

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА МЕМБРАНАХ ИЗ АЦЕТАТЦЕЛЛЮЛОЗЫ (КАТ.№ В-41324)

Утверждена приказом Росздравнадзора от 26.11.2007 г. № 4230-Пр/07
РУ № ФСР 2007/01209 от 26.11.2007 г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для электрофоретического разделения белков сыворотки крови на мембранах из ацетатцеллюлозы с последующим денситометрическим определением белковых фракций в клинико-диагностических лабораториях и в научно-исследовательской практике. Контрольная сыворотка предназначена для контроля качества разделения белковых фракций сыворотки крови на мембранах из ацетатцеллюлозы.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип электрофоретического разделения белков основан на различной скорости движения молекул белков сыворотки крови в постоянном электрическом поле определённой напряжённости. Разделённые белковые фракции окрашиваются красителем. После денситометрического сканирования окрашенных фореграмм получают гистограмму распределения белковых фракций. Площадь под пиком белковой фракции пропорциональна содержанию этой фракции в сыворотке крови.

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1 (Р1). Буферный раствор, концентрат 200 мл
Реагент 2 (Р2). Краситель Пунцовый С 250 мл
Реагент 3 (Р3). Контрольная сыворотка, лиофилизат .. 1 фл.
Реагент 4 (Р4). Растворитель 2 мл

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ

(в комплект поставки не входят)

Уксусная кислота.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка крови, свободная от гемолиза, липемии и не желтушная.

Белковые фракции сыворотки крови стабильны в плотно закрытой пробирке при 18-25°C в течение 8 часов, при 2-8°C – в течение 3 дней, при -20°C – в течение 1 месяца [1].

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Прибор для электрофореза на мембранах из ацетатцеллюлозы, мембраны из ацетатцеллюлозы, денситометр или сканер.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

1.1. Приготовление буферного раствора

Буферный раствор следует готовить заранее. Готовый раствор должен быть выдержан не менее суток до применения.

Концентрат буферного раствора развести дистиллированной водой в 5 раз, готовый раствор имеет рН 8,6-8,8. Хранить готовый буферный раствор следует в холодильнике и заливать в камеру для электрофореза холодным. Буферный раствор стабилен не менее 3 месяцев при хранении при 2-8°C.

1.2. Приготовление контрольной сыворотки

Осторожно вскрыть флакон, добавить в него точно 2,0 мл растворителя. Закупорить флакон пробкой и осторожно перемешать, избегая пенообразования. Дать постоять в течение 30 минут, несколько раз перемешивая. Использовать только после полного растворения лиофилизата. Разведённую

сыворотку можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре 2-8°C – 3 суток, при -20°C – 1 месяц, при -70°C – неопределённо долгое время.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА, КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Проведение электрофореза

1.1. Сухие мембраны осторожно замочить в буфере для электрофореза, избегая быстрого их погружения и образования пузырей на поверхности. Выдержать 10 минут. Смоченные мембраны аккуратно промокнуть между листами плотной фильтровальной бумаги, не допуская их высыхания (при высыхании на мембране появляются белые пятна).

1.2. С помощью аппликатора нанести анализируемые образцы сыворотки крови или контрольную сыворотку на мембрану. Мембрану поместить в электрофоретическую камеру и подключить ток. Конкретные условия проведения электрофореза (напряжение, время фореза и др.) зависят от конструкции применяемой аппаратуры.

2. Обработка электрофореграммы

2.1. После отключения тока мембрану осторожно перенести в раствор красителя Пунцовый С на 5-10 минут, затем поместить в 5-7% раствор уксусной кислоты (набор «КлиниТест-ЭФ ПР») и, меняя раствор уксусной кислоты, отмыть мембрану до отбеливания фона.

Для получения хорошей фореграммы при использовании мембраны «Владипор» на плёночной основе следует избегать деформаций мембраны, поэтому лучше не перемещать мембрану, а осторожно менять обрабатывающие реагенты.

2.2. Электрофореграмму промерить на денситометре при длине волны 540 нм или обработать с помощью программы анализа электрофореграмм, поставляемой изготовителями приборов для электрофореза.

2.3. При необходимости мембрану можно сделать прозрачной, погружая её в осветляющий раствор (набор «КлиниТест-ЭФ ОР»).

ПРОВЕДЕНИЕ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контрольную сыворотку следует применять в тех же условиях, с теми же реагентами и оборудованием, что и анализируемые образцы.

1. Гистограмма распределения фракций контрольной сыворотки должна соответствовать гистограмме, приведённой в настоящей инструкции. Значения белковых фракций должны укладываться в диапазон аттестованных значений.

2. Если внешний вид гистограммы распределения фракций контрольной сыворотки соответствует приведённому в инструкции, но значения содержания белковых фракций не укладываются в интервалы допустимых значений, это может быть вызвано следующими причинами:

- избыточное количество нанесенной сыворотки (фореграмма перегружена, видны высокие фоновые значения белка, минимумы на фореграмме высокие, пики расположены близко друг к другу);

- недостаточное количество нанесенной сыворотки (фотограмма бледная, пики белковых фракций невысокие, неровные);

3. Если внешний вид гистограммы распределения фракций контрольной сыворотки не соответствует приведенному в инструкции, причиной может быть:

- неправильный режим электрофореза;
- «выработанность» буфера, о чём свидетельствуют сокращение длины разгонной дорожки, «наложение» белковых фракций друг на друга при обычных значениях тока, напряжения, времени электрофореза;
- нарушение условий и сроков хранения контрольной сыворотки.

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Альбумин 46,9-61,4%

Глобулины

альфа 1 2,2-4,2%

альфа 2 7,9-10,9%

бета 10,2-18,3%

гамма 17,6-25,4%

Примечание: Приведены нормальные значения согласно Приказу Минздрава СССР N 1175 от 21.11.1979 «Об унификации клинических лабораторных методов исследования».

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор необходимо хранить при температуре 2-8°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности (18 месяцев).

ЛИТЕРАТУРА

1. Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап. Под ред. В.В. Меньшикова, М., 1999, «Лабинформ», с. 138-139.

АТТЕСТАТ

Серия №	Годен до	
Содержание, %	Среднее значение*	Диапазон
Альбумин	62,5	56,3-68,7
α_1 -глобулин	3,6	2,7-4,5
α_2 -глобулин	9,6	7,3-11,9
β -глобулин	11,9	9,1-14,8
γ -глобулин	12,4	9,4-15,4

* Значения концентраций приведены в качестве примера.

ПРИМЕР ГИСТОГРАММЫ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ФРАКЦИЙ КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ

