

Інструкція із застосування

АДРЕНАЛІН ВИСОКОЧУТЛИВИЙ ІФА

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com, www.novamedline.com

REF**BA E-5100R**

96

RUO

For research
use only –
Not for use
in diagnostic
procedures

АДРЕНАЛІН високочутливий ІФА

1. Цільове використання та принцип тесту

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення адреналіну (епінефрину). Гнучка система тестування для різних типів і об'ємів біологічних зразків.

Адреналін (епінефрин) екстрагують за допомогою цис-діол-специфічного афінного гелю, ацилюють і потім перетворюють ферментативно.

Конкурентоспроможний набір ІФА використовує формат мікропланшета. Антиген зв'язується з твердою фазою мікропланшета. Дериватизовані стандарти, контролі та зразки, а також аналіт, зв'язаний з твердою фазою, конкурують за фіксовану кількість сайтів зв'язування антитіл. Після того, як система досягне рівноваги, вільний антиген і вільні комплекси антиген-антитіло видаляють промиванням. Антитіло, зв'язане з твердою фазою, виявляється за допомогою кон'югату IgG-пероксидази кролика з використанням ТМБ як субстрату. Реакцію контролюють при 450 нм.

Кількісне визначення невідомих зразків досягається шляхом порівняння їх абсорбції зі стандартною кривою, підготовленою з відомими стандартними концентраціями.

2. Процедурні застереження, рекомендації та попередження

- (1) Цей набір призначений лише для професійного використання. Користувачі повинні мати повне розуміння цього протоколу для успішного використання цього набору. Лише інструкція до тесту, що надається разом з набором, є дійсною і повинна використовуватися для проведення аналізу. Надійна робота буде досягнута лише за умови суворого та ретельного дотримання наданих інструкцій.
- (2) Необхідно дотримуватися принципів належної лабораторної практики (НЛП).
- (3) Щоб зменшити вплив потенційно шкідливих речовин, одягайте лабораторні халати, одноразові латексні рукавички та захисні окуляри, де це необхідно.
- (4) Усі реагенти та зразки з набору слід довести до кімнатної температури та обережно, але ретельно перемішати перед використанням. Уникайте повторного заморожування та відтавання реагентів і зразків.
- (5) Для розведення або відновлення використовуйте дейонізовану, дистильовану або надчисту воду.
- (6) Мікропланшет містить стріпи, що відриваються. Невикористані лунки з інструкціями необхідно зберігати при 2–8 °С у герметичному пакеті з фольги з осушувачем і використати в наданій рамці.
- (7) Настійно рекомендується повторне визначення зразка, щоб визначити потенційні помилки піпетування.
- (8) Після початку тесту всі кроки повинні бути завершені без перерви. Переконайтеся, що необхідні реагенти, матеріали та пристрої підготовлені в належний час.
- (9) Час інкубації впливає на результати. Усі лунки слід обробляти в однаковому порядку та з однаковими інтервалами часу.
- (10) Щоб уникнути перехресного забруднення реагентів, використовуйте нові одноразові наконечники піпеток для дозування кожного реагенту, зразка, стандарту та контролю.
- (11) Стандартна крива повинна бути встановлена для кожного циклу.
- (12) Контролі повинні бути включені в кожен прогін і знаходитися в межах встановлених довірчих меж. Довірчі межі вказані у звіті про контроль якості.
- (13) Не змішуйте компоненти набору з різними номерами партій у тесті та не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетках набору.
- (14) Уникайте контакту з Стоп Розчином, що містить 0,25 МН₂ТАК₄. Це може викликати подразнення шкіри та опіки. У разі потрапляння в очі або на шкіру негайно змийте водою.
- (15) Субстрат ТМБ має подразнюючу дію на шкіру та слизові оболонки. У разі можливого контакту промити очі великою кількістю води, а шкіру – великою кількістю води з милом. Вимийте забруднені предмети перед повторним використанням.
- (16) Лише для інформації про небезпечні речовини, що входять до набору, зверніться до Паспорту безпеки (SDS). Паспорт безпеки для цього продукту доступний безпосередньо на веб-сайті виробника або за запитом.
- (17) Реагенти набору слід розглядати як небезпечні відходи та утилізувати відповідно до національних норм.
- (18) У разі будь-якого серйозного пошкодження тестового набору або компонентів виробник повинен бути проінформований письмово не пізніше ніж через тиждень після отримання набору. Сильно пошкоджені окремі компоненти не можна використовувати для тестового запуску. Їх потрібно правильно зберігати, поки виробник не вирішить, що з ними робити. Якщо буде вирішено, що вони більше не придатні для вимірювань, їх необхідно утилізувати відповідно до національних норм.

3. Зберігання та стабільність

Зберігайте невідкриті реагенти при 2–8°C до закінчення терміну придатності. Не використовуйте компоненти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетках набору. Після відкриття реагенти стабільні протягом 2 місяців за умови зберігання при 2–8 °С. Після відкриття пакета, що закривається, слід подбати про те, щоб знову щільно закрити його з осушувачем.

4. Матеріали

4.1 Вміст набору

BA D-0032TM 96 **Мікропланшет** – Готовий до використання

Зміст: 1 x 96 лунок, в пакеті, що закривається

BA D-0090^{FOILS} **Клейка фольга**– Готовий до використання

Зміст: Клейка фольга в пакеті, що закривається

обсяг: 1 x 4 фольги

BA E-0030^{WASH-CONC} 50x **Концентрат промивного буфера**– Концентрований 50x

Зміст: Буфер з неіонним миючим засобом і фізіологічним рН

обсяг: 1 x 20 мл/флакон, світло-фіолетовий ковпачок

BA E-0040^{CONJUGATE} **Ферментний кон'югат**– Готовий до використання

Зміст: Козячі антикролячі імуноглобуліни, кон'юговані з пероксидазою

обсяг: 1 x 12 мл/флакон, червоний ковпачок

BA E-0055^{SUBSTRATE} **Субстрат** – Готовий до використання

Зміст: Хромогенний субстрат, що містить тетраметилбензидин, субстратний буфер і водень перекис

обсяг: 1 x 12 мл/чорний флакон, чорний ковпачок

BA E-0080^{STOP-SOLN} **Стоп розчин**– Готовий до використання

Зміст: 0,25 М сірчаної кислоти

обсяг: 1 x 12 мл/флакон, світло-сірий ковпачок

Ідентифікація небезпеки:



H290 Може викликати корозію металів.

BA E-0131TM ^{ADR} ^{MN} **Мікروتитрувальні стріпи адреналіну**– Готові до використання

Зміст: 1 x 96-лунковий (12x8) мікропланшет із попередньо покритим антигеном у синьому пакеті, що закривається, із осушувачем

BA E-5110^{ADR-AS} **Антисироватка для надниркових залоз**– Готовий до використання

Зміст: Кролячі антиадреналінові антитіла синього кольору

обсяг: 1 x 6 мл/флакон, синій ковпачок

BA E-6612^{ACYL-REAG} **Реагент ацилювання**– Готовий до використання

Зміст: Агент ацилювання в ДМСО

обсяг: 1 x 3 мл/флакон, білий ковпачок

BA R-0050^{ADJUST-BUFF} **Буфер коригування**– Готовий до використання

Зміст: TRIS буфер

обсяг: 1 x 4 мл/флакон, зелений ковпачок

BA R-4617^{TE-BUFF} **TE Буфер**– Готовий до використання

Продовження: Буфер TRIS-EDTA

обсяг: 1 x 4 мл/флакон, коричневий ковпачок

Стандарти і контролі – готові до використання

Кат. номер	Компонент	Флакони	нг/мл	нмоль/л	флакони
			ADR	ADR	
BA R-5601	Standart A	білий	0	0	4 мл
BA R-5602	Standart B	світло жовтий	0,5	2,7	4 мл
BA R-5603	Standart C	помаранчовий	1,5	8,2	4 мл
BA R-5604	Standart D	темно-синій	5	27	4 мл
BA R-5605	Standart E	світло-сірий	20	109	4 мл
BA R-5606	Standart F	чорний	80	437	4 мл
BA R-5651	Control 1	світло-сірий	Зверніться до КЯ - звіту		4 мл
BA R-5652	Control 2	темно-червоний	для очікуваних значень і прийняттого діапазону		4 мл

Перетворення: Адреналін (нг/мл) x 5,46 = адреналін (нмоль/л)
 Кислий буфер з безртутним стабілізатором, з додаванням певної кількості адреналіну
 Зміст:

BA R-6611 ACYL-BUFF **Буфер ацилювання** – Готовий до використання буфер з легким лужним рН для ацилювання

BA R-6614 1 x 20 мл/флакони, білий ковпачок

BA R-6615 **Коензим** – Готовий до використання S-аденозил-L-метіонін

BA R-6615 1 x 4 мл/флакони, фіолетовий ковпачок

BA R-6618 **Фермент** – Ліофілізований Катехол-О-метилтрансфераза

BA R-6618 4 флакони, рожевий ковпачок

BA R-6619 EXTRACT-PLATE **Екстракційний планшет** – Готовий до використання

BA R-6619 2 x 48-лункові планшети, вкриті боронатним афінним гелем, у пакеті, що закривається

BA R-6619 HCL **Соляна кислота** – Готова до використання 0,025 М соляна кислота, жовтого кольору 1 x 20 мл/флакони, темно-зелений ковпачок

4.2 Додаткові матеріали та обладнання необхідні, але не входять до набору

- Калібровані прецизійні піпетки для дозування об'ємів від 1 до 750 мкл; 1 мл
- Пристрій для миття мікропланшетів (ручний, напівавтоматичний або автоматичний)
- Рідер ІФА, здатний зчитувати поглинання при 450 нм і, якщо можливо, 620 – 650 нм
- Шейкер (амплітуда струшування 3 мм; прибіл. 600 об/хв)
- Інкубатор з контрольованою температурою (37 °С) або аналогічний нагрівальний пристрій
- Вбираючий матеріал (паперовий рушник)
- Вода (дейонізована, дистильована або надчиста)
- Вихровий змішувач

5. Збір і зберігання зразків

Зберігання: до 6 годин при 2 – 8 °С; на більш тривалій період (до 6 місяців) при -20 °С або -80 °С.
 Поради щодо збереження біологічного зразка: щоб запобігти розпаду катехоламіну, додайте до зразка ЕДТА (кінцева концентрація 1 мМ) і метабісульфіт натрію (кінцева концентрація 4 мМ).

6. Процедура аналізу

Перед використанням дайте реагентам і зразкам нагрітися до кімнатної температури та ретельно перемішайте, обережно перевертаючи. Рекомендується повторювати визначення. Рекомендується пронумерувати стріпи мікропланшета перед використанням, щоб уникнути будь-якої плутанини.

Зв'язування антисироватки і кон'югату ферменту, а також активність ферменту залежать від температури. Чим вища температура, тим вищими будуть показники поглинання. Змінний час інкубації матиме подібний вплив на абсорбцію. Оптимальна температура під час проведення імуноферментного аналізу становить 20–25 °С.

⚠ У разі переповнення протягом 10 хвилин зчитайте абсорбцію розчину в лунках, використовуючи рідер для мікропланшетів, встановлений на 405 нм.

6.1 Приготування реактивів

Промивний буфер

Розведіть 20 мл концентрату промивного буфера водою (дейонізованою, дистильованою або ультрачистою) до кінцевого об'єму 1000 мл.

Зберігання: 2 місяці при 2 – 8 °С

Розчин ферменту

Розчиніть вміст флакона з позначкою «Ензим» 1 мл води (дейонізованої, дистильованої або ультрачистої) і ретельно перемішайте. Додайте 0,3 мл коензиму, а потім 0,7 мл коригувального буфера. Загальний об'єм розчину ферменту 2,0 мл.

⚠ Розчин ферменту необхідно приготувати свіжим перед аналізом (не більше 10– за 15 хвилин). Викинути після використання!

Мікротитрувальні стріпи адреналіну

У рідкісних випадках залишки блокуючого та стабілізуючого реагенту можна побачити в лунках у вигляді маленьких білих крапок або ліній. Ці залишки не впливають на якість продукту.

Реагент ацилювання

Реагент для ацилювання (ВА Е-6612) має температуру замерзання 18,5 °С. Щоб переконатися, що реагент для ацилювання є рідким під час використання, необхідно переконатися, що реагент для ацилювання досяг кімнатної температури та утворює однорідний розчин без кристалів перед використанням.

6.2 Підготовка зразку Високочутливий ІФА АДРЕНАЛІН — це гнучка система для різних типів біологічних зразків і об'ємів.

Неможливо дати загальну пораду щодо підготовки зразків. Однак наведені нижче основи повинні допомогти досліднику адаптувати версію протоколу до його конкретних потреб.

- Уникайте надлишку кислоти: надлишок кислоти може перевищити буферну ємність екстракційного буфера.
РН > 7,0 під час екстракції є обов'язковим.
- Запобігайте деградації адреналіну, додавши до зразка консерванти (див. Відбір та зберігання зразків).
- Уникайте хаотропних хімічних речовин, таких як хлорна кислота. Високий вміст солі може зменшити відновлення адреналіну. Якщо ваші зразки вже містять велику кількість хлорної кислоти, нейтралізуйте зразок перед етапом екстракції.
- Зразки тканин можна гомогенізувати в 0,01 N HCl у присутності ЕДТА та метабісульфіту натрію. За цих умов адреналін отримує позитивний заряд, що зменшує зв'язування з білками та оптимізує розчинність.
- Уникайте зразків, які містять речовини зі структурою цис-діолу. Це зменшить відновлення адреналіну.
- Будь ласка, доцільно виконати «Доказ принципу», щоб визначити відновлення адреналіну у ваших зразках. Приготуйте основний розчин адреналіну. Додайте невеликі кількості (щоб змінити нативний зразок матриці якомога менше) вихідних розчинів до матриці зразка та перевірте відновлення.
- Використаний обсяг зразка визначає чутливість цього тесту. Визначте об'єм зразка, необхідний для визначення адреналіну у вашому зразку, досліджуючи різні обсяги зразка.
- Якщо вам потрібна допомога у створенні протоколу для ваших конкретних цілей, не соромтеся звертатися безпосередньо до виробника!

6.3 Екстракція та ацилювання

Високочутливий ІФА АДРЕНАЛІН пропонує гнучку систему тестування для різних типів і об'ємів біологічних зразків. Крок 1 процедури екстракції залежить від об'єму зразка:

- якщо у вас є об'єм зразка від 1 до 100 мкл, дотримуйтесь 1.1
- якщо у вас є об'єм зразка від 100 до 500 мкл, дотримуйтесь 1.2
- якщо у вас є об'єм зразка від 500 до 750 мкл, виконайте 1.3

⚠ У серії можна вимірювати лише зразки з однаковим об'ємом!

1.	1.1 Об'єм зразка 1 – 100 мкл	1.2 Об'єм проби 100 – 500 мкл	1.3 Об'єм зразка 500 – 750 мкл
	Прокачайте у відповідні лунки Екстракційного планшета: стандарт 10 мкл, 10 мкл контролю та 1 – 100 мкл зразок. Заповніть кожну лунку водою (дейонізований, дистильований або ультра-чистої) до кінцевого об'єму 100 мкл [наприклад, 10 мкл стандарт плюс 90 мкл води (дейонізованої, дистильованої, або ультрачистої)].	Прокачайте у відповідні лунки Екстракційного планшета: стандарт 10 мкл, 10 мкл контролю та 100 – 500 мкл зразок. Заповніть кожну лунку водою (дейонізованою, дистильованою або ультрачистою) до кінцевого об'єму 500 мкл [наприклад, 10 мкл стандарту плюс 490 мкл води (дейонізованою, дистильованою або ультра-чистою)].	Прокачайте у відповідні лунки Екстракційного планшета: стандарт 10 мкл, 10 мкл контролю та 500 – 750 мкл зразок. Наповніть кожну лунку водою (дейонізованою, дистильованою або ультра-чистою) до кінцевого об'єму 750 мкл [наприклад, 10 мкл стандарт плюс 740 мкл води (дейонізованою, дистильованою, ^{надається} або ультрачистою)].
2.	Внесіть 25 мкл ТЕ буфера в усі лунки.		
3.	Покрийте планшет клейкою фольгою. Збовтуйте 60 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °C) на шейкері (приблизно 600 об/хв).		
4.	Зніміть фольгу і спорожніть тарілку. Витріть насухо, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.		
5.	Внесіть 1 мл промивного буфера в усі лунки.		
6.	Струсіть 5 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °C) на шейкері (приблизно 600 об/хв).		
7.	Витріть насухо, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.		
8.	Промити ще раз як описано (кроки 5, 6 і 7)!		
9.	Внесіть 150 мкл буфера для ацилювання в усі лунки.		
10.	Внесіть 25 мкл ацилюючого реагенту і в усі лунки.		
11.	Струсіть 20 хв при кімнатній температурі (20–25 °C) на шейкері (прибл. 600 об/хв).		
12.	Спорожніть планшет та промокніть насухо, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.		
13.	Внесіть 1 мл промивного буфера в усі лунки.		
14.	Струсіть 5 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °C) на шейкері (приблизно 600 об/хв).		
15.	Витріть насухо, постукавши перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.		
16.	Промити ще раз як описано (кроки 13, 14, 15).		
17.	Внесіть 100 мкл соляної кислоти в усі лунки.		
18.	Накрийте планшет клейкою плівкою. Збовтуйте 10 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °C) на шейкері (приблизно 600 об/хв).		
	⚠ Не зливайте супернатант після цього! Для подальшого ферментативного перетворення необхідно 90 мкл супернатанту		

6.4 Ферментативне перетворення

1.	Внесіть 90 мкл екстрагованих стандартів, контролів і зразків у відповідні лунки Мікропланшета		
2.	Додайте 25 мкл розчину ферменту (див. 6.1) до всіх лунок.		
3.	Накрийте планшет клейкою плівкою. Струсіть 1 хвилину при кімнатній температурі (20–25 °C) на шейкері (приблизно 600 об/хв), щоб перемішати. Інкубуйте протягом 2 годин при 37 °C. Наступні обсяги супернатантів необхідні для подальшого ІФА:		
	Адреналін	100 мкл	

6.5 ІФА на адреналін

1.	Внесіть 100 мкл стандартів, контролів і зразків із планшета для ферментів (див. 6.4) у відповідні стріпи для мікротитрування з адреналіном, попередньо вкриті покриттям.
2.	Внесіть 50 мкл відповідної адреналінової антисироватки в усі лунки.
3.	Покрийте планшет клейкою фольгою. Струсіть 1 хв при кімнатній температурі (20–25 °C) на шейкері (приблизно 600 об/хв).
4.	Інкубуйте протягом 15-20 годин (протягом ночі) при 2-8 °C.
5.	Зняти фольгу. Викиньте або аспіруйте вміст лунок. Промийте планшет 4 рази, додавши 300 мкл промивного буфера, викинувши вміст і промокаючи кожного разу, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
6.	Внесіть 100 мкл ферментного кон'югату в усі лунки.
7.	Інкубуйте 30 хв при кімнатній температурі (20–25 °C) на шейкері (приблизно 600 об/хв).
8.	Видаліть або аспіруйте вміст лунок. Промийте планшет 4 рази, додавши 300 мкл промивного буфера, викинувши вміст і щоразу промокаючи, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
9.	Внесіть 100 мкл субстрату в усі лунки.
10.	Інкубуйте 20–30 хв при кімнатній температурі (20–25 °C) на шейкері (приблизно 600 об/хв).
⚠	Уникайте впливу прямих сонячних променів!
11.	Внесіть 100 мкл стоп-розчину в усі лунки.
12.	Прочитайте поглинання розчину в лунках протягом 10 хвилин, використовуючи пристрій для зчитування мікропланшетів, налаштований на 450 нм (якщо є, рекомендована еталонна довжина хвилі від 620 нм до 650 нм).

7. Підрахунок результатів

Стандартна крива, з якої можна зчитати концентрації зразків, отримується шляхом побудови графіка показників поглинання (обчисліть середнє значення поглинання), виміряних для стандартів (лінійна, вісь ординат), проти відповідних стандартних концентрацій (логарифмічна, вісь абсцисс). Використовуйте нелінійну регресію для підгонки кривої (наприклад, 4-parameter, Marquardt).

⚠ Цей тест є конкурентним аналізом. Цей показник: значення ОГ зменшуються зі збільшенням концентрації аналіту. Значення ОГ, знайдені нижче стандартної кривої, відповідають високим концентраціям аналіту в зразку і мають бути повідомлені як позитивні.

⚠ Концентрації зразків, взяті зі стандартної кривої, необхідно помножити на поправочний коефіцієнт.

$$\text{Поправочний коефіцієнт} = \frac{10 \text{ мкл (об'єм екстрагованих стандартів)}}{\text{об'єм зразка (мкл) екстрагований}}$$

приклад

750 мкл зразка екстрагують і концентрацію, взяту зі стандартної кривої, становлять 0,45 нг/мл адреналіну.

Поправочний коефіцієнт = $10/750 = 0,013$

Концентрація зразка = $0,45 \text{ нг/мл} \times 0,013 = 0,006 \text{ нг/мл} = 6 \text{ пг/мл}$ адреналіну

Перетворення

Адреналін (нг/мл) $\times 5,46 =$ адреналін (нмоль/л)

7.1 Контроль якості

Межі довірчої вірогідності контролів набору вказано у звіті про контроль якості.

8. Характеристика аналізу

Аналітична специфічність (перехресна реактивність)	Речовина	Перехресна реактивність (%)	
		Адреналін	
	Похідний адреналіну	100	
	Похідний норадреналіну	0,20	
	Похідний дофаміну	< 0,0007	
	Метанефрин	0,64	
	Норметанефрин	0,0009	
	3-метокситирамін	< 0,0007	
	3-метокси-4-гідроксифенілгліколь	0,03	
	Тирамін	< 0,0007	
фенілаланін, кофеїнова кислота, L-допа, гомованілова кислота, тирозин, 3-метокси-4-гідроксимигдальна кислота	< 0,0007		

Чутливість (Межа виявлення)	Адреналін
C* = Коригувальний коефіцієнт (див. 7.)	0,25 нг/мл x C*

Аналітична чутливість (750 мкл нерозведеного зразка)	Адреналін
	3,3 пг/мл

Функціональна чутливість (750 мкл нерозведеного зразка)	Адреналін
	5 пг/мл

Точність				
В аналізі людська EDTA-плазма				
	Зразок	Середнє ± 3 SD (пг/мл)	СВ (пг/мл)	CV (%)
Адреналін	високий	1329,3 ± 372,6	124.2	9.3
	середній	412,1 ± 129,6	43.2	10.5
	низький	37,9 ± 19,5	6.5	17.1










В аналізі середовище клітинної культури (RPMI)				
	Зразок	Середнє ± 3 SD (пг/мл)	СВ (пг/мл)	CV (%)
Адреналін	високий	1649,6 ± 555,0	185	11.2
	середній	526,2 ± 186,6	62.2	11.8
	низький	38,7 ± 18,9	6.3	16.3

Відновлення адреналіну	Середнє (%)	Діапазон (%)	SD (%)	CV (%)
EDTA-плазма людини	104,0	89,4 – 128,3	13.1	12.6
Середовище клітинної культури	95.5	81,6 – 109,6	8.3	8.7

⚠ Щоб отримати літературу чи будь-яку іншу інформацію, зверніться до місцевого постачальника.

⚠ Відповідальність виробника обмежується заміною неякісної продукції. Виробник не несе відповідальності за будь-які збитки або витрати, що виникають прямо чи опосередковано внаслідок використання цього продукту.

Символи:

	Температура зберігання		Виробник		Містить достатньо для <n> тестів
	Термін придатності		Код партії		
	Зверніться до інструкцій для використання		Зміст		
	Обережно		Каталожний номер		Дистриб'ютор
	Дата виготовлення				Тільки для дослідницького використання!