

НАБОР ИФА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА, НОРАДРЕНАЛИНА И ДОФАМИНА
В ПЛАЗМЕ И МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА

RE59395, TriCat ELISA

Каталог. № : **RE59395**
Количество : **3 x 96**
Производитель: **IBL (Германия)**

Методика от **12-2014**



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

Для использования в in-Vitro диагностике

1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Иммуноферментный набор для in-vitro диагностики для количественного определения адреналина (эпинефрина), норадреналина (норэпинефрина) и дофамина в человеческой плазме и моче.

2. ВВЕДЕНИЕ

Катехоламины адреналин, норадреналин и допамин синтезируются в надпочечниках костного мозга, симпатической нервной системе и головного мозга. Они влияют фактически на все ткани и вместе с гормональной и нейронной системой участвуют в регуляции широкого спектра физиологических процессов.

Как катехоламины и его метаболиты метанефрин и норметанефрин секретируются в большом количестве при многих заболеваниях и они могут использоваться в диагностических целях.

В этом контексте, диагностика раковых заболеваний нервной системы является очень важной. Они применяются к феохромоцитоме, а также при нейроblastоме и ганглионейроме.

Через шаг экстракции в начале анализа, пользователь может использовать также все виды материалов животных образцов. Он работает для кролей, крыс, мышей, козлов, коней, собак, свиней и других. Химическая структура катехоламинов идентична у всех животных.

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Процедура анализа основана на принципах конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (конкурентный ELISA). Ячейки, покрытые козым антикроличьим антителом. Добавленное жидкое антитело, направленное против эпитопа молекулы антигена связывается с планшетом во время инкубации. Антиген образца инкубируется в покрытых ячейках с вторым антителом, конъюгированным энзимом (Е-Ав), направленным против разных областей молекулы антигена. После субстратной реакции интенсивность развитого окраса пропорциональна количеству антигена. Результаты анализов образцов могут быть определены прямо со стандартной кривой.

4. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Для диагностики in vitro. Только для профессионального использования.
2. Перед началом анализа, прочитайте внимательно инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции, что поставляется. Убедитесь, что все понятно.
3. При повреждении набора или его компонентов, сообщите IBL не позже, чем через неделю после получения набора. Не используйте поврежденные компоненты.
4. Следуйте серии и дате пригодности. Не смешивайте реагенты разных лотов. Не используйте просроченные наборы.
5. Следуйте опыту работы лаборатории и указаниям по безопасности. Используйте лабораторную одежду, одноразовые перчатки и защитные очки.
6. Реагенты этого набора содержат материалы, опасные для глаз и кожи.
7. Химикалии и приготовленные или использованные реагенты необходимо уничтожить как опасные отходы согласно правилам безопасности.
8. Избегайте контакта со стоп раствором. Он может вызвать ожоги кожи.
9. Все реагенты протестированы с отрицательным результатом на наличие ВИЧ I/II, HBsAg, HCV. Но нельзя доступными методами абсолютно исключить эти или другие инфекции. Работайте с реагентами как с потенциально инфицированными.

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Этот набор поставляется при окружающей температуре и должен храниться при 2-8 °С. Храните вдали от источников тепла и солнечных лучей. Хранение и стабильность реагентов указаны в соответствующем пункте инструкции. Микропланшет стабилен до окончания срока пригодности набора в тщательно закрытой упаковке, при хранении при 2-8 °С.

6. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

На in-vivo выделение катехоламинов и метанефринов могут повлиять некоторые виды пищи и лекарства. При приеме витамина В, кофе, бананов, альфа-метилдопа, MAO и COMT ингибиторов, также как и медикаментов, относящихся к гипертензии, необходимо выждать 72 часа перед забором образца.

Плазма (EDTA)

Образцы крови должны храниться при 2-8 °С до центрифугирования для отделения плазмы в течении 2 часов после забора крови.

Необходимо соблюдать обычные меры предосторожности. Очень важно сохранить химическую целостность образцов крови от момента забора до момента тестирования. Не используйте сильно гемолизированные, иктерические или липемические образцы. Образцы необходимо центрифугировать перед тестированием для удаления осадка.

Хранение:	2-8 °С	≤ -20 °С (аликвоты)	Держите вдали от света и от тепла. Избегайте повторных циклов замораживания и размораживания
Стабильность:	6 часов	1 месяц	

Моча

Возможно использование как спонтанной так и 24 часовой мочи. Суточную мочу собирают и смешивают в одном флаконе, содержащем 10-15 мл 6N HCl в качестве консерванта. Определите общий объем для вычисления результатов. **Смешайте и центрифугируйте образцы перед использованием.**

Хранение:	≤ -20 °C (аликвоты)	Держите вдали от света и от тепла. Избегайте повторных циклов замораживания и размораживания
Стабильность:	6 месяцев	

7. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Реагенты, поставляемые в этом наборе, предназначены для проведения 96 определений: 88 образцов пациентов, 6 стандартов и 2 контроля. Каждый экстракт достаточен для отдельного определения адреналина, норадреналина и допамина.

Микропланшет может использоваться для адреналина, норадреналина и допамина.

Количество	Компонент
3x12x8	Микропланшет Разделяемые стрипы. Покрытые анти-кроличьим IgG (козий, поликлональный)
1x6x2,5 мл	Стандарты А-Ф Адреналин: 0; 1,5; 5,0; 15,0; 50,0; 150 нг/мл (0; 8; 27; 82; 273; 819 нмоль/л) Норадреналин: 0; 5,0; 15,0; 50,0; 150; 500 нг/мл (0; 30; 30; 89; 296; 887; 2955 нмоль/л). Допамин: 0; 60; 180; 585; 2300; 11470 нг/мл (0; 392; 1175; 3819; 15014; 74876 нмоль/л). Готовы к использованию, содержат (-) адреналин, (-) норадреналин, (-) допамин (биологически активный, 0,1 M HCl).
1x2x2,5 мл	Контроли 1+2 Готовы к использованию, содержат (-) адреналин, (-) норадреналин, (-) допамин (биологически активный, 0,1 M HCl). Концентрация/приемлемый диапазон указан на флаконе
2x400 мкл	Ферментный Конъюгат, Концентрат (50x) Содержит антитела, конъюгированные щелочной фосфатазой, трис буфер, HCl, 0,01% Na ₂ S ₂ O ₃ .
4x	Экстракционный планшет (Микропланшет) 24 ячейки каждый, покрытые борнат-очищенным гелем
2x60 мл	Экстракционный буфер Розовый окрас, готов к использованию, содержат 0,016% Na ₂ S ₂ O ₃
6x1,25 мл	СОМТ лиофилизированный Содержат Катехол-О-метилтрансфераза (печень свиньи), Na ₂ S ₂ O ₃
6x1,25 мл	Коэнзимный раствор Готов к использованию, содержит S-Adenosyl-L-Mrthionine стабилизаторы
3x3 мл	Энзимный буфер Готовый к использованию, содержит Трис буфер, HCl, стабилизаторы
1x100 мл	Освобождающий буфер Желтый окрас, готовый к использованию, содержит 0,1 M HCl, индикатор
2x3,0 мл	Реагент для ацилирования Готовый к использованию, содержит диметилформамид, этанол. Внимание: токсичен, легко воспламеняющийся.
2x100 мл	Моющий буфер Концентрат (10x) Содержит Трис буфер, HCl, Твин, 0,2% Na ₂ S ₂ O ₃
2x2 мл	СОМТ дополнительный Содержит человеческую плазму, стабилизаторы, 0,01% тимерозал
1x8,0 мл	Антисыворотка адреналина Зеленая, готовая к использованию, содержит антитела против адреналина (кроличьи), буфер, стабилизаторы.
1x8,0 мл	Антисыворотка норадреналина Синий окрас, готовая к использованию, содержит антитела против допамина (кроличьи), буфер, стабилизаторы
1x8,0 мл	Антисыворотка допамина Фиолетовый окрас, готовая к использованию, содержит антитела против норадреналин (кроличьи), буфер, стабилизаторы
3x25 мл	PNPP субстратный раствор Готовый к использованию, содержит дитаноламин, воду, 0,05%Na ₂ S ₂ O ₃
3x15 мл	PNPP стоп раствор Готовый к использованию, содержит 1M NaOH 0,25 M EDTA
9x	Адгезивная фольга

8. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропипетки (многоканальные пипетки Эппендорфа или подобные устройства, KB < 3%). Объем: 10, 10-100, 100-1000 мкл.
2. Орбитальный шейкер (200-900 об/мин) (напр. EAS 2/4 SLT).
3. Миксер типа вортекс.
4. 8-канальный микродозатор с резервуарами для реагентов.
5. Бутылка для промывания, автоматическая или полуавтоматическая система для промывания планшета.
6. Микропланшетный считыватель, способностью считывания абсорбции при 405 нм (установленная длина волны 600-650 нм).
7. Бидистиллированная или деионизированная вода.
8. Бумажное полотенце, наконечники для пипеток и таймер.
9. Одноразовые пробирки для разбавления образца.
10. 0.1 N HCl для разведения образцов (мочи).

9. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. При несоответствии тестовой процедуры или обработки образцов инструкции, это может влиять на результаты. Строго соблюдайте объем пипетирования, время инкубации, температуру и все шаги предварительной обработки. Используйте только калиброванные пипетки и устройство.
2. После начала теста, все шаги необходимо провести без перерывов. Следите, что б необходимые реагенты, материалы и устройство были готовы в нужное время. Приведите все реагенты к комнатной температуре (18-25 °C) и легко вращайте жидкие реагенты и образцы перед использованием. Смешайте реагенты без пенообразования.
3. Избегайте загрязнения реагентов, пипеток и пробирок. Используйте новые сменные пластиковые наконечники для каждого реагента, стандарта или образца. Не меняйте крышки. Всегда закрывайте флаконы, что не используются. Не используйте ячейки / пробирки или реагенты повторно.
4. Рекомендуется определять образцы в дубликате для идентификации потенциальных ошибок пипетирования.
5. Используйте схему пипетирования для оценки расположения планшета.
6. Время инкубации влияет на результаты. Все ячейки должны использоваться в одинаковом порядке и последовательности. Рекомендуется использовать 8-канальную микропипетку для пипетирования во все ячейки.

7. Промывание микропланшета очень важно. При неправильном промывании ячеек результаты будут недостоверные. Рекомендуется использовать многоканальные пипетки или автоматическую систему для промывания. Не давайте возможности ячейкам высохнуть между этапами инкубации. Не царапайте ячейки во время промывания или аспирации. Наполняйте реагенты с осторожностью. При наполнении, проверьте, что в все ячейки были равномерно наполнены моющим буфером и что нет остатков жидкости.
8. Влажность влияет на покрытые ячейки / пробирки. Не вскрывайте пакет, пока он не достигнет комнатной температуры. Неиспользованные ячейки / пробирки необходимо вернуть в пакет с осушителем.

10. РУЧНАЯ ПРОЦЕДУРА

10.1 ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА

Содержимое набора на 3x96 определений может быть разделено на 2 разных анализа.
Видимое количество геля может отделяться от поверхности ячейки экстракции при экстракции, но это не влияет на результаты теста.
Загрязнения воздуха дезинфицирующими средствами для очистки поверхностей или оборудования, используемого в виде порошка или в виде растворов, содержащих пероксидный кислород, например Virkon®, следует избегать в любом случае. Они будут сильно мешать проведению теста. Virkon® является торговой маркой компании DuPont.

10.1.1 Разбавление образца

Образцы при ожидающейся концентрации выше наивысшего стандарта должны быть разбавлены:

Образец	Разбавить	С	Пометки
Плазма	> наивысшего стандарта	Бидист. Вода	до этапа экстракции
Моча	> наивысшего стандарта	0,1 N HCl	до этапа экстракции

10.1.2 Экстракция образцов, стандартов и контролей (экстракционный планшет) (ручная версия)

1	Пипетировать 20 мкл каждого стандарта, контроля и образца мочи и 500 мкл каждого образца плазмы в соответствующие ячейки экстракционного планшета. Добавьте 500 мкл бидистил. воды во все ячейки кроме образцов плазмы для корректировки объемов.
2	Пипетировать 1000 мкл экстракционного буфера во все ячейки.
3	Накройте планшет адгезивной фольгой. Экстрагируйте 30 минут при КТ (18-25°C) на орбитальном шейкере (600-900 об/мин). Во время экстракции поверхность жидкости должна увлажнить адгезивную фольгу, но уровень жидкости не должен превышать 2/3 ячейки. Выплескивание не влияет на результаты.
4	Удалите адгезивную фольгу. Немедленно опустошите планшет и элиминируйте остаток жидкости бумажным полотенцем.
5	Пипетируйте 2 мл бидистиллированной воды в каждую ячейку.
6	Накройте планшет новой адгезивной фольгой. Встряхивайте 5 минут при КТ (18-25 °C) на орбитальном шейкере (600-900 об/мин). Выплескивание не влияет результаты.
7	Удалите адгезивную фольгу. Немедленно опустошите планшет и элиминируйте остаток жидкости бумажным полотенцем.
8	Пипетируйте 150 мкл экстракционного буфера в каждую ячейку. В каждую ячейку добавьте 50 мкл реагента для ацилирования. Немедленно смешайте после пипетирования.
9	Экстрагируйте 20 минут при КТ (18-25 °C) (без адгезивной фольги) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин)
10	Немедленно опустошите планшет и элиминируйте остаток жидкости бумажным полотенцем. Удаляйте жидкость полностью.
11	Пипетируйте 2 мл бидистиллированной воды в каждую ячейку.
12	Накройте планшет новой адгезивной фольгой. Встряхните 5 минут при КТ (18-25°C) на орбитальном шейкере (600-900 об/мин). Выплескивание не влияет на результаты.
13	Удалите адгезивную фольгу. Немедленно опустошите планшет и элиминируйте остаток жидкости бумажным полотенцем.
14	Пипетируйте 300 мкл буфера для освобождения в каждую ячейку.
15	Встряхните 30 минут при КТ (18-25 °C) (без адгезивной фольги) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин)

Приготовленные образцы должны анализироваться в тот самый день. Если это невозможно, экстракционный планшет может храниться обернутым адгезивной фольгой одну ночь при 2-8 °C.

Важно при измерении Дофамина.

Разведение экстрагированных стандартов, контролей должно быть выполнено непосредственно перед пипетированием в ячейки микропланшетов в отдельных пробирках. Предварительно разведите также образцы мочи.

Таким образом, разведите все экстрагированные стандарты, контроли и образцы мочи 1:51 освобождаящим буфером в разовых пробирках (например, 10 мкл экстрагированных образцов + 500 мкл освобождающего буфера).

Экстрагированные образцы плазмы не требуют предварительного разбавления.

10.1.3 Подготовка концентрированных компонентов

Объемы, указанные ниже, предназначены для 1 анализа с использованием 3 x 6 полосок (3 x 48 определений).

Растворение / разбавление	Компонент	С	Разбавитель	Отношение	Пометки	Хранение	Стабильность
75 мл	Моющий буфер	675 мл	Бидист. вода	1:10	Тщательно перемешать	2-8 °C	4 недели
300 мкл	Ферментный конъюгат	15 мл	Моющий буфер (разбавленный)	1:51	Приготовьте свежий и используйте только раз. Смешать без пенообразования	18-25 °C	5 часов

10.2 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА (ручная версия)

10.2.1 Приготовление Ферментного раствора COMT

Ферментный раствор COMT должен быть свежеприготовленным перед использованием.

Растворите содержимое каждого лиофилизированного COMT в 1,25 мл бидистиллированной воды и смешайте растворенный COMT*. Потом пипетируйте 1,25 мл коэнзимного раствора, 1,25 мл энзимного буфера и 0,40 мл дополнителя COMT во флаконы со смешанным COMT для получения конечного объема 4,15 мл COMT энзимного раствора на флакон. Смешайте 3 флакона для 48 определений адреналина и 48 определений норадреналина и 48 определений дофамина. Раствор может быть мутным. Смешайте без пенообразования. Раствор стабилен при комнатной температуре на протяжении 1 часа.

*Если требуется только аликвота раствора COMT, остаток раствора COMT необходимо немедленно заморозить в аликвотах при -20 °C. COMT раствор стабилен при этих условиях 1-2 месяца.

10.2.2 Энзимная дериватизация образцов, стандартов и контролей (микропланшет)

Если пипетируется с положительным расположением, поместите остаток жидкости с наконечника пипетки назад в соответствующие ячейки экстракционного планшета, иначе экстракта может не хватить для определения других анализов.

Желательно держать экстракционный планшет в наклонном положении.

Перед использованием микропланшета, определите и пометьте ячейки для адреналина, норадреналина и дофамина.

10.2.3 С целью исследования гомогенатов тканей и супернатантов клеточных культур даются следующие рекомендации:

Работа с супернатантами культур клеток зависит от матрикса и ожидаемой концентрации. Соответственно протоколу для мочи (экстракция хотя бы 20 мкл супернатанта), ожидается чувствительность для разведенных образцов: для адреналина 0,3 нг/мл, для норадреналина 0,6 нг/мл и дофамина 5 нг/мл. В случае матрикса с добавлением сыворотки (FCS), можно использовать протокол для плазмы (экстракция 500 мкл супернатанта) с чувствительностью соответственно протоколу для плазмы.

Для гомогенатов тканей не используйте перхлорную кислоту для гомогенизации.

10.2.4 Адреналин в моче и плазме

1	Пипетируйте 75 мкл свежеприготовленного СОМТ энзимного раствора в каждую ячейку микропланшета для адреналина . Немножко взболтайте.
2	Пипетируйте 100 мкл каждого экстрагированного стандарта, контроля и образца в соответствующие ячейки. Во время этого этапа держите наконечники пипетки прямо в СОМТ растворе. Цвет изменится на розовый. Немножко взболтайте.
3	Пипетируйте 50 мкл антисыворотки адреналина (зеленого окраса) в каждую ячейку.
4	Накройте планшет адгезивной фольгой. Инкубируйте 120 минут при КТ (18-25°C) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин).

10.2.5 Норадреналин в моче и плазме

1	Пипетируйте 25 мкл свежеприготовленного СОМТ энзимного раствора в каждую ячейку микропланшета для норадреналина .
2	Пипетируйте 25 мкл каждого экстрагированного стандарта, контроля и образца в соответствующие ячейки. Во время этого этапа держите наконечники пипетки прямо в СОМТ растворе. Цвет изменится на розовый.
3	Пипетируйте 50 мкл антисыворотки норадреналина (голубой окрас) в каждую ячейку.
4	Накройте планшет адгезивной фольгой. Инкубируйте 120 минут при КТ (18-25°C) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин).

10.2.6 Дофамин для мочи и плазмы

1	Пипетируйте 75 мкл свежеприготовленного СОМТ энзимного раствора в каждую ячейку микропланшета для норадреналина .
2	Для мочи: Пипетируйте 100 мкл предварительно разведенного 1:51 экстрагированного стандарта, контроля и образцов мочи в соответствующие ячейки. Во время этого этапа держите наконечники пипетки прямо в СОМТ растворе. Цвет изменится на розовый. Для плазмы: Пипетируйте 100 мкл предварительно разведенного 1:51 экстрагированного стандарта, контроля и неразведенного экстрагированного образца плазмы в соответствующие ячейки. Во время этого этапа держите наконечники пипетки прямо в СОМТ растворе. Цвет изменится на розовый.
3	Пипетируйте 50 мкл антисыворотки дофамина (фиолетовый окрас) в каждую ячейку.
4	Накройте планшет адгезивной фольгой. Инкубируйте 120 минут при КТ (18-25°C) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин).

10.2.7 Иммуноферментный анализ

Следующая процедура должна проводиться для адреналина, норадреналина и дофамина.

1	Удалите адгезивную фольгу. Удалите инкубационный раствор. Промойте планшет 6 x 250-300 мкл разбавленного мощного буфера. Удалите остаток раствора на бумажное полотенце.
2	Пипетируйте 100 мкл свежеприготовленного Ферментного конъюгата в каждую ячейку.
3	Накройте планшет адгезивной фольгой. Инкубируйте 60 минут при КТ (18-25°C) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин).
4	Удалите адгезивную фольгу. Удалите инкубационный раствор. Промойте планшет 6 x 250-300 мкл разбавленного мощного буфера . Удалите остаток раствора на бумажное полотенце.
5	Для добавления раствора субстрата и стоп раствора, используйте, по возможности, 8-канальный микропипетор. Пипетирование необходимо проводить в те самые интервалы, и для раствора субстрата и для стоп раствора. Используйте положительное перемещение и избегайте образования пузырей.
6	Пипетируйте 200 мкл раствора субстрата PNPP в каждую ячейку.
7	Инкубируйте 40 минут при КТ (18-25°C) (без адгезивной фольги) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин).
8	Остановите субстратную реакцию добавлением 50 мкл PNPP стоп раствора в каждую ячейку. Легко перемешайте содержимое планшета.
9	Измерьте оптическую плотность фотометром при 405 нм (установленная длина волны: 620-650 нм) в течение 60 минут после пипетирования стоп раствора. Не должно быть пузырей.

11. АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ ПРОЦЕДУРА

11.1 ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ УКАЗАНИЯ (автоматизированная версия)

Содержимое набора на 3x96 определений может быть разделено на 2 разных анализа.
Видимое количество геля может отделяться от поверхности ячейки экстракции при экстракции, но это не влияет на результаты теста.
Загрязнения воздуха дезинфицирующими средствами для очистки поверхностей или оборудования, используемого в виде порошка или в виде растворов, содержащих пероксидный кислород, например Virkon®, следует избегать в любом случае. Они будут сильно мешать проведению теста. Virkon® является торговой маркой компании DuPont.

11.1.1. Разбавление образцов

Образцы при ожидающейся концентрации выше наивысшего стандарта должны быть разбавлены:

Образец	Разбавить	С	Пометки
Плазма	> наивысшего стандарта	Бидист. Вода	до этапа экстракции
Моча	> наивысшего стандарта	0,1 N HCl	до этапа экстракции

11.1.2. Экстракция образцов, стандартов и контролей (экстракционный планшет) (автоматизированная версия)

1	Пипетировать 30 мкл каждого стандарта, контроля и образца мочи и 750 мкл каждого образца плазмы в соответствующие ячейки экстракционного планшета. Добавить 750 мкл бидистил. воды во все ячейки кроме образцов плазмы для корректировки объемов.
2	Пипетировать 1000 мкл экстракционного буфера во все ячейки.
3	Накройте планшет адгезивной фольгой. Экстрагируйте 30 минут при КТ (18-25°C) на орбитальном шейкере (600-900 об/мин). Во время экстракции поверхность жидкости должна увлажнить адгезивную фольгу, но уровень жидкости не должен превышать 2/3 ячейки. Выплескивание не влияет результаты.
4	Удалите адгезивную фольгу. Немедленно опустошите планшет и элиминируйте остаток жидкости бумажным полотенцем.
5	Пипетируйте 2 мл бидистиллированной воды в каждую ячейку.
6	Накройте планшет новой адгезивной фольгой. Встряхните 5 минут при КТ (18-25°C) на орбитальном шейкере (600-900 об/мин). Выплескивание не влияет результаты.
7	Удалите адгезивную фольгу. Немедленно опустошите планшет и элиминируйте остаток жидкости бумажным полотенцем.
8	Пипетируйте 150 мкл экстракционного буфера в каждую ячейку. В каждую ячейку добавьте 50 мкл реагента для ацилирования . Немедленно смешайте после пипетирования.
9	Экстрагируйте 20 минут при КТ (18-25°C) (без адгезивной фольги) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин)

10	Немедленно опустошите планшет и элиминируйте остаток жидкости бумажным полотенцем. Удаляйте жидкость полностью.
11	Пипетируйте 2 мл бидистиллированной воды в каждую ячейку.
12	Накройте планшет новой адгезивной фольгой. Встряхните 5 минут при КТ (18-25 °С) на орбитальном шейкере (600-900об/мин). Выплескивание не влияет результаты.
13	Удалите адгезивную фольгу. Немедленно опустошите планшет и элиминируйте остаток жидкости бумажным полотенцем.
14	Пипетируйте 450 мкл буфера для освобождения в каждую ячейку.
15	Встряхните 30 минут при КТ (18-25 °С) (без адгезивной фольги) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин)

Приготовленные образцы должны анализироваться в тот самый день. Если это невозможно, экстракционный планшет может храниться обернутым адгезивной фольгой одну ночь при 2-8 °С.

Важно для измерения Дофамина.

Разведение экстрагированных стандартов, контролей должно быть выполнено непосредственно перед пипетированием в ячейку микропланшета в отдельных пробирках. Предварительно разведите также образцы мочи.

Таким образом, разведите все экстрагированные стандарты, контроли и образцы мочи 1:51 освобождающим буфером в разовых пробирках (например, 10 мкл экстрагированных образцов + 500 мкл освобождающего буфера).

Экстрагированные образцы мочи не требуют предварительного разбавления.

11.1.3. Приготовление концентрированных компонентов

Растворение/разбавление	Компонент	С	Разбавитель	Отношение	Пометки	Хранение	Стабильность
75 мл	Моющий буфер	675 мл	Бидист. вода	1:10	Тщательно перемешать	2-8 °С	4 недели
380 мкл	Энзимный конъюгат	19 мл	Моющий буфер (разбавленный)	1:51	Приготовьте свежий и используйте только раз. Смешать без пенообразования	18-25 °С	5 часов

11.2. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА (автоматизированная версия)

11.2.1 Приготовление СОМТ энзимного раствора

СОМТ энзимный раствор должен быть свежее приготовленным перед использованием.

Растворите каждое содержимое лиофилизированного СОМТ в **1,25 мл бидистиллированной воды** и смешайте растворенный СОМТ*. Потом пипетируйте **1,25 мл коэнзимного раствора** после **1,25 мл энзимного буфера** и **0,40 мл СОМТ дополнителя** в флаконы со смешанным СОМТ для получения конечного объема 4,15 мл СОМТ энзимного раствора на флакон. Смешайте 3 флакона для 48 определений адреналина, 48 определений норадреналина и 48 определений дофамина. Раствор может быть мутным. Смешайте без пенообразования. Раствор стабильный при комнатной температуре на протяжении 1 часа.

*Если требуется только аликвота СОМТ раствора, остаток разбавленного СОМТ раствора необходимо заморозить в аликвотах при -20°С. СОМТ раствор стабилен при этих условиях 1-2 месяца.

11.2.2 Для исследовательских целей гомогенатов тканей и супернатантов клеточных культур даются следующие рекомендации:

Работа с супернатантами культур клеток зависит от матрикса и ожидаемой концентрации. Соответственно протоколу для мочи (экстракция хотя бы 20 мкл супернатанта), ожидается чувствительность для разведенных образцов: для адреналина 0,3 нг/мл, для норадреналина 0,6 нг/мл и дофамина 5 нг/мл. В случае матрикса с добавлением сыворотки (FCS), можно использовать протокол для плазмы (экстракция 500 мкл супернатанта) с чувствительностью соответственно протоколу для плазмы.

Для гомогенатов тканей не используйте перхлорную кислоту для гомогенизации.

11.2.3 Энзимная дериватизация образцов, стандартов и контролей (микропланшет)

11.2.4 Адреналин для мочи и плазмы

1	Пипетируйте 75 мкл свежеприготовленного СОМТ энзимного раствора в каждую ячейку микропланшета для адреналина. Немножко взболтайте 1 минуту.
2	Пипетируйте 100 мкл каждого экстрагированного стандарта, контроля и образца в соответствующие ячейки. Немножко взболтайте 1 мин.
3	Пипетируйте 50 мкл антисыворотки адреналина (зеленого окраса) в каждую ячейку.
4	Накройте планшет адгезивной фольгой. Инкубируйте 120 минут при КТ (18-25 °С) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин).

11.2.5 Норадреналин для мочи и плазмы

1	Пипетируйте 25 мкл свежеприготовленного СОМТ энзимного раствора в каждую ячейку микропланшета для норадреналина. Взболтайте 1 мин.
2	Пипетируйте 25 мкл каждого экстрагированного стандарта, контроля и образца в соответствующие ячейки. Взболтайте 1 мин.
3	Пипетируйте 50 мкл антисыворотки норадреналина (голубой окрас) в каждую ячейку.
4	Накройте планшет адгезивной фольгой. Инкубируйте 120 минут при КТ (18-25 °С) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин).

11.2.6 Дофамин для мочи и плазмы

1	Пипетируйте 75 мкл свежеприготовленного СОМТ энзимного раствора в каждую ячейку микропланшета для норадреналина. Немножко взболтайте.
2	Для мочи: Пипетируйте 100 мкл предварительно разведенного 1:51 экстрагированного стандарта, контроля и образцов мочи в соответствующие ячейки. Во время этого этапа держите наконечники пипетки прямо в СОМТ растворе. Цвет изменится на розовый. Немножко взболтайте Для плазмы: Пипетируйте 100 мкл предварительно разведенного 1:51 экстрагированного стандарта, контроля и неразведенного экстрагированного образца плазмы в соответствующие ячейки. Во время этого этапа держите наконечники пипетки прямо в СОМТ растворе. Цвет изменится на розовый. Немножко взболтайте.
3	Пипетируйте 50 мкл антисыворотки дофамина (фиолетовый окрас) в каждую ячейку.
4	Накройте планшет адгезивной фольгой. Инкубируйте 120 минут при КТ (18-25 °С) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин).

11.2.7 Иммуноферментный анализ

Следующая процедура должна проводиться для адреналина, норадреналина и дофамина.

1	Удалите инкубационный раствор. Промойте планшет шесть раз 250-300 мкл разбавленного моющего буфера.
2	Пипетируйте 100 мкл энзимного конъюгата в каждую ячейку.
3	Накройте планшет адгезивной фольгой. Инкубируйте 60 минут при КТ (18-25 °С) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин).
4	Удалите инкубационный раствор. Промойте планшет шесть раз 250-300 мкл разбавленного моющего буфера.
5	Пипетирование необходимо проводить в те самые интервалы, и для раствора субстрата и для стоп раствора.
6	Пипетируйте 200 мкл раствора субстрата в каждую ячейку.
7	Инкубируйте 40 минут при КТ (18-25 °С) (без адгезивной фольги) на орбитальном шейкере (400-600 об/мин). Если температура в автомате будет выше 25 °С сократите время инкубации до 30 мин для избежания переливания.

8	Остановите субстратную реакцию добавлением 50 мкл PNPP стоп раствора в каждую ячейку. Легко перемешайте содержимое планшета.
9	Измерьте оптическую плотность фотометром при 405 нм (установленная длина волны: 620-650 нм) в течение 60 минут после пипетирования стоп раствора. Не должно быть пузырей.

12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Тестовые результаты достоверны только при полном следовании инструкции. Также пользователь должен следовать требованиям по безопасности. Все стандарты и контроли должны быть в диапазоне, указанном в сертификате качества. Если критерии не выполняются, анализ не достоверен и его следует повторить. Каждая лаборатория должна использовать известные образцы как контроли. Необходимо внимательно следить за следующими показателями: дата пригодности (приготовленных реагентов), условия хранения, пипетки, устройство, условия инкубации и методы промывания.

13. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученная ОП стандартов (ось y) откладываются против их концентрации (ось x) или на полулогарифмической бумаге или используя автоматический метод. Наиболее оптимальными являются кубический spline, 4 параметровая логистика или Logit-Log.

Для вычисления стандартной кривой отложите каждый сигнал стандартов.

Концентрация контролей и образцов **мочи** в нг/мл считывается прямо из стандартной кривой.

Для адреналина и норадреналина. Поскольку объем пипетирования для плазмы равен 500 мкл при сравнении с объемом стандартов 20 мкл (750 мкл и 30 мкл для автоматической версии соответственно, результаты для образцов **плазмы** должны быть разделены на 25.

Для дофамина. Результаты для образцов **плазмы** должны быть разделены на 1275 – соответственно разнице в процедуре экстракции и разведении 1:51 стандартов.

Для единиц в пг/мл умножьте на 1000.

В случае разбавления образцов, значения должны быть умножены на соответствующий фактор разбавления

Образцы, что показали сигнал выше наивысшего стандарта необходимо разбавить и анализировать повторно.

Вычислите 24 ч. выделение для всех образцов мочи: мкг/24ч = мкг/л x л/24ч

Конверсия:

1000 пг/мл = 1 нг/мл

Адреналин (мкг/л) x 5.458 = нмоль/л

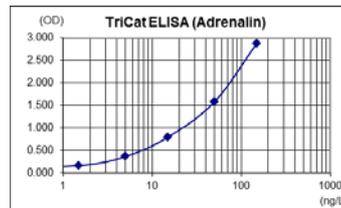
Норадреналин (мкг/л) x 5.911 = нмоль/л

Дофамин (мкг/л) x 6.528 = нмоль/л

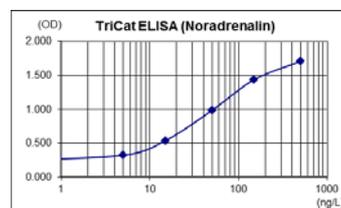
Типичная калибровочная кривая

(Не для вычисления)

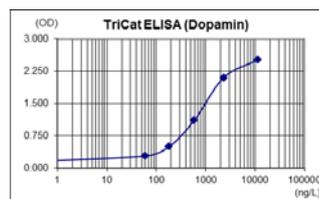
Стандарт	Адреналин (нг/мл)	Среднее ОП	ОП/ОП _{max} (%)
A	0,0	0,088	3.1
B	1,5	0,167	5.8
C	5,0	0,368	12.8
D	15	0,796	27.6
E	50	1,579	54.8
F	150	2,881	100



Стандарт	Норадреналин (нг/мл)	Среднее ОП	ОП/ОП _{max} (%)
A	0,0	0,223	0,0
B	5,0	0,322	6,7
C	15	0,539	21,3
D	50	0,984	51,2
E	150	1,438	81,8
F	500	1,708	100



Стандарт	Дофамин (нг/мл)	Среднее ОП	ОП/ОП _{max} (%)
A	0,0	0,135	0,0
B	60	0,287	6,4
C	180	0,500	15,3
D	585	1,113	41,0
E	2300	2,105	82,5
F	11470	2,522	100



14. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Результаты сами по себе не должны использоваться для терапевтических заключений. Они должны соотноситься с клиническим наблюдением и диагностическим тестом.

Очевидно здоровые субъекты показали следующие результаты: (5-95% процентиль).

Рекомендуется, чтоб каждая лаборатория установила собственные границы нормальных значений.

	моча		плазма	
	мкг/д	нмоль/д	пг/мл	нмоль/л
адреналин	< 20	< 110	< 125	< 0.68
норадреналин	< 90	< 535	< 600	< 3.55
дофамин	< 600	< 3917	< 100	< 0.65

15. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Сбор образца имеет значительное влияние на результаты теста. Внимательно следуйте инструкции.

Относительно перекрестной реактивности смотрите ХАРАКТЕРИСТИКИ.

Следующие компоненты крови не показывают значительного влияния (+/- 20% ожидаемого) на тестовые результаты до указанной концентрации:

Гемоглобин	2,0 мг/мл
Билирубин	1,0 мг/мл
Триглицериды	91 мг/мл

16. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Adrenalin	Noradrenalin	Dopamine	Cross-reactivity of other substances tested < 0.5 %
	Adrenalin	100	< 0.02	< 0.05	
	Noradrenalin	< 0.4	100	< 0.05	
	Dopamine	< 0.1	< 0.02	100	
	Metanephrine	< 0.1	< 0.002	< 0.05	
	Normetanephrine	< 0.1	< 0.005	< 0.05	
	3-MT	< 0.1	< 0.002	< 0.05	
L-DOPA	< 0.1	< 0.001	< 0.05		
Analytical Sensitivity (Limit of Detection)	Adrenalin	Urine	0.2 ng/mL	Mean signal (Zero-Standard) + 2SD	
		Plasma	8 pg/mL		
	Noradrenalin	Urine	0.6 ng/mL		
		Plasma	20 pg/mL		
Dopamine	Urine	5 ng/mL			
	Plasma	4 pg/mL			
Precision		Range (ng/mL)	CV (%)		
Intra-Assay	Adrenalin	Urine	5.0 - 64.3		8.7
		Plasma	0.046 - 1.060	6.8	
	Noradrenalin	Urine	16.0 - 256	7.3	
		Plasma	0.560 - 12.38	7.4	
	Dopamine	Urine	37 - 1549	7.0	
		Plasma	0.046 - 1.402	10.9	
Inter-Assay	Adrenalin	Urine	5.2 - 74.5	12.1	
		Plasma	0.051 - 0.979	15.2	
	Noradrenalin	Urine	15.4 - 391.5	12.1	
		Plasma	0.569 - 1.945	12.5	
	Dopamine	Urine	47 - 990	10.8	
		Plasma	0.213 - 1.055	16.3	
Linearity			Range (ng/mL)	Serial dilution up to	Range (%)
	Adrenalin	Urine	2.7 - 114.6	1:32	85 - 105
		Plasma	0.002 - 0.837	1:32	76 - 120
	Noradrenalin	Urine	5.1 - 423	1:32	85 - 115
		Plasma	0.02 - 8.2	1:32	89 - 111
	Dopamine	Urine	141 - 5732	1:32	87 - 114
Plasma		0.04 - 1.3	1:16	100 - 135	
No High dose hook effect detected.					
Recovery			Mean (%)	Range (%)	% Recovery after spiking
	Adrenalin	Urine	95	85 - 106	
		Plasma	100	85 - 120	
	Noradrenalin	Urine	100.9	81 - 116	
		Plasma	97.5	83 - 111	
	Dopamine	Urine	101.5	89 - 113	
Plasma		91	70 - 113		
Method Comparison versus HPLC	Adrenalin	IBL = 0.91 x HPLC + 14.0; r = 0.969; n = 120			
	Noradrenalin	IBL = 0.75 x HPLC + 4.8; r = 0.945; n = 134			
	Dopamine	IBL = 1.06 x HPLC - 0.154; r = 0.985; n = 90			



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