



## ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΕΑΒΑΑ-36, έκδοση 1η

### ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

#### Προσδιορισμός κορτιζόλης στο σάλιο με ενζυμικό ανοσοπροσδιορισμό

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Ο προσδιορισμός της κορτιζόλης στο σάλιο είναι χρήσιμος για την εκτίμηση του στρες αθλητών/-ριών και ασκουμένων. Πρόκειται για μια διαδικασία που στηρίζεται στη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού και απαιτεί μικρή ποσότητα σάλιου, η δειγματοληψία του οποίου περιγράφεται στην διαδικασία ΕΑΒΑΑ-13. Η μέθοδος αποτελεί έναν συνδυασμό ενζυμολογίας (δηλαδή δράσης ενζύμων) και ανοσολογίας (δηλαδή αλληλεπίδρασης αντισωμάτων και αντιγόνων) και στηρίζεται στη μεγάλη εκλεκτικότητα των ενζύμων και της σύνδεσης αντισώματος-αντιγόνου. Η ανάλυση πραγματοποιείται με τη χρήση συνόλου αντιδραστηρίων (κιτ). Προϋπόθεση για την εκτέλεση της διαδικασίας είναι η γνώση βασικών τεχνικών βιοχημικού εργαστηρίου.

Μια άγνωστη ποσότητα κορτιζόλης που υπάρχει στο δείγμα και μια σταθερή ποσότητα ιχνηθετημένης με ένζυμο (υπεροξειδάση χρένου) κορτιζόλης ανταγωνίζονται για τις θέσεις δέσμευσης αντισωμάτων κορτιζόλης που είναι προσδεσμένα χημικά σε βοθρία (δηλαδή μικρές κυψελίδες). Μετά από επώαση 2 ωρών, τα βοθρία πλένονται για να σταματήσει η αντίδραση ανταγωνισμού. Έπειτα εισάγεται ένα χρωμογόνο υπόστρωμα (tetramethylbenzidine, TMB), το οποίο, αντιδρώντας με τη βοήθεια του ενζύμου, παράγει έγχρωμο (μπλε) προϊόν. Η ένταση του μπλε χρώματος που αναπτύσσεται σχετίζεται αρνητικά με την ποσότητα της κορτιζόλης στο δείγμα. Μετά από επώαση 30 λεπτών, η αντίδραση τερματίζεται με οξίνιση μέσω προσθήκης διαλύματος 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Η συγκέντρωση κορτιζόλης στα δείγματα μπορεί να προσδιοριστεί απευθείας χρησιμοποιώντας καμπύλη αναφοράς που προκύπτει από πρότυπα διαλύματα.

### ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΑ ΠΡΟΣΩΠΑ

Όλα τα βήματα εκτελούνται από το ίδιο άτομο, τον/την αναλυτή/-ρια.

### ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

A/α	Είδος	Λεπτομέρειες
1	Αυτόματη πιπέτα	Των 10-100 μL
2	Αυτόματη πολυπιπέτα	Των 20-200 μL
3	Πλαστικό δοχείο (γούρνα) για χρήση πολυπιπέτας	
4	Πλαστικός υδροβολέας για τις πλύσεις	Των 500 mL
5	Φωτόμετρο μικροπλακιδίων	Rayto RT-2100C
6	Φυγοκεντρητής	Hettich Micro 22R
7	Αυτόματος αναδευτήρας	
8	Κυκλομείκτης	Vortex-Genie 2
9	Στατώ για φιαλίδια erpendorf	

### ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

A/α	Είδος	Λεπτομέρειες
1	Κιτ ανάλυσης κορτιζόλης στο σάλιο	Cortisol Saliva ELISA (RE52611), IBL (Hamburg, Germany)
2	Ρύγχη για αυτόματη πιπέτα	Κίτρινα, των 10-200 μL
3	Χαρτί κουζίνας	
4	Γάντια	Εξεταστικά μιας χρήσης
5	Απεσταγμένο νερό	

6	Λεπτός ανεξίτηλος μαρκαδόρος	
---	------------------------------	--

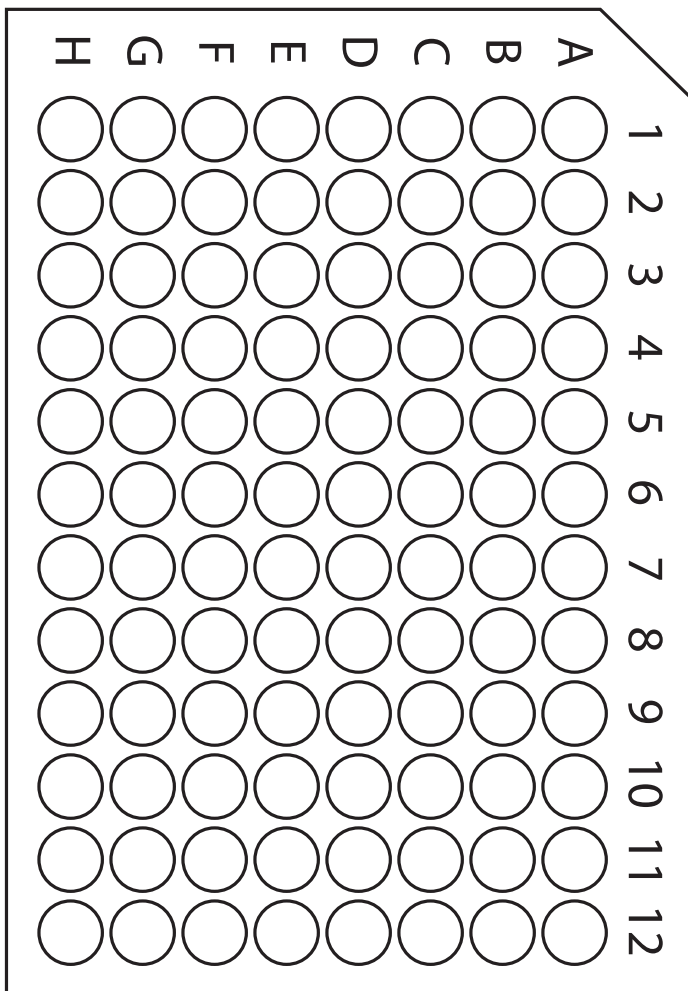
### ΒΗΜΑΤΑ

A/α	Τίτλος	Ενέργειες
1	Προετοιμασία ανάλυσης	Βγάζει τα δείγματα από τον καταψύκτη και το κιτ από το ψυγείο και τα αφήνει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
2	Αναπαράσταση μικροπλακιδίου	Τυπώνει την φόρμα μικροπλακιδίου που βρίσκεται στο τέλος της διαδικασίας και καταγράφει τις θέσεις όπου θα τοποθετήσει τα πρότυπα και τα δείγματα.
3	Ανάδευση	Αναδεύει στον κυκλομεικτη τα δείγματα και, με ελαφριά ανακίνηση, τα διαλύματα του κιτ.
4	Φυγοκέντρηση	Φυγοκεντρεί τα δείγματα για 10 min στα 3000 g.
5	Αρίθμηση μικροπλακιδίου	Αφαιρεί από το μικροπλακίδιο όσες σειρές βοθρίων δεν θα χρειαστεί και αριθμεί τις υπόλοιπες με μαρκαδόρο, έτσι ώστε, αν αποσπαστούν κατά τις πλύσεις που θα ακολουθήσουν, να μην μπερδευτεί η σειρά των δειγμάτων.
6	Τοποθέτηση προτύπων	Τοποθετεί εις διπλούν 50 μL από τα 6 πρότυπα διαλύματα A-F συγκέντρωσης 0, 0,015, 0,04, 0,17, 0,70 και 3 μg/dL. Όλες οι τοποθετήσεις πραγματοποιούνται από πάνω προς τα κάτω σε κάθε στήλη του μικροπλακιδίου.
7	Τοποθέτηση διαλυμάτων ελέγχου	Τοποθετεί εις διπλούν 50 μL από τα control 1 και 2.
8	Τοποθέτηση δειγμάτων σάλιου	Τοποθετεί εις διπλούν 50 μL από το κάθε δείγμα σάλιου.
9	Ετοιμασία για προσθήκη υποστρώματος	Αδειάζει το περιεχόμενο του φιαλιδίου με το Enzyme Conjugate στην ειδική γούρνα.
10	Προσθήκη υποστρώματος	Προσθέτει 100 μL Enzyme Conjugate σε κάθε βοθρίο με την αυτόματη πολυπιπέτα.
11	Επώαση μικροπλακιδίου για σύνδεση αντιγόνου στο αντίσωμα	Σκεπάζει το μικροπλακίδιο με αυτοκόλλητο φύλλο που περιλαμβάνεται στο κιτ και επωάζει στον αυτόματο αναδευτή για 2 h στην ταχύτητα 5 (500 rpm) σε θερμοκρασία δωματίου.
12	Παρασκευή διαλύματος πλύσεων	Παρασκευάζει διάλυμα πλύσεων τοποθετώντας 50 mL από το συμπυκνωμένο Wash 10x buffer σε πλαστικό υδροβολέα και προσθέτοντας 450 mL απεσταγμένο νερό.
13	Πλύσεις μικροπλακιδίου	Αδειάζει το περιεχόμενο του μικροπλακιδίου στον νιπτήρα και πλένει 4 φορές με το διάλυμα πλύσεων. Στο τέλος χτυπάει το μικροπλακίδιο ανεστραμμένο πάνω σε χαρτί κουζίνας για να φύγουν όλα τα υπολείμματα υγρού.
14	Προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος	Προσθέτει 100 μL TMB Substrate Solution σε κάθε βοθρίο με την πολυπιπέτα, οπότε παράγεται σταδιακά μπλε χρώμα, τόσο πιο έντονο, όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση της κορτιζόλης.
15	Επώαση μικροπλακιδίου για ανάπτυξη χρώματος	Σκεπάζει το μικροπλακίδιο με το αυτοκόλλητο και επωάζει στον αυτόματο αναδευτή για 30 min στην ταχύτητα 5 (500 rpm) σε θερμοκρασία δωματίου.
16	Ετοιμασία φωτομέτρου	Ανοίγει το φωτόμετρο σύμφωνα με την διαδικασία EABAA-23.
17	Τερματισμός αντίδρασης ανάπτυξης χρώματος	Τερματίζει την αντίδραση προσθέτοντας 100 μL TMB Stop Solution (1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) με την πολυπιπέτα (το χρώμα αλλάζει από μπλε σε κίτρινο).
18	Φωτομέτρηση	Φωτομετρά στα 450 nm (reference wavelength 600-650 nm) εντός 15 min σύμφωνα με την διαδικασία EABAA-23 με το Program 013

		Cortisol saliva του φωτομέτρου. Για να είναι έγκυρος ο προσδιορισμός, πρέπει οι τιμές των control να βρίσκονται μέσα στο εύρος που δίνει το κιτ.
19	Συμμάζεμα	Μετά το τέλος της μέτρησης, απορρίπτει όσα υλικά δεν χρειάζονται ή ήταν μιας χρήσης, πλένει τα σκεύη που χρησιμοποίησε και αποθηκεύει δείγματα και αντιδραστήρια που περίσσεψαν στον καταψύκτη και στο ψυγείο αντίστοιχα. Τέλος, τακτοποιεί στη θέση του ό,τι μεταχειρίστηκε.

Δημιουργήθηκε από	Ανατολή Πετρίδου
Ελέγχθηκε από	Βασίλη Μούγιο
Ημερομηνία	9 Μαΐου 2023

# ASSAY DIAGRAM



## USA

### Phoenix Pharmaceuticals, Inc.

330 Beach Rd.  
Burlingame, California 94010  
Tel: 650-558-8898, 800-988-1205  
Fax: 650-558-1686  
Info@PhoenixPeptide.com  
www.PhoenixPeptide.com

## Europe

### Phoenix Europe GmbH

Viktoriastrasse 3-5  
D-76133 Karlsruhe  
Germany  
Tel: +49 (721)-12 08 15 0  
Fax: +49 (721)-12 08 15 15  
Germany@PhoenixPeptide.com