



ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΕΑΒΑΑ-37, έκδοση 1η

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Προσδιορισμός α-αμυλάσης στο σάλιο με φωτομετρική μέθοδο

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Ο προσδιορισμός της α-αμυλάσης στο σάλιο είναι χρήσιμος για την εκτίμηση του στρες αθλητών/-ριών και ασκουμένων. Πρόκειται για μια διαδικασία μέτρησης της δραστικότητας του ενζύμου, σε μια μικρή ποσότητα σάλιου, η δειγματοληψία του οποίου περιγράφεται στην διαδικασία ΕΑΒΑΑ-13. Η α-αμυλάση διασπά το υπόστρωμα 2-χλωρο-4-νιτροφαινυλο-α-μαλτοτριόζη προς το έγχρωμο προϊόν 2-χλωρο-4-νιτροφαινόλη. Η ένταση του χρώματος που αναπτύσσεται είναι ανάλογη της καταλυτικής συγκέντρωσης της α-αμυλάσης στο δείγμα. Η ανάλυση πραγματοποιείται με τη χρήση συνόλου αντιδραστηρίων (κιτ). Προϋπόθεση για την εκτέλεση της διαδικασίας είναι η γνώση βασικών τεχνικών βιοχημικού εργαστηρίου.

ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΑ ΠΡΟΣΩΠΑ

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

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

A/α	Είδος	Λεπτομέρειες
1	Αυτόματες πιπέτες	Των 10-100, 20-200 και 500-5000 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	Κυκλομεικτήρας	Vortex-Genie 2
9	Στατώ για φιαλίδια erpendorf	
10	Φιάλη 500 mL	Γυάλινη ή πλαστική

ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

A/α	Είδος	Λεπτομέρειες
	Κιτ ανάλυσης α-αμυλάσης στο σάλιο	alpha-Amylase Saliva Assay (RE80111, IBL (Hamburg, Germany))
1	Ρύγχη για αυτόματη πιπέτα	Κίτρινα, των 10-200 μL
2	Ρύγχη για αυτόματη πιπέτα	Άχρωμα, των 500-5000 μL
3	Χαρτί κουζίνας	
4	Γάντια	Εξεταστικά, μιας χρήσης
5	Απεσταγμένο νερό	
6	Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες	Των 5 mL
7	Λεπτός ανεξίτηλος μαρκαδόρος	

ΒΗΜΑΤΑ

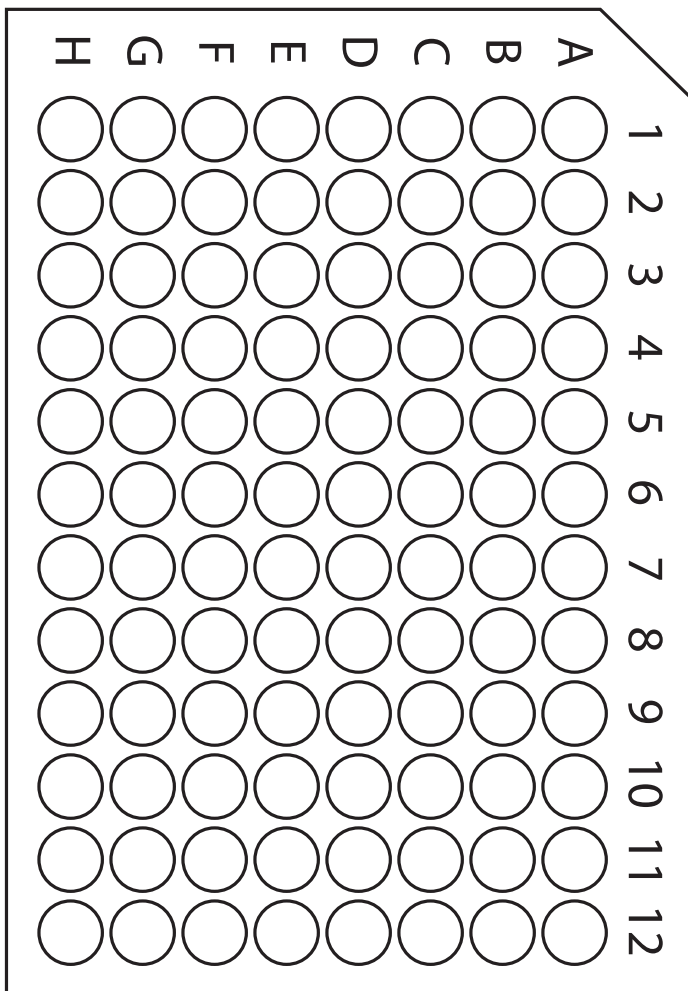
A/α	Τίτλος	Ενέργειες
1	Προετοιμασία ανάλυσης	Βγάζει τα δείγματα από τον καταψύκτη και το κιτ από το ψυγείο και τα αφήνει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.

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 κυκλομείκτη τα δείγματα και, με ελαφριά ανακίνηση, τα διαλύματα του κιτ.
4	Φυγοκέντρηση	Φυγοκεντρεί τα δείγματα για 10 min στα 3000 g.
5	Παρασκευή αραιωμένου διαλύματος δειγμάτων	Παρασκευάζει το αραιωμένο διάλυμα δειγμάτων (Diluted sample buffer) τοποθετώντας 40 mL από το συμπυκνωμένο διάλυμα (Sample Buffer Concentrate) σε καθαρή φιάλη 500 mL και προσθέτοντας 360 mL απεσταγμένο νερό.
6	Ανασύσταση προτύπου διαλύματος	Ανασυστήνει το λυοφιλισμένο πρότυπο προσθέτοντας 200 μL Diluted Sample Buffer και αφήνοντάς το για 15 min.
7	Ετοιμασία φωτομέτρου	Ανοίγει το φωτόμετρο σύμφωνα με την διαδικασία EABAA-23.
8	Παρασκευή αραιωμένων προτύπων διαλυμάτων με διαδοχικές αραιώσεις	Παρασκευάζει το πρότυπο 1 (400 U/mL) τοποθετώντας 10 μL από το ανασυστημένο πρότυπο και 3 mL από το Diluted Sample Buffer σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα κι αναδεύοντας καλά στον κυκλομείκτη. Παρασκευάζει το πρότυπο 2 (200 U/mL) τοποθετώντας 100 μL από το πρότυπο 1 και 100 μL από το Diluted Sample Buffer σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα κι αναδεύοντας καλά στον κυκλομείκτη. Παρασκευάζει το πρότυπο 3 (100 U/mL) τοποθετώντας 100 μL από το πρότυπο 2 και 100 μL από το Diluted Sample Buffer σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα κι αναδεύοντας καλά στον κυκλομείκτη. Παρασκευάζει το πρότυπο 4 (50 U/mL) τοποθετώντας 100 μL από το πρότυπο 3 και 100 μL από το Diluted Sample Buffer σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα κι αναδεύοντας καλά στον κυκλομείκτη. Το πρότυπο 5 (0 U/mL) αποτελείται από σκέτο Diluted Sample Buffer.
9	Παρασκευή αραιωμένων δειγμάτων και διαλυμάτων ελέγχου	Αραιώνει 1:301 κάθε δείγμα και διάλυμα ελέγχου (control) αναμειγνύοντας 10 μL από το δείγμα ή το control με 3 mL Diluted Sample Buffer σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα και αναδεύοντας καλά στον κυκλομείκτη.
10	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.
11	Τοποθέτηση προτύπων	Τοποθετεί εις διπλούν 10 μL από τα αραιωμένα πρότυπα διαλύματα 0–400 U/mL. Όλες οι τοποθετήσεις πραγματοποιούνται από πάνω προς τα κάτω σε κάθε στήλη του μικροπλακιδίου.
12	Τοποθέτηση διαλυμάτων ελέγχου	Τοποθετεί εις διπλούν 10 μL από τα αραιωμένα control 1 και 2.
13	Τοποθέτηση δειγμάτων σάλιου	Τοποθετεί εις διπλούν 10 μL από το κάθε αραιωμένο δείγμα σάλιου.
14	Ετοιμασία για προσθήκη υποστρώματος	Αδειάζει το περιεχόμενο του φιαλιδίου με το Substrate Solution στην ειδική γούρνα.
15	Προσθήκη υποστρώματος	Τοποθετεί 200 μL Substrate Solution σε κάθε βοθρίο με την πολυπιπέτα.
16	1η επώαση μικροπλακιδίου	Επώαζει για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου.
17	1η φωτομέτρηση	Φωτομετρά στα 405 nm (reference wavelength 600-690 nm) σύμφωνα με την διαδικασία EABAA-23.

18	2η επώαση μικροπλακιδίου	Επωάζει για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C). Σε υψηλότερη θερμοκρασία επωάζει για 3 min.
19	2η φωτομέτρηση	Φωτομετρά στα 405 nm όπως πριν.
20	Εξαγωγή αποτελεσμάτων	Υπολογίζει την αύξηση της απορρόφησης από την 1η στη 2η φωτομέτρηση. Κατασκευάζει στο Excel γράφημα διασποράς x,y με την αύξηση της απορρόφησης των προτύπων στον κατακόρυφο άξονα και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους στον οριζόντιο άξονα, προσθέτει στα στοιχεία του γραφήματος την γραμμή τάσης και από το βελάκι δεξιά από το «περισσότερες επιλογές», επιλέγει «προβολή εξίσωσης στο γράφημα». Μια τυπική εξίσωση έχει τη μορφή $y = 0.0024x + 0.0343$, όπου y είναι η αύξηση της απορρόφησης και x η καταλυτική συγκέντρωση (U/mL). (Η εξίσωση διαφέρει από μέτρηση σε μέτρηση.) Υπολογίζει την αύξηση της απορρόφησης για κάθε δείγμα και control (y) και λύνει την εξίσωση ως προς την καταλυτική συγκέντρωση (x). Για να είναι έγκυρος ο προσδιορισμός, πρέπει οι τιμές των control να βρίσκονται μέσα στο εύρος που δίνει το kit.
21	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	11 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