

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ (КАТ.№№ В-10451, В-10452)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для колориметрического определения активности аспаратаминотрансферазы по методу Райтмана-Френкеля в сыворотке крови в 200 и 1000 образцах при конечном объёме реакционной смеси 3 мл.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Аспаратаминотрансфераза катализирует обратимый перенос аминокрупп аспарагиновой кислоты на α -кетоглутаровую кислоту с образованием пировиноградной кислоты, которая определяется фотометрически при 505 нм по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином в щелочной среде.

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1 (P1). Субстратная смесь: L-аспарагиновая кислота – 0,1 моль/л, 2-оксоглутарат – 2 ммоль/л, фосфатный буфер – 0,1 моль/л, pH 7,4

Реагент 2 (P2). Раствор 2,4-динитрофенилгидразина – 1 ммоль/л

Реагент 3 (P3). Раствор гидроксида натрия – 8 моль/л.

Калибратор (пируват натрия) – 1 ммоль/л

Кат.№ Фасовка

В-10451 P1 1x50 мл + P2 1x50 мл + P3 1x25 мл + калибратор 3 мл

В-10452 P1 1x250 мл + P2 1x250 мл + P3 1x125 мл + калибратор 3 мл

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность – не более 50 нмоль пирувата натрия.

Линейность. Набор обеспечивает линейность при определении содержания пирувата натрия до 250 нмоль с отклонением не более 5%.

Коэффициент вариации – не более 5%.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Спектрофотометр, фотоэлектроколориметр, дозаторы, позволяющие отбирать объёмы от 0,01 мл до 5,0 мл, секундомер.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Приготовление 0,4 М раствора NaOH 25 мл реагента 3 развести достаточным количеством дистиллированной воды, охладить, довести объём раствора до 500 мл.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Длина волны 505 (490-520) нм.

Кювета с длиной оптического пути 10 мм.

Температура проведения реакции 37°C.

Приготовить пробы в соответствии со схемой определения (объёмы компонентов могут быть пропорционально изменены).

Схема определения

Раствор	Опытная проба	Холостая проба
Реагент 1, мл	0,25	0,25
Дистилл. вода, мл	–	0,05

Пробы перемешать и выдержать при температуре 37°C в течение 1-2 мин.

Образец, мл	0,05	–
-------------	------	---

Пробы перемешать и выдержать при температуре 37°C точно 60 мин.

Реагент 2, мл	0,25	0,25
---------------	------	------

Пробы перемешать и выдержать при комнатной температуре в течение 20 мин.

0,4 М раствор, NaOH, мл	2,50	2,50
-------------------------	------	------

Пробы немедленно перемешать, выдержать при температуре 18-25°C в течение 10 мин. и измерить оптическую плотность опытной пробы относительно холостой

РАСЧЁТ

Активность аспаратаминотрансферазы рассчитать по калибровочному графику.

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОГО ГРАФИКА

Для построения калибровочного графика приготовить пробы согласно Таблице.

Таблица

Раствор	Номера проб				
	1	2	3	4	5
Дистиллированная вода, мл	0,60	0,55	0,50	0,45	0,40
Калибратор, мл	–	0,05	0,10	0,15	0,20
Реагент 2, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Все пробы тщательно перемешать и выдержать при комнатной температуре в течение 20 мин.</i>					
0,4 М раствор NaOH, мл	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
<i>Все пробы тщательно перемешать, выдержать при комнатной температуре в течение 10 мин. и измерить оптическую плотность проб 2-5 против пробы 1 при 505 нм (490-540 нм).</i>					
Содержание пирувата натрия, нмоль	–	50	100	150	200
Активность фермента, мкмоль/(ч·мл)	–	1	2	3	4
Активность фермента, нмоль/(с·л)	–	278	556	834	1112

По результатам фотометрирования калибровочных проб построить график зависимости оптической плотности от активности фермента. По оси ординат отложить значение оптической плотности, по оси абсцисс – активность фермента (см. Таблицу). Калибровочный график должен иметь вид прямой, выходящей из начала координат.

При активности АСТ, равной 2-3 мкмоль/(ч·мл) сыворотку развести в 3 раза, равной 2,5-3 мкмоль/(ч·мл) – в 5 раз, равной 3,0-3,5 мкмоль/(ч·мл) – в 5 и 10 раз, равной 3,5-4,0 мкмоль/(ч·мл) – в 10 и 25 раз. Анализ повторить, полученный результат умножить на коэффициент разведения.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка крови. АСТ в сыворотке стабильна 24 ч при температуре 18-25°C, 28 суток при 4°C и не меньше 1 года при – 20°C [1,2].

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Параллельные пробы ставить обязательно.
2. Для приготовления 0,4 М раствора NaOH использовать дистиллированную воду, свободную от карбонатов.

НОРМАЛЬНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ

Справочно
0,1-0,68 мкмоль/(ч·мл) или 28-190 нмоль/(с·л).

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль качества может быть проведён по контрольным сывороткам, аттестованным данным методом.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться при температуре 2-8°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности (12 месяцев).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Во избежание возможного инфицирования при работе с образцами крови необходимо надевать одноразовые резиновые перчатки. При работе с набором необходимо соблюдать правила техники безопасности при работе с едкими и ядовитыми веществами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап. Под ред. В.В. Миньшикова, М., 1999, "Лабинформ".
2. Энциклопедия клинических лабораторных тестов. Под ред. проф. Н.У. Тица, М., 1997, "Лабинформ".