат ≤ 250 мкл реагента. Перед вскрытием убедитесь в том, что весь реагент полностью находится на дне флакона.
5. Рекомендуется производить анализ образцов в дублях, для исключения потенциальной ошибки пипетирования.
6. Используйте схему пипетирования для контроля соответствующего плана анализа.
7. Время инкубации влияет на результаты. Все лунки должны обрабатываться в одной последовательности, с одинаковой скоростью. Рекомендуется использовать 8-канальную пипетку для внесения растворов в лунки.
8. Промывка лунок – это очень важный этап. Неполная промывка негативно влияет на точность результатов. Для промывок рекомендуется использовать многоканальную пипетку или автоматическую промывающую систему. Не допускайте высыхания ячеек между инкубациями. Не царапайте лунки во время внесения или аспирации растворов. Вносите и удаляйте растворы аккуратно. При промывках следите, чтобы все лунки заполнялись промывочным буфером, а затем промывочный буфер полностью удалялся из лунок.
9. Влажность влияет на пробирки и покрытые лунки. Не открывайте пакет с микропланшетными стрипами, пока он не достигнет комнатной температуры. Не использованные стрипы немедленно верните обратно в пакет с осушителем и тщательно закройте.

10. Ручной метод анализа

10.1. ИНСТРУКЦИЯ ПО УСТАНОВКАМ ПЕРЕД АНАЛИЗОМ

Содержимое набора для 96 определений можно разделить на 2 отдельные серии анализов.



Видимое количество геля может быть удалено с поверхности микропланшета для экстракции при экстракции. Это не влияет на результаты анализа.



В любом случае, следует избегать загрязнения воздуха пероксидами, содержащимися в дезинфицирующих средствах для очистки поверхностей или оборудования, используемых в качестве порошка или растворов, например Virkon®. Это будет сильно влиять на точность результатов анализа. Virkon® является торговой маркой компании DuPont.

10.1.1 Разведение образцов.

Все образцы, в которых предполагаемая концентрация аналита выше, чем самый высокий стандарт, должны быть разведены следующим образом:

Образец	Должен быть разведен	Разведение в	Замечания
Плазма	> самый высокий стандарт	Бидистиллированной воде	Перед этапом экстракции
Моча	> самый высокий стандарт	0.1 N HCl	Перед этапом экстракции

10.1.2 Процедура экстракции образцов, стандартов и контролей (на планшете для экстракции) (мануальный метод):

1.	Внесите по 20 мкл каждого стандарта, разведенного контроля и разведенного образца мочи и по 500 мкл каждого образца плазмы в соответствующие лунки микропланшета для экстракции. Внесите по 500 мкл бидистиллированной воды во все лунки, за исключением лунок, содержащих плазму, для коррекции разницы в объемах.
2.	Внесите по 1 мл буфера для экстракции в каждую лунку.
3.	Закройте микропланшет адгезивной пленкой. Экстрагируйте в течение 30 минут при комнатной температуре (18 – 25°C) на шейкере (600–900 об/мин). Во время экстракции поверхность жидкости может увлажнять адгезивную пленку, но уровень жидкости не должен быть выше 2/3 лунки. Разбрызгивание не влияет на результаты.
4.	Удалите адгезивную пленку. Немедленно слейте жидкость из лунок и удалите остаток жидкости на фильтровальную бумагу.
5.	Внесите по 2 мл бидистиллированной воды во все лунки.
6.	Закройте микропланшет новой адгезивной пленкой, встряхивайте 5 минут при комнатной температуре (18 – 25°C) на шейкере (600–900 об/мин). Разбрызгивание не влияет на результаты.
7.	Удалите адгезивную пленку. Немедленно слейте жидкость из лунок и удалите остаток жидкости на фильтровальную бумагу. Полностью удалите остаток жидкости.
8.	Внесите по 150 мкл буфера для экстракции в каждую лунку. Немедленно после этого внесите по 50 мкл Реагента для ацилирования в каждую лунку. Перемешайте сразу же после внесения реагента.
9.	Экстрагируйте в течение 20 минут при комнатной температуре (18 – 25°C) на шейкере (400–600 об/мин).
10.	Удалите адгезивную пленку. Немедленно слейте жидкость из лунок и удалите остаток жидкости на фильтровальную бумагу. Полностью удалите остаток жидкости.
11.	Внесите по 2 мл бидистиллированной воды во все лунки.
12.	Закройте микропланшет новой адгезивной пленкой, встряхивайте 5 минут при комнатной температуре (18 – 25°C) на шейкере (600–900 об/мин). Разбрызгивание не влияет на результаты.
13.	Удалите адгезивную пленку. Немедленно слейте жидкость из лунок и удалите остаток жидкости на фильтровальную бумагу. Полностью удалите остаток жидкости.
14.	Внесите по 300 мкл релизинг-буфера в каждую лунку
15.	Встряхивайте 30 минут при комнатной температуре (18 – 25°C) на шейкере (400–600 об/мин).

Приготовленные образцы желательно тестировать в тот же день. Если это невозможно, образцы могут храниться в течение ночи в микропланшете для экстракции, закрытом адгезивной пленкой, при температуре 2-8°C.

лунок для адреналина и норадреналина.

10.2.2.1 Общие рекомендации по использованию для анализа тканевых гомогенатов и супернатантов клеточных культур

Работа с супернатантами клеточных культур зависит от матрикса, а также от ожидаемой концентрации:

В соответствии с протоколом анализа мочи (экстракция минимум 20 мкл супернатанта) ожидаемая чувствительность для адреналина – 0,3 нг/мл. В случае матрикса с добавлением сыворотки (FCS), можно использовать протокол анализа плазмы (экстракция минимум 500 мкл супернатанта) с чувствительностью, соответствующей протоколу для плазмы (см. «Характеристики метода»).

В случае тканевых гомогенатов нельзя использовать для гомогенизации хлорную кислоту. Более подробную информацию запрашивайте у производителя IBL.

10.1.3 Подготовка концентрированных реагентов набора

Объемов, указанных ниже, достаточно для проведения анализа в 6 стрипах (48 определений).

развести/растворитель	Компонент	Объем	В	Соотношение	замечания	Хранение	Стабильность
25 мл	Буфер для промывок	225 мл	Бидист. вода	1:10	Тщательно перемешать	2-8°C	4 недели
120 мкл	Ферментный конъюгат	6 мл	Разведенный буфер для промывки	1:51	Приготовить свежий и использовать только для текущей постановки.	18-25°C	5 часов

10.2 Процедура анализа (мануальный метод).

10.2.1 Подготовка Раствора Фермента (СОМТ)

	Раствор Фермента необходимо готовить непосредственно перед анализом.
<p>Растворите каждый входящий в состав набора лиофилизированный СОМТ в 1.25 мл бидистиллированной воды и тщательно перемешайте растворенный СОМТ.*</p> <p>Внесите по 1.25 мл раствора коэнзима, а затем 1.25 мл ферментного буфера и 0.40 мл СОМТ дополнения в каждую пробирку с разведенным СОМТ до конечного объема 4.15 мл ферментного раствора СОМТ на одну пробирку.</p> <p>Одной пробирки с разведенным СОМТ достаточно для 48 определений адреналина. Если проводится измерение адреналина и норадреналина, пулируйте два (2) флакона для 48 определений адреналина и 48 определений норадреналина. Раствор может быть слегка мутным. При перемешивании не допускайте образования пены. Раствор стабилен при комнатной температуре в течение 1 часа.</p>	

* - Если необходима только часть раствора СОМТ, возьмите необходимую часть СОМТ из пробирки. Оставшийся раствор СОМТ должен быть немедленно алиquotирован и заморожен -20°C Раствор СОМТ при этих условиях будет стабильным в течение 1-2 месяцев.

10.2.2. Ферментативная дериватизация образцов, стандартов и контролей (на микропланшете)

	<p>При одновременном измерении адреналина и норадреналина рекомендуется начинать с определения адреналина.</p> <p>При обратной технике пипетирования возвращайте оставшуюся в наконечнике пипетки жидкость в соответствующую лунку экстракционного планшета, так как в противном случае оставшегося количества экстракта может оказаться недостаточно для определения норадреналина.</p> <p>Удобно держать экстракционный планшет слегка наклонным.</p> <p>Перед использованием микропланшетов, определите и пометьте необходимое количество</p>
-------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

10.2.3. Адреналин в моче и плазме

1.	Внесите по 75 мкл свежеприготовленного ферментного раствора СОМТ в каждую лунку микропланшета . Немного встряхните.
2.	Внесите по 100 мкл каждого экстрагированного стандарта, контроля и образца в соответствующие лунки. Окрасивание поменяется на розовое. Немного встряхните.
3.	Внесите по 50 мкл антисыворотки к адреналину (зеленого цвета) в каждую лунку
4.	Закройте микропланшет адгезивной пленкой. Инкубируйте в течение 120 минут при комнатной температуре (18-25°C) на шейкере (400–600 об/мин).
5.	Снимите адгезивную пленку, удалите раствор из лунок, промойте лунки микропланшета 4 раза по 250 – 300 мкл разведенного буфера для промывок . Удалите остатки буфера, перевернув микропланшет и постукав им по фильтровальной бумаге.
6.	Внесите по 100 мкл свежеприготовленного ферментного конъюгата в каждую лунку.
7.	Закройте микропланшет новой адгезивной пленкой. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре (18-25°C) на орбитальном шейкере (400–600 об/мин)
8.	Снимите адгезивную пленку, удалите раствор из лунок, промойте лунки микропланшета 4 раза по 250 – 300 мкл разведенного буфера для промывок . Удалите остатки буфера, перевернув микропланшет и постукав им по фильтровальной бумаге
9.	При внесении субстрата и стоп-раствора, если возможно, используйте 8-ми канальную пипетку. Вносите реагенты в лунки в одинаковом порядке и с одинаковой скоростью. Используйте технику обратного пипетирования. Не допускайте образования пузырей при внесении реагентов.
10.	Внесите по 200 мкл свежеприготовленного раствора PNPP субстрата в каждую лунку.
11.	Инкубируйте (без адгезивной пленки) 40 минут при комнатной температуре (18-25°C) на орбитальном шейкере (400–600 об/мин)
12.	Остановите реакцию внесением 50 мкл PNPP стоп-раствора в каждую лунку. Аккуратно перемешайте содержимое лунок, аккуратно покачивая микропланшет.
13.	Измерьте оптическую плотность с помощью фотометра при 405 нм (длина волны сравнения 620-650 нм) в течение 60 минут после добавления стоп-раствора. При измерении в лунках не должно быть пузырей.

11. Автоматизированный метод тестирования .

11.1. ИНСТРУКЦИЯ ПО УСТАНОВКАМ ПЕРЕД АНАЛИЗОМ

Содержимое набора для 96 определений можно разделить на 2 отдельных анализа.



Видимое количество геля может быть удалено с поверхности микропланшета для экстракции при экстракции. Это не влияет на результаты анализа.



В любом случае, следует избегать загрязнения воздуха пероксидами, содержащимися в дезинфицирующих средствах для очистки поверхностей или оборудования, используемых в качестве порошка или растворов, например Virkon®. Это будет сильно влиять на точность результатов анализа. Virkon® является торговой маркой компании DuPont.

11.1.1 Разведение образцов.

Все образцы, в которых предполагаемая концентрация аналита выше, чем самый высокий стандарт, должны быть разведены следующим образом:

Образец	Должен быть разведен	Разведение в	Замечания
Плазма	> самый высокий стандарт	Бидистиллированной воде	Перед этапом экстракции
Моча	> самый высокий стандарт	0.1 N HCl	Перед этапом экстракции

11.1.2 Процедура экстракции образцов, стандартов и контролей (на планшете для экстракции) (автоматизированная процедура):

1.	Внесите по 30 мкл каждого стандарта, разведенного контроля и разведенного образца мочи и по 750 мкл каждого образца плазмы в соответствующие лунку микропланшета для экстракции. Внесите по 750 мкл бидистиллированной воды во все лунки, за исключением лунок, содержащих плазму, для коррекции разницы в объемах.
2.	Внесите по 1 мл буфера для экстракции в каждую лунку.
3.	Закройте микропланшет адгезивной пленкой. Экстрагируйте в течение 30 минут при комнатной температуре (18 – 25°C) на шейкере (600 – 900 об/мин). Во время экстракции поверхность жидкости может увлажнять адгезивную пленку, но уровень жидкости не должен быть выше 2/3 лунки. Разбрызгивание не влияет на результаты.
4.	Удалите адгезивную пленку. Немедленно слейте жидкость из лунок и удалите остаток жидкости на фильтровальную бумагу.
5.	Внесите по 2 мл бидистиллированной воды во все лунки.
6.	Закройте микропланшет новой адгезивной пленкой, встряхивайте 5 минут при комнатной температуре (18 – 25°C) на шейкере (600 – 900 об/мин). Разбрызгивание не влияет на результаты.
7.	Удалите адгезивную пленку. Немедленно слейте жидкость из лунок и удалите остаток жидкости на фильтровальную бумагу. Полностью удалите остаток жидкости.
8.	Внесите по 150 мкл буфера для экстракции в каждую лунку. Немедленно после этого внесите по 50 мкл Реагента для ацилирования в каждую лунку. Перемешайте сразу же после внесения реагента.
9.	Экстрагируйте в течение 20 минут при комнатной температуре (18 – 25°C) на орбитальном шейкере (400 – 600 об/мин).
10.	Немедленно слейте жидкость из лунок и удалите остаток жидкости на фильтровальную бумагу. Полностью удалите остаток жидкости.
11.	Внесите по 2 мл бидистиллированной воды во все лунки.

12.	Закройте микропланшет новой адгезивной пленкой, встряхивайте 5 минут при комнатной температуре (18 – 25°C) на шейкере (600 – 900 об/мин). Разбрызгивание не влияет на результаты.
13.	Удалите адгезивную пленку. Немедленно слейте жидкость из лунок и удалите остаток жидкости на фильтровальную бумагу. Полностью удалите остаток жидкости.
14.	Внесите по 450 мкл релизинг - буфера в каждую лунку
15.	Встряхивайте 30 минут при комнатной температуре (18 – 25°C) (без адгезивной пленки) на орбитальном шейкере (400 – 600 об/мин).

Приготовленные образцы желательно тестировать в тот же день. Если это не возможно, образцы могут храниться в течение ночи в планшете для экстракции, закрытом адгезивной пленкой, при температуре 2-8°C.

11.1.3 Приготовление концентрированных реагентов набора (автоматизированная процедура):

Объемов, указанных ниже, достаточно для проведения анализа в 6 стрипах (48 определений).

развести/растворить	Компонент	Объем	В	Соотношение	замечания	Хранение	Стабильность
50 мл	Буфер для промывок	450 мл	Бидист. вода	1:10	Тщательно перемешать	2-8°C	4 недели
190 мкл	Ферментный конъюгат	9.5 мл	Разведенный буфер для промывок	1:51	Приготовить свежий и использовать только для текущей постановки.	18-25°C	5 часов

11.2 Процедура анализа (автоматизированный метод).

11.2.1 Приготовление Раствора Фермента (COMT)

	Раствор Фермента необходимо готовить непосредственно перед анализом.
<p>Растворите каждый входящий в состав набора лиофилизированный COMT в 1.25 мл бидистиллированной воды и тщательно перемешайте растворенный COMT.* Внесите по 1.25 мл раствора коэнзима, а затем 1.25 мл ферментного буфера и 0.40 мл COMT дополнения в каждую пробирку с разведенным COMT до конечного объема 4.15 мл ферментного раствора COMT на одну пробирку. Одной пробирки с разведенным COMT достаточно для 48 определений адреналина. Если проводится измерение адреналина и норадреналина, пулируйте два (2) флакона для 48 определений адреналина и 48 определений норадреналина. Раствор может быть слегка мутным. При перемешивании не допускайте образования пены. Раствор стабилен при комнатной температуре в течение 1 часа.</p>	

* - Если необходима только часть раствора COMT, возьмите необходимую часть COMT из пробирки. Оставшийся раствор COMT должен быть немедленно аликвотирован и заморожен -20°C Раствор COMT при этих условиях будет стабильным в течение 1-2 месяцев

11.2.1.1 Общие рекомендации по использованию для анализа тканевых гомогенатов и супернатантов клеточных культур

Работа с супернатантами клеточных культур зависит от матрикса, а также от ожидаемой концентрации:

В соответствии с протоколом анализа мочи (экстракция минимум 20 мкл супернатанта) ожидаемая чувствительность

для адреналина – 0,3 нг/мл. В случае матрикса с добавлением сыворотки (FCS), можно использовать протокол анализа плазмы (экстракция минимум 500 мкл супернатанта) с чувствительностью, соответствующей протоколу для плазмы (см. «Характеристики метода»).

В случае тканевых гомогенатов нельзя использовать для гомогенизации хлорную кислоту. Более подробную информацию запрашивайте у производителя IBL.

11.2.2. Адреналин в моче и плазме

1.	Внесите по 75 мкл свежеприготовленного ферментного раствора СОМТ в каждую лунку микропланшета. Встряхните микропланшет 1 мин.
2.	Внесите по 100 мкл каждого экстрагированного стандарта, контроля и образца в соответствующие лунки. Окрашивание поменяется на розовое. Встряхните микропланшет 1 мин.
3.	Внесите по 50 мкл антисыворотки к адреналину (зеленого цвета) в каждую лунку
4.	Закройте микропланшет адгезивной пленкой. Инкубируйте в течение 120 минут при комнатной температуре (18-25°C) на орбитальном шейкере (400–600 об/мин).
5.	Удалите раствор из лунок, промойте лунка микропланшета 6 раз по 250 – 300 мкл разведенного буфера для промывок.
6.	Внесите по 100 мкл свежеприготовленного ферментного конъюгата в каждую лунку.
7.	Закройте микропланшет адгезивной пленкой. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре (18-25°C) на орбитальном шейкере (400–600 об/мин)
8.	Удалите раствор из лунок, промойте лунка микропланшета 6 раз по 250 – 300 мкл разведенного буфера для промывок.
9.	Вносите субстрат и стоп-раствор в одинаковом порядке и с одинаковой скоростью.
10.	Внесите по 200 мкл раствора PNPP субстрата в каждую лунку.
11.	Инкубируйте 40 минут при комнатной температуре (18-25°C) на орбитальном шейкере (400–600 об/мин). Если температура в автомате превышает 25°C, сократите время инкубации до 30 мин, чтобы избежать превышения сигнала.
12.	Остановите реакцию внесением 50 мкл PNPP стоп-раствора в каждую лунку. Аккуратно перемешайте содержимое лунок, аккуратно покачивая микропланшет.
13.	Измерьте оптическую плотность с помощью фотометра при 405 нм (длина волны сравнения 620-650 нм) в течение 60 минут после добавления стоп-раствора.

12. Контроль качества

Результаты анализа являются достоверными только в том случае, если были полностью соблюдены все этапы, описанные в данной инструкции. Кроме того, пользователи должны строго придерживаться правил безопасности и других соответствующих инструкций, установленных в лаборатории. Результаты измерений всех стандартов и контролей, поставляемых с набором, должны попадать в диапазоны допустимых значений, указанных на этикетках флаконов. Если данные критерии не выполнены, постановка считается не действительной и анализ должен быть выполнен еще раз. Каждая лаборатория должна использовать образцы с известными значениями в качестве дополнительного контроля. Рекомендуется участвовать в соответствующих программах внешнего контроля качества.

В случае каких-либо отклонений должны быть проверены следующие технические параметры:

- срок годности реагентов (приготовленных)

- условия хранения
- пипетки, оборудование
- условия инкубаций
- качество промывок.

13. Расчет результатов

Для получения калибровочной кривой используйте либо автоматический, либо ручной метод расчетов. Для ручного метода на полулогарифмической бумаге постройте график зависимости оптической плотности Стандартов (ось y, линейная шкала) от концентрации соответствующих Стандартов (ось x, логарифмическая шкала). При автоматических расчетах хорошее соответствие получается при использовании методов кубического сплайна, 4x параметрической регрессии или Logit-Log.

Для расчета стандартной кривой используйте каждое значение, полученное для стандартов.

Концентрацию аналитов в образцах мочи и Контролях из набора можно определить непосредственно из соответствующей калибровочной кривой. Так как для анализа Образцов плазмы используют 500 мкл (автоматизированная постановка: 750 мкл) вместо 20 мкл (автоматизированная постановка: 30 мкл), используемых для анализа Стандартов, результаты определения необходимо разделить на 25. Для выражения результатов в пг/мл умножьте полученные результаты на 1000.

В случае дополнительного разведения образцов, полученное в результате измерения значение необходимо умножить на коэффициент разведения.

Образцы, для которых были получены значения ОП, превышающие ОП наибольшего стандарта, должны быть разведены, как это описано в п. «ИНСТРУКЦИЯ ПО УСТАНОВКАМ ПЕРЕД АНАЛИЗОМ» и проанализированы еще раз.

Рассчитайте 24х часовую экскрецию для каждого образца мочи: мкг/24часа = мкг/л x л/24часа

Конверсия:

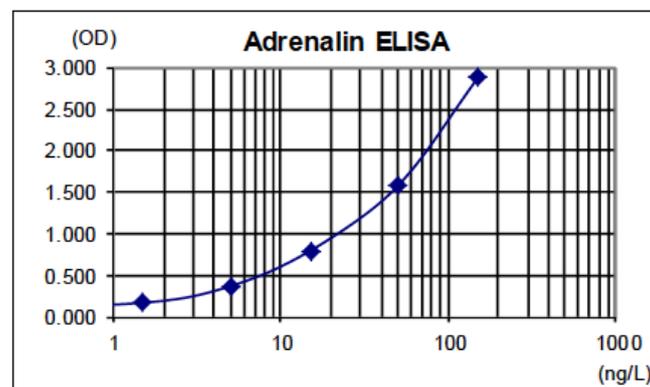
1000 пг/мл = 1 нг/мл

Адреналин (мкг/л) x 5.458 = нмоль/л

Типичная калибровочная кривая:

(Пример. Не используйте для реальных расчетов!)

Стандарт	адреналин, (нг/мл)	Среднее, ОП	ОП/ОПmax, (%)
A	0.0	0.088	3.1
B	1.5	0.167	5.8
C	5.0	0.368	12.8
D	15	0.796	27.6
E	50	1.579	54.8
F	150	2.881	100



14. Ожидаемые значения

Результаты анализа не могут сами по себе являться причиной для принятия терапевтических решений. Они должны соответствовать клинической картине и другим лабораторным тестам.

Для практически здоровых лиц получены следующие результаты (5%-95% перцентиль).

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила свой собственный диапазон нормальных значений.

	Моча		Плазма	
	мкг/24 часа	нмоль/24 часа	пг/мл	нмоль/л
адреналин	< 20	< 110	< 125	< 0.68

15. Ограничения метода

Процедура сбора образцов оказывает значительное влияние на результаты теста (См. п. «Сбор и Хранение Образцов»)

Данные о перекрестной реактивности приведены в разделе «Характеристики метода»

Нижеперечисленные компоненты крови не оказывали значительного эффекта (+/- 20 % от ожидаемого) на результаты тестирования вплоть до указанных концентраций:

Гемоглобин	2.0 мг/мл
Билирубин	1.0 мг/мл
Триглицериды	91 мг/мл

16. Характеристики метода

Аналитическая специфичность (перекрестная реактивность)	Вещество	адреналин	% перекрестной реактивности с другими тестированными веществами < 0.4 %
	Адреналин	100	
	Норадреналин	< 0.4	
	Метанефрин	< 0.1	
	Норметанефрин	< 0.1	

Аналитическая чувствительность (лимит детекции)	Моча	0.2 нг/мл	Среднее значение нулевого стандарта + 2SD
	Плазма	8 пг/мл	

Точность			Диапазон (нг/мл)	CV (%)
	Внутри серии	Моча		5.0 – 64.3
Плазма			0.046 – 1.060	6.8
Между сериями	Моча		5.2 – 74.5	12.1
	Плазма		0.051 – 0.979	15.2

Линейность			Диапазон (нг/мл)	Серийные разведения	Диапазон (%)
	Моча		2.7 - 114.6	1:32	85 - 10
	Плазма		0.002 – 0.837	1:32	76 - 120

Эффект насыщения при высоких концентрациях не наблюдался.

Извлечение			Среднее (%)	Диапазон (%)	% Извлечения после насыщения
	Моча		95.0	85 – 106	
	Плазма		100.0	85 – 120	

Сравнение методов (данный метод и HPLC)	IBL = 0.91 x HPLC + 14.0; r = 0.969; n = 120
-----------------------------------------	----------------------------------------------

17. Список литературы

1. Rust MB, Faulhaber J et. al. Neurogenic Mechanisms Contribute to Hypertension in Mice with Disruption of the K-CL Cotransporter KCC3. Circulation Research, January (2006)
2. Creces J., Appleton Ch.: Catecholamines and their Metabolites: Evaluation of a commercial ELISA. Clin. Biochem., QML Pathology, Brisbane QLD (2004)

3. Adams, J. M. et al. Effects of 17 β -Estradiol on hypoglycemia-induced increases in plasma catecholamines in the rat. Poster Society for Neuroscience, Annual Meeting, New Orleans (2003)

4. Westermann J, Hubl W, Kaiser N, Salewski L, Simple, rapid and sensitive determination of epinephrine and norepinephrine in urine and plasma by non-competitive enzyme immunoassay, compared with HPLC method. Clin. Lab., 48: 61-71 (2002)

Информация для заказа

Набор можно заказать в

ЗАО «БиоХимМак»:

119192, г. Москва, Ломоносовский

пр., д.29, стр.1

Тел. (495) 6472740,

E-mail: elisa@biochemmack.ru