

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

НАЗНАЧЕНИЕ

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Аспартатаминотрансфераза катализирует обратимый перенос аминогрупп 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

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

V-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 объемы 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 объем 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 (объемы 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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап. Под ред. В.В.

Меньшикова, М., 1999, "Лабинформ".

2. Энциклопедия клинических лабораторных тестов. Под ред. проф. Н.У. Тица, М., 1997, "Лабинформ".

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться при температуре 2-8°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности (12 месяцев). Допускается хранение и транспортирование набора при температуре до +25°C не более 5 суток. Допускается однократное замораживание. Реагенты после вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2-8°C в течение всего срока годности набора.

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.