

IBL

## Serotonin ELISA СЕРОТОНИН

*Иммуноферментный набор для количественного определения in vitro серотонина в человеческой сыворотке, плазме, тромбоцитах, гомогенатах тканей, моче и супернатантах клеточных культур.*

Кат. №RE59121

Версия: 2012\_03

### 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

Иммуноферментный набор предназначен для количественного определения in vitro серотонина в человеческой сыворотке, плазме, тромбоцитах, моче. Набор также может использоваться для исследования тканевых гомогенатов и супернатантов клеточных культур.

### 2. ВВЕДЕНИЕ

Серотонин является промежуточным продуктом метаболизма триптофана, происходящего в основном в этерохромаффинных клетках тонкого кишечника, в серотонинэргических нейронах мозга, в тромбоцитах крови. Серотонин считается нейротрансмиттером центральной нервной системы.

Почти весь серотонин в циркулирующей крови сконцентрирован в тромбоцитах. Изменение концентрации циркулирующего серотонина наблюдалось в некоторых физиологических условиях, включая хроническую головную боль напряжения, шизофрению, гипертензию, болезнь Хантингтона или наследственную хордотомию, мышечную дистрофию Дюшенна и раннюю стадию острого аппендицита. Определение уровней сывороточного серотонина имеет большое клиническое значение для диагностической оценки карциноидного синдрома. В ближайшем будущем ожидается появление повышенного интереса к определению серотонина в тромбоцитах, включая кинетику поступления серотонина в тромбоциты и выброса наружу.

### 3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Подготовка образцов, включающая превращение серотонина в N-ацилсеротонин, с одновременным разведением образца, выполняется инкубацией образца с ацилирующим реагентом. Процедура определения основана на принципе конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (конкурентный ELISA).

Биотинилированные и небитинилированные антигены конкурируют за ограниченное число сайтов связывания специфических антител, иммобилизованных на твердой фазе. Количество биотинилированных антигенов, связывающихся с этими антителами, обратно пропорционально концентрации анализируемого вещества в образце. После уравнивания системы несвязавшиеся биотинилированные антигены удаляются при промывке. Количество биотинилированных антигенов, связавшихся с антителами, определяют с помощью конъюгата антител к биотину с щелочной фосфатазой и субстрата р-нитрофенилфосфата (pNPP). Концентрацию антигена в исследуемых образцах рассчитывают сравнением оптической плотности в образцах с калибровочной кривой, построенной с использованием стандартов с известными концентрациями.


### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор – только для диагностики in vitro. Для использования специалистами.
2. Перед постановкой анализа внимательно прочитайте всю инструкцию. Используйте действующую версию инструкции, поставляемую с набором. Убедитесь в полном понимании всех этапов метода. За более подробной информацией (клиническая значимость, характеристики метода, протоколы для автоматизированной процедуры, альтернативные применения, литература и т.д.) обращайтесь на сайт производителя или к эксклюзивному представителю IBL, компании БиоХимМак.
3. В случае повреждения упаковки набора, не используйте набор для анализа и свяжитесь с вашим поставщиком, не позднее чем в течение одной недели после получения заказа. Заявки по поводу повреждения упаковки должны быть направлены в письменном виде. Не используйте поврежденные компоненты, но храните их соответствующим образом до завершения обработки претензии.
4. Проверяйте номер лота и дату годности набора. Не смешивайте реагенты из разных лотов. Не используйте наборы с истекшим сроком годности.
5. Соблюдайте меры безопасности, принятые в вашей лаборатории. Работайте с реагентами и образцами в лабораторной одежде, одноразовых латексных перчатках и по необходимости в защитных очках, если необходимо.
6. Реагенты данного набора содержат опасные вещества, которые могут вызвать раздражение глаз, кожи и слизистой. Избегайте прямого контакта. Более подробная информация о составе реагентов приводится в разделе «Поставляемые реагенты» и на этикетках. Сведения о безопасности материалов приводятся на сайте производителя.
7. Химические вещества и приготовленные или использованные реагенты этого набора необходимо утилизировать как опасные отходы, в соответствии с принятыми нормами химической и биологической безопасности.
8. Избегайте контакта со стоп-раствором, он может вызвать раздражение кожи и химические ожоги.

## 5. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Набор Serotonin-ELISA при транспортировке не требует соблюдения особого температурного режима. Полученный набор должен храниться при температуре 2-8°C. Не допускайте попадания прямых солнечных лучей и нагревания. Условия хранения образцов и приготовленных реагентов описаны в соответствующих параграфах инструкции. Стрипы после вскрытия упаковки могут храниться до указанного срока годности, если пакет со стрипами плотно закрыт и хранится при 2-8°C.

## 6. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

	Некоторые продукты содержат значительные количества серотонина. Кроме того, некоторые лекарства могут повысить секрецию серотонина, и могут вызвать изменения его уровня. Пациенты должны воздерживаться от употребления продуктов, богатых серотином (авокадо, бананы, кофе, сливы, ананасы, помидоры, грецкие орехи) и некоторых лекарственных препаратов (аспирин, кортикотропин, α-метилдопа, ингибиторы МАО, фенацетин, катехоламины, резерпин, никотин).
---	--

### Сыворотка

Кровь из вены берут обычным способом. Не допускайте загрязнения образцов крови какими-либо химическими веществами с момента забора до момента анализа. Не используйте сыворотки с сильным гемолизом, желтухой и липемией. Если образец мутный, его необходимо центрифугировать перед тестированием для удаления частиц.

Условия хранения:	18-25°C	2-8°C	< -20°C (аликвоты)
Срок хранения	2 часа	6 часов	3 месяца
Предохранять от прямых солнечных лучей и нагревания. Избегать повторных циклов оттаивания-замораживания.			

### Моча

Для тестирования данным методом можно использовать образцы суточной или спонтанной мочи. Общий объем мочи, выделенной за 24 часа необходимо собрать и смешать в одном сосуде, содержащем 10 - 15 мл 6 N HCl в качестве консерванта.

Для расчета результатов определите общий полученный объем мочи. Перед анализом образцы необходимо перемешать и центрифугировать.

Условия хранения:	< -20°C (аликвоты)
Срок хранения	6 месяцев
Предохранять от прямых солнечных лучей и нагревания. Избегать повторных циклов оттаивания-замораживания.	

### Плазма и тромбоциты

Более 98% циркулирующего серотонина находится в тромбоцитах, из которых он высвобождается при свертывании крови. Кровь собирают из вены в пластиковые пробирки, содержащие ЭДТА или цитрат в качестве антикоагулянтов. Образцы хранят и центрифугируют при комнатной температуре в течение 10 мин (200 x g), для получения **плазмы, богатой тромбоцитами (PRP)**. Перенесите PRP-супернатант в другую пробирку, и подсчитайте концентрацию тромбоцитов.

IBL Serotonin ELISA, кат. №RE59121

© Перевод на русский язык ЗАО «БиоХимМак», Москва, 939-58-08 факс: 939-09-97

Для получения **тромбоцитов**, отберите в центрифужную пробирку 200 мкл PRP-супернатанта (с концентрацией тромбоцитов от 350000 до 500000 клеток/мкл), добавьте 800 мкл физиологического раствора и центрифугируйте с охлаждением (4 °C) в течение 10 мин при 4500 x g или 2 мин при 10000 x g. Удалите супернатант. К осадку тромбоцитов добавьте 200 мкл бидистиллированной воды. Полученные таким образом образцы могут храниться замороженными при -20 °C в течение нескольких недель, без каких-либо изменений концентрации серотонина. После размораживания образцы необходимо центрифугировать при 10 000 x g в течение 2 минут при комнатной температуре. Для тестирования используют **20 мкл** полученного супернатанта (см. раздел «Ацилирование»).

Для получения **плазмы, свободной от тромбоцитов**, (PFP) часть супернатанта еще раз центрифугируют (10 мин при 4 °C и при 4500 x g или 2 мин при 4 °C и при 10000 x g). Для измерения свободного (не связанного с тромбоцитами) серотонина данным методом необходимо 50 мкл супернатанта (см. раздел Ацилирование).

**Замечание:** Показано, что при прямом определении серотонина в PRP для 10 % образцов PRP в результате измерений HPLC и флуориметрическим методом получены непрогнозируемые высокие концентрации серотонина. Чтобы избежать несоответствий, проводите измерения серотонина в тромбоцитах и в PFP отдельно.

Прямое определение серотонина в **обогащенной тромбоцитами плазме** в 10% случаев не говорит о высокой концентрации серотонина в образце (результаты получены методами HPLC флуориметрией). Во избежание ошибок рекомендуется проводить независимые измерения серотонина в **тромбоцитах** и **свободной от тромбоцитов плазме**.

	Плазма свободная от тромбоцитов	Тромбоциты (отделенные от плазмы)	
Условия:	< -20°C (аликвоты)	< -20°C (аликвоты)	< -80°C (аликвоты)
Срок хранения	2 недели	4 недели	1 год
Предохранять от прямых солнечных лучей и нагревания. Избегать повторных циклов оттаивания-замораживания. Перевозку осуществлять в замороженном состоянии.			

### Гомогенаты тканей и супернатанты клеточных культур

После центрифугирования супернатанты клеточных культур и гомогенаты тканей можно тестировать без специальной подготовки.	
<b>Внимание:</b> культуральные среды могут содержать серотонин!	
Условия:	< -20°C (аликвоты)
Срок хранения	6 месяцев
Предохранять от прямых солнечных лучей и нагревания. Избегать повторных циклов оттаивания-замораживания.	

Версия: 2012\_03

тел.: (495) 647-2740 (многоканальный), 939-24-21, E-mail: [info@biochemmack.ru](mailto:info@biochemmack.ru)

## 7. Состав набора

1 x 12x8 <b>MTP</b>	<b>Микротитровальный планшет</b> Планшет разделяется на стрипы. Каждый стрип содержит 8 лунок, покрытых козьей анти-кроличьей антисывороткой
1 x 7 мл <b>ANTISERUM</b>	<b>Антисыворотка к серотонину Голубого цвета.</b> Готовая к использованию кроличья антисыворотка в фосфатном буфере, 0,1% NaN <sub>3</sub> .
1 x 5 мл <b>BIOTIN</b>	<b>Биотинилированный серотонин Желтого цвета.</b> Готовый к использованию, содержит 0,1% NaN <sub>3</sub> .
1 x 0,2 мл <b>ENCONJ CONC</b>	<b>Ферментный Конъюгат (100x)</b> содержит козы антитела к биотину, конъюгированные с щелочной фосфатазой, Трис-буфер, HCl, 0,01% NaN <sub>3</sub> .
1 x 7 x 0,5 мл <b>CAL A-G</b>	<b>Стандарты А - G</b> готовые к использованию, содержат ацилированный серотонин в следующих концентрациях: 0; 0,08; 0,24; 0,73; 2,2; 6,6; 19,8 нг/мл 0; 0,45; 1,4; 4,1; 12,5; 37,4; 112,3 нмоль/л содержат фосфатный буфер и 0,1% NaN <sub>3</sub> .
1 x 2 x 0,5 мл <b>CONTROL 1+2 LYO</b>	<b>Контрольная Сыворотка, 1 и 2</b> лиофилизированная человеческая сыворотка, содержит 0,02% NaN <sub>3</sub> . Концентрация серотонина указана на этикетках флаконов
1 x 3 мл <b>ACYLREAG</b>	<b>Ацилирующий Реагент</b> готовы к использованию Содержит ангидрид уксусной кислоты и ацетон, готов к использованию
1 x 50 мл <b>ASSAYBUF CONC</b>	<b>Рабочий Буфер, концентрат (10x)</b> фосфатный буфер, содержащий БСА и 1% NaN <sub>3</sub> .
1 x 50 мл <b>WASHBUF CONC</b>	<b>Буфер для промывок, концентрат (20x)</b> Содержит фосфатный буфер, Твином, 0,1% тимерозал
2 x 12 мл <b>PNPP SUBS</b>	<b>Субстрат PNPP</b> Раствор p-нитрофенилфосфата (PNPP).
1 x 15 мл <b>PNPP STOP</b>	<b>Стоп-раствор</b> готов к использованию, Содержит 1 М NaOH
3 шт <b>FOIL</b>	<b>Адгезивные пленки для заклеивания стрипов</b>

## 8. МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

1. Микропипетки для внесения объемов 20; 25; 50; 100; 1000 мкл, например, обеспечивающие дозирование с погрешностью менее 3% (CV < 3%).
2. Одноразовые стеклянные пробирки (12 x 75 мм)
3. Штатив для пробирок
4. Орбитальный шейкер (500 rpm)
5. Вортекс
6. Водяная баня на 37°C
7. 8-канальный микродозатор и резервуары для реагентов к нему.
8. Автоматическое или полуавтоматическое промывающее устройство, емкость для буфера для промывок
9. Центрифуга  $\geq 1500$  x g

10. Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с фильтром на 405 нм (длина волны сравнения 600-650 нм)
11. Бидистиллированная или деионизированная вода
12. Бумажные салфетки, одноразовые наконечники, таймер

## 9. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА

1. Неправильное использование образцов или модификация процедуры анализа может отразиться на результате анализа. Вносимые объемы, время инкубации, температурный режим, последовательность стадий должны точно соответствовать, указанным в инструкции. Используемые микропипетки и другие инструменты должны быть точно откалиброваны.
2. Все стадии анализа должны проводиться без остановок. Убедитесь, что все материалы, реагенты и инструменты готовы для постановки. Выньте реагенты из холодильника и дайте им нагреться до комнатной температуры (18-25 °C), каждый флакон с реагентом необходимо аккуратно встряхнуть перед использованием. Перемешивайте реагенты, избегая образования пены.
3. Избегайте контаминации реагентов, микропипеток и пробирок. Используйте только новые одноразовые наконечники для каждого реагента, стандарта или образца. Не меняйте крышки на флаконах. Не используйте флаконы должны быть закрыты. Нельзя повторно использовать стрипы, пробирки, реагенты.
4. Некоторые компоненты набора содержат менее 250 мкл растворов. Перед вскрытием флакона убедитесь, что все содержимое находится на дне емкости.
5. Рекомендуется проводить анализ в дублях, чтобы заметить возможные погрешности микропипеток.
6. Во избежание ошибок сверяйтесь со схемой планшета, где вы указано расположение лунок с определенными образцами.
7. Время инкубации влияет на результат. Внесение образцов в лунки и промывку лунок необходимо проводить в одной той же последовательности и с одинаковыми периодами. Для внесения растворов в лунки рекомендуется использовать 8-канальный дозатор.
8. Процедура промывки лунок очень важна для качества постановки анализа. Неправильная промывка дает ошибочные результаты. Рекомендуется использовать для промывки многоканальный дозатор либо автоматический вошер. Нельзя высушивать лунки между стадиями инкубации. Не поцарапайте поверхности лунок при заливке и аспирации промывочного буфера. Аккуратно вносите все реагенты. При заливке промывочного буфера проверяйте, чтобы лунка точно заполнялась буфером. Не допускайте остатка промывочного буфера после стадии промывки.
9. Влажность влияет на покрытые лунки. Не открывайте пакет со стрипами, пока он не достигнет комнатной температуры. Неиспользуемые стрипы немедленно верните в пакет с осушителем и тщательно закройте пакет.
10. Относительная центробежная сила (g) не эквивалентна об/мин (rpm), но она может быть вычислена с учетом радиуса ротора центрифуги.

## 10. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Для ручной или автоматизированной процедуры

Данный набор рассчитан на проведение 96 определений, тестирование может быть проведено в 3 отдельных постановках.

Указанные ниже объемы рассчитаны для тестирования 4 стрипов в одной постановке (32 определения).

Если исполнитель хочет уменьшить количество стандартов с 7 до 6, то можно не анализировать стандарт G. В этом случае диапазон измеряемых значений сокращается до 155 мкг/л (для плазмы) или 706 мкг/л (для сыворотки, мочи, гомогенатов тканей и супернатантов клеточных культур).

При тестировании образцов сыворотки, мочи, экстрактов тромбоцитов, гомогенатов тканей и супернатантов клеточных культур, **НО НЕ ОБРАЗЦОВ ПЛАЗМЫ**, процедура метода может быть выполнена в сокращенном варианте, с инкубацией 3.5 часа. Альтернативно, с инкубацией в течение ночи, процедура может быть выполнена для всех образцов. При тестировании образцов плазмы **ВСЕГДА** необходимо проводить инкубацию в течение ночи.

### 10.1 Подготовка лиофилизированных или концентрированных реагентов

Развес-ти/растворить	компонент	Добавить	Разбавитель/растворитель	Соотношение	Замечания	хранение	Стабильность
15 мл	Рабочий буфер	150 мл	Бидист. вода	1:10	Может возникать желто-коричневое окрашивание, не влияет на результаты тестирования.	2-8°C	2 недель
15 мл	Буфер для промывок	300 мл	Бидист. Вода	1:20		2-8°C	4 недель
	Контроли	0.50 мл	Бидист. Вода		Оставьте на 15 минут. Перемешайте без образования пены	≤ -20°C (аликвоты)	До истечения срока годности
60 мкл	Ферментный конъюгат	6.0 мл	Разведенный рабочий буфер	1:101	Приготовьте свежий и используйте только сразу	18-25°C	2 часа

### 10.2 Разведение образцов


Если предполагается, что образец содержит концентрацию аналита выше, чем в самом высоком стандарте, то образец требуется развести рабочим буфером.

### 10.3 Ацилирование образцов и контролей (стандарты ацилировать не надо)


Существует 2 варианта процедуры для разных матриц образцов:

**Образец А:** Сыворотка, Моча, экстракт тромбоцитов, гомогенат ткани и контроли


**Образец В:** плазма, свободная от тромбоцитов

	<b>Не ацилируйте стандарты, они уже ацилированы!</b> В результате подготовки образцов к анализу происходит разведение сыворотки, мочи, тромбоцитов, тканевых гомогенатов и супернатантов клеточных культур <b>в 107 раз</b> , а плазмы - <b>в 23,5 раза</b> . Эти разведения необходимо учитывать при расчете результатов анализа.
---	--

#### 10.3.1 Образцы А: сыворотка, моча, экстракт тромбоцитов, гомогенат ткани и контроли

1	Внесите по 20 мкл контроля и образцов А в соответствующие стеклянные пробирки
2	Добавьте во все пробирки по 100 мкл разведенного рабочего буфера и перемешайте на вортексе.
3	Добавьте во все пробирки по 25 мкл ацилирующего реагента в каждую пробирку. <u>Перемешивайте содержимое каждой пробирки на вортексе немедленно после добавления ацилирующего реагента.</u>
4	Закройте пробирки и инкубируйте 15 мин при 37° на водяной бане.
5	Добавьте во все пробирки по 2 мл разведенного рабочего буфера и перемешайте на вортексе.
6	Центрифугируйте все пробирки 10 мин при 1500 x g.
	Приготовленные образцы должны быть проанализированы немедленно. Полученный супернатант стабилен в течение 1 часа при комнатной температуре (18-25°C).

#### 10.3.2 Образцы В: плазма свободная от тромбоцитов

1	Внесите по 50 мкл образцов В в стеклянные пробирки.
2	Добавьте во все пробирки по 100 мкл разведенного рабочего буфера и перемешайте на вортексе.
3	Добавьте во все пробирки по 25 мкл ацилирующего реагента в каждую пробирку. <u>Перемешивайте содержимое каждой пробирки на вортексе немедленно после добавления ацилирующего реагента.</u>
4	Закройте пробирки и инкубируйте 15 мин при 37° на водяной бане.
5	Добавьте во все пробирки по 1 мл разведенного рабочего буфера и перемешайте на вортексе.
6	Центрифугируйте все пробирки 10 мин при 1500 x g.
	должны быть проанализированы немедленно. Полученный супернатант супернатант стабилен в течение 1 часа при комнатной температуре (18-25°C).

## 11. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

### 11.1 Короткая процедура (Замечание: только для образцов А, но не для плазмы)

1	Внесите по 50 мкл каждого стандарта, ацилированных контролей и ацилированных образцов в соответствующие лунки микропланшета. <i>Зарезервируйте лунки для субстратного бланка.</i>
2	Добавьте по 50 мкл биотинилированного серотонина во все лунки, <i>кроме лунки для бланка.</i>
3	Добавьте по 50 мкл антисыворотки к серотонину во все лунки, <i>кроме лунки для бланка.</i>
4	Закройте планшет адгезивной пленкой и инкубируйте 90 минут при комнатной температуре (18 - 25°C) на орбитальном шейкере (500 rpm).
5	Удалите с планшета адгезивную пленку. Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку готовым буфером для промывок 3 раза по 250 мкл. После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постукая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
6	Добавьте в каждую лунку ( <i>кроме лунки для бланка</i> ) по 150 мкл свежее приготовленного ферментного конъюгата.
7	Закройте планшет адгезивной пленкой. Инкубируйте 60 мин при комнатной температуре (18-25°C) на орбитальном шейкере (500 rpm).
8	Удалите с планшета адгезивную пленку. Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку готовым буфером для промывок 3 раза по 250 мкл. После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постукая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
9	Для внесения субстратного раствора и стоп-раствора по возможности используйте 8-канальный дозатор. Внесение растворов должно выполняться в одном и том же порядке и с одинаковой скоростью. Избегайте образования пузырей.
10	Внесите в каждую лунку, включая лунки для бланка, по 200 мкл субстрата PNPP.
11	Инкубируйте в течение 60 мин при комнатной температуре (18-25°C) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
12	Остановите реакцию добавлением во все лунки по 50 мкл стоп-раствора. Коротко перемешайте содержимое лунок аккуратно постукая по краю микропланшета.
13	Измерьте в лунках оптическую плотность (ОП) при 405 нм с помощью ридера (длина волны сравнения 600-650 нм) в течение 60 минут после добавления стоп-раствора.

### 11.2 Альтернативная процедура с инкубацией в течение ночи (Образцы А и В)

#### 11.2.1 Первый день

1	Внесите по 50 мкл каждого стандарта, ацилированных контролей и ацилированных образцов в соответствующие лунки микропланшета. <i>Зарезервируйте лунки для субстратного бланка.</i>
2	Добавьте по 50 мкл биотинилированного серотонина во все лунки, <i>кроме лунки для бланка.</i>
3	Добавьте по 50 мкл антисыворотки к серотонину во все лунки, <i>кроме лунки для бланка.</i>
4	Закройте планшет адгезивной пленкой и инкубируйте 16-20 часов (в течение ночи) при 2-8°C.

#### 11.2.2 Второй день

1	Удалите с планшета адгезивную пленку. Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку готовым буфером для промывок 3 раза по 250 мкл. После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постукая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
2	Добавьте в каждую лунку ( <i>кроме лунки для бланка</i> ) по 150 мкл свежее приготовленного ферментного конъюгата.
3	Закройте планшет адгезивной пленкой. Инкубируйте 60 мин при комнатной температуре (18-25°C) на орбитальном шейкере (500 rpm).
4	Удалите с планшета адгезивную пленку. Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку готовым буфером для промывок 3 раза по 250 мкл. После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постукая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
5	Для внесения субстратного раствора и стоп-раствора по возможности используйте 8-канальный дозатор. Внесение растворов должно выполняться в одном и том же порядке и с одинаковой скоростью. Избегайте образования пузырей.
6	Внесите в каждую лунку, включая бланк, по 200 мкл раствора субстрата PNPP.
7	Инкубируйте в течение 30 мин при комнатной температуре (18-25°C) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
8	Остановите реакцию добавлением во все лунки по 50 мкл стоп-раствора. Коротко перемешайте содержимое лунок аккуратно постукая по краю микропланшета.
9	Измерьте в лунках оптическую плотность (ОП) при 405 нм с помощью ридера (длина волны сравнения 600-650 нм) в течение 60 минут после добавления стоп-раствора.

## 12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Результаты анализа можно считать достоверными, если процедура анализа была выполнена в полном соответствии с данной инструкцией. Кроме того, необходимо строго соблюдать правила GLP (Good Laboratory Practice, хорошей лабораторной практики) или иных норм качества, установленных в вашей лаборатории. Результаты, полученные при тестировании контролей, входящих в состав набора, должны лежать в диапазонах допустимых значений, указанных на этикетках флаконов.

Если эти критерии не выполняются, то постановка считается недействительной и тестирование должно быть выполнено еще раз. Каждая лаборатория должна использовать образцы с известными значениями для дополнительного контроля.

В случае повторного получения недостоверных результатов необходимо проверить следующие технические характеристики: сроки годности реагентов (приготовленных), условия хранения, пипетки, оборудование, условия инкубации и методику промывки.

Рекомендуется участвовать в соответствующих программах внешнего контроля качества.

## 13. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значение ОП субстратного бланка (субстрат + стоп-раствор) необходимо вычесть из значений ОП, полученных для стандартов, контролей и образцов).

Постройте калибровочную кривую с помощью соответствующего программного обеспечения или на полулогарифмической бумаге.

Полученные значения ОП стандартов откладывают по линейной оси Y, а соответствующие концентрации стандартов по логарифмической оси X. Рекомендуется использовать аппроксимацию кубическим сплайном, четырехпараметрическую или Logit-Log.

При построении калибровочной кривой используйте значения ОП всех стандартов (из значений, полученных для дублей, можно исключить одно резко отклоняющееся значение, и использовать второе, более подходящее).

Концентрация аналита в образцах может быть рассчитана из калибровочной кривой.

Так как в ходе анализа образцы были разведены, то для расчета значений концентраций в исходных образцах, в нг/мл, полученные из калибровочной кривой значения необходимо умножить на соответствующий коэффициент разведения:

Сыворотка, моча, тромбоциты, супернатант клеток,

гомогенат ткани, контроли: x 107

Плазма свободная от тромбоцитов: x 23,5

Если образцы были дополнительно разведены, то полученные результаты требуется умножить на соответствующий коэффициент разведения.

Данные анализа можно считать достоверными, если соблюдаются следующие условия:

50% ОП/ ОП<sub>макс</sub> (ED50) = 0.60 - 1.00 нг/мл (в среднем 0.8 нг/мл).

Δ ОП (ОП стандарта А – ОП стандарта G): ≥ 0,8 Ед ОП

Пересчет:

Серотонин (нг/мл) x 5,67=нмоль/литр

Образцы, концентрация аналита в которых выше концентрации в самом высоком стандарте должны быть разведены дополнительно, как это описано в данной инструкции, и проанализированы еще раз.

### 13.1 Расчет концентрации Серотонина в тромбоцитах:

Содержание серотонина в тромбоцитах определяется на 10<sup>9</sup> тромбоцитов.

Пример:

Концентрация серотонина 100 нг/мл.

Количество тромбоцитов в образце PRP: 300 000/мкл, что эквивалентно 60 000 000/200мкл PRP (200 мкл – объем экстракта). Для тестирования использовали 20 мкл экстракта, что эквивалентно 6 x 10<sup>6</sup> тромбоцитов.

Концентрация серотонина определена на 1 мл. Следовательно, использованный эквивалент тромбоцитов, 20 мкл, должен быть умножен на 50.

6 x 10<sup>6</sup> x 50 = 0.3 x 10<sup>9</sup> тромбоцитов/мл с концентрацией серотонина 100 нг.

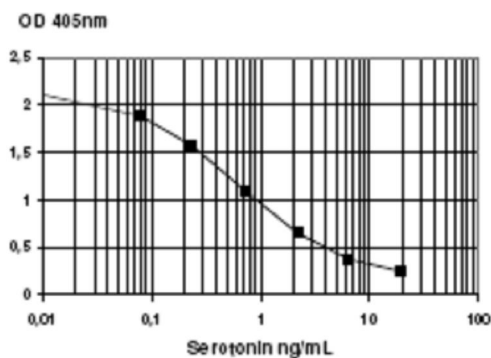
Конечная концентрация серотонина в тромбоцитах составляет 333 нг/10<sup>9</sup> тромбоцитов (100 нг серотонина x 1.0 x 10<sup>9</sup> / 0.3 x 10<sup>9</sup>).

### Типичный пример калибровочной кривой

Типичная кривая, полученная с использованием данного набора.

(Пример. Не использовать для расчетов!)

Стандарт	Серотонин концен трация (нг/мл)	Значения ОП	ОП/ОП макс (%)
A	0.0	2.118	100.0
B	0.08	1.883	88.9
C	0.24	1.568	74.0
D	0.73	1.089	51.4
E	2.2	0.641	30.3
F	6.6	0.369	17.4
G	19.8	0.245	11.6



### 14. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Результаты анализа не могут сами по себе являться основанием для каких-либо терапевтических заключений. Они должны соответствовать клинической картине и другим лабораторным тестам.

Для практически здоровых людей были получены следующие результаты: (97.5 % процентиль)

Тестируемый	n	Единицы	Среднее	Диапазон
Сыворотка	99	нг/мл	88.6	30 - 200
Плазма свободная от тромбоцитов	35	нг/мл	3.7	1.8-7.5
Тромбоциты	35	нг/10 <sup>9</sup> тромбоцитов	490	217-861
Суточная моча	49	мкг/день	83.1	≤200

Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно установить диапазон нормальных значений.

### 15. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Неправильное взятие образцов может существенно повлиять на качество результатов. Подробно процедура сбора и хранения образцов описана в разделе «Сбор и хранение образцов».

Данные по перекрестной реактивности приведены в разделе «Характеристики метода».

Азид и тимерозал в концентрациях выше 0,1% могут влиять на результаты анализа и приводить к получению ложных результатов.

Следующие компоненты крови в указанных концентрациях не оказывают значительного влияния (+/- 20 % ожидаемого) на результаты тестирования:

Гемоглобин	8,33 мг/мл
Билирубин	0,33 мг/мл

Версия: 2012\_03

тел.: (495) 647-2740 (многоканальный), 939-24-21,

E-mail: [info@biochemmack.ru](mailto:info@biochemmack.ru)

IBL Serotonin ELISA, кат. №RE59121

© Перевод на русский язык ЗАО «БиоХимМак», Москва, 939-58-08 факс: 939-09-97

## 16. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

<i>Аналитическая специфичность (Перекрестная реактивность)</i>	<i>Аналит</i>		<i>Перекрестная реактивность (%)</i>	
	<i>N-Ацил-Серотонин</i>		<i>100</i>	
	<i>5-НИАА</i>		<i>0,110</i>	
	<i>Мелатонин</i>		<i>0,040</i>	
	<i>5-Метокситриптамиин</i>		<i>0,015</i>	
	<i>3-индолакриловая кислота</i>		<i>&lt; 0.01</i>	
	<i>индол-3- пировиноградная кислота</i>			
	<i>3-индолуксусная кислота</i>			
	<i>5-метоксатриптофол</i>			
	<i>5-гирокси-L-триптофан</i>			
		<i>0,01</i>		
<i>Аналитическая чувствительность (предел определения)</i>	<i>Считано непосредственно из калибровочной кривой (Среднее значение нулевого стандарта - 2SD) (исходя из стандартной кривой)</i>			<i>Инкубация в течение ночи - 0,014 нг/мл</i>
				<i>Короткая процедура – 0,025 нг/мл</i>
	<i>Сыворотка, моча, тромбоциты, гомогенаты тканей, супернатанты клеточных культур(после умножения на коэффициент разведения)</i>			<i>Инкубация в течение ночи - 1,50 нг/мл</i>
				<i>Короткая процедура – 2,68 нг/мл</i>
		<i>Плазма</i>		<i>Инкубация в течение ночи - 0,33 нг/мл</i>
<i>Воспроизводимость</i>		<i>Диапазон (нг/мл)</i>	<i>CV (%)</i>	
<i>Внутри серии</i>	<i>Сыворотка</i>	<i>91 - 327</i>	<i>3.8 - 6.6</i>	
	<i>Моча</i>	<i>114 - 625</i>	<i>4.8 - 8.2</i>	
	<i>Плазма</i>	<i>7.1 - 247</i>	<i>3.7 - 11.5</i>	
<i>Между сериями</i>	<i>Сыворотка</i>	<i>30 - 402</i>	<i>6.0 - 13.4</i>	
	<i>Моча</i>	<i>105 - 744</i>	<i>8.1 - 14.5</i>	
	<i>Плазма</i>	<i>8.4 - 62</i>	<i>6.2 - 18.2</i>	
<i>Линейность</i>	<i>Диапазон (нг/мл)</i>		<i>Серийное разведение до</i>	<i>Диапазон (%)</i>
	<i>Сыворотка</i>	<i>226 - 1503</i>	<i>1:16</i>	<i>90 - 125</i>
	<i>Моча</i>	<i>677 - 1264</i>	<i>1:32</i>	<i>89 - 117</i>
	<i>Плазма</i>	<i>404 - 597</i>	<i>1:16</i>	<i>87 - 117</i>
<i>Извлечение</i>	<i>Среднее (%)</i>		<i>Диапазон (%)</i>	
	<i>Сыворотка</i>	<i>104</i>	<i>85 - 119</i>	
	<i>Моча</i>	<i>98</i>	<i>85 - 116</i>	
	<i>Плазма</i>	<i>100</i>	<i>83 - 120</i>	
<i>Сравнение с методом HPLC/с другим коммерчески доступным методом ИФА</i>	<i>Сыворотка</i>	<i>IBL-Assay = 0.90 x HPLC - 19.5</i>		<i>r = 0.945; n = 28</i>
	<i>Моча</i>	<i>IBL-Assay = 0.86 x ELISA + 20.0</i>		<i>r = 0.987; n = 32</i>
	<i>Тромбоциты</i>	<i>IBL-Assay = 1.05 x HPLC - 2.65</i>		<i>r = 0.98; n = 30</i>

## 17. ЛИТЕРАТУРА

См. английскую версию инструкции.

**Информация для заказа**  
**119991, Москва, Ленинские горы,**  
**ЗАО БиоХимМак**  
**Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),**  
**9392421, 9395808,**  
**факс (495) 939-09-97.**  
**e-mail: [info@biochemmack.ru](mailto:info@biochemmack.ru)**

## 17. КРАТКИЙ ПРОТОКОЛ ПРОЦЕДУР С КОРОТКОЙ И НОЧНОЙ ИНКУБАЦИЕЙ

Общее время анализа	<5 часов (короткая процедура)	18-22 часа (инкубация в течение ночи)	18-22 часа (инкубация в течение ночи)
Образцы	Сыворотка, моча, экстракты тромбоцитов, гомогенаты тканей, супернатанты клеточных культур	Сыворотка, моча, экстракты тромбоцитов, гомогенаты тканей, супернатанты клеточных культур	Плазма свободная от тромбоцитов
Подготовка образца:	<b>Не ацилируйте стандарты, они уже ацилированы!</b>		
Ацилирование			
Объем образца	20 мкл	20 мкл	50 мкл
Готовый рабочий буфер	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Ацилирующий реагент	25 мкл	25 мкл	25 мкл
Инкубация на водяной бане	15 минут при 37°C	15 минут при 37°C	15 минут при 37°C
Готовый рабочий буфер	2000 мкл	2000 мкл	1000 мкл
Центрифугирование	10 минут при 1500 x g	10 минут при 1500 x g	10 минут при 1500 x g
Пипетирование в лунки микропланшета			
стандарты/ацилированные образцы	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Биотинилированный серотонин	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Антисыворотка серотонину	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Инкубация образцов			
Время инкубации	90 минут	16-20 часов	16-20 часов
Температура инкубации	Комнатная температура (18-25°C)	2-8°C	2-8°C
Условия инкубации	На шейкере 500 rpm	Без шейкера	Без шейкера
Промывка	3 x 250 мкл	3 x 250 мкл	3 x 250 мкл
Инкубация с ферментом			
Разведенный ферментный конъюгат	150 мкл	150 мкл	150 мкл
Время инкубации	60 минут	60 минут	60 минут
Температура инкубации	Комнатная температура (18-25°C)	Комнатная температура (18-25°C)	Комнатная температура (18-25°C)
Условия инкубации	На шейкере 500 rpm	На шейкере 500 rpm	На шейкере 500 rpm
Промывка	3 x 250 мкл	3 x 250 мкл	3 x 250 мкл
Инкубация с субстратом			
Вносимый объем	200 мкл	200 мкл	200 мкл
Время инкубации	60 минут	30 минут	30 минут
Температура инкубации	Комнатная температура (18-25°C)	Комнатная температура (18-25°C)	Комнатная температура (18-25°C)
Условия инкубации	На шейкере 500 rpm	На шейкере 500 rpm	На шейкере 500 rpm
Стоп-раствор	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Измерение оптической плотности	405 нм (длина волны сравнения: 600 -650 нм)		