

«СОГЛАСОВАНО»

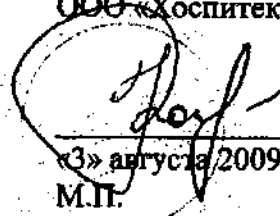
Главный врач
ФГУ РКНПК Росмедтехнологий



В.К.Ситина

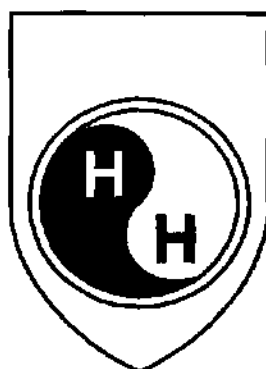
«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ООО «Хоспитекс Диагностика»



К.А.Константинов

«3» августа 2009 г.
М.П.



HOSPITEX DIAGNOSTICS

**ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ БУФЕРНЫЙ РАСТВОР ДЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО
ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ «СИМАЦЕЛЬ И»**

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
(МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА)**

**СОДЕРЖАНИЕ**

§1. БЕЛКИ СЫВОРОТКИ КРОВИ	3
1.1. Подготовка электрофоретической камеры к работе.....	3
1.2. Поддерживающий мостик (держатель мембран).....	3
1.3. Подготовка АЦ мембран.....	3
1.4. Нанесение исследуемых образцов.....	4
1.5. Проведение электрофореза.....	5
1.6. Окрашивание	5
1.7. Обесцвечивание фона и просветление мембран.....	5
1.8. Сканирование	6
1.9. Оценка результатов	6
1.10. Клиническое значение метода.....	6
§2. ЛИПОПРОТЕИДЫ.....	8
2.1. Приготовление буфера	8
2.2. Подготовка электрофоретической камеры к работе.....	8
2.4. Подготовка АЦ-мембран.....	8
2.5. Нанесение исследуемых образцов.....	9
2.6. Проведение электрофореза.....	9
2.7. Окрашивание	10
2.7.1. Краситель <i>SUDAN BLACK</i> (ОКРАСКА ЧЕРНАЯ).....	10
2.7.2. Краситель <i>SUDAN RED 7B</i> (ОКРАСКА КРАСНАЯ).....	10
2.8. Обесцвечивание фона	10
2.9. Сканирование	11
2.10. Оценка результатов	11
2.11. Клиническое значение метода.....	11
§3. ГЕМОГЛОБИНЫ	14
3.1. Приготовление гемолизата.....	14
3.2. Подготовка проб.....	14
3.3. Подготовка электрофоретической камеры к работе.....	14
3.4. Поддерживающий мостик (держатель мембран).....	15
3.5. Подготовка АЦ-мембран.....	15
3.6. Нанесение исследуемых образцов.....	15
3.7. Проведение электрофореза.....	16
3.8. Окрашивание	17
3.9. Обесцвечивание фона и просветление мембран.....	17
3.10. Сканирование	17
3.11. Клиническое значение метода.....	17
Фракции гемоглобинов.....	17
Патологические формы гемоглобина.....	18
ПРИЛОЖЕНИЕ	19



Система **Scanion** предназначена для микрizonaльного электрофореза биологических макромолекул на ацетате целлюлозы. Для **Scanion** разработаны методы и реагенты, обеспечивающие разделение в электрическом поле и последующее выявление фракций белков сыворотки крови, липопротеидов и гемоглобина.

Система для электрофореза **Scanion** рекомендована для использования в клинико-диагностических лабораториях.

§1. БЕЛКИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

1.1. Подготовка электрофоретической камеры к работе

Отсоедините электрический шнур электрофоретической (ЭФ) камеры от внешнего источника электропитания. Снимите крышку и уберите поддерживающий мостик из ЭФ камеры.

Налейте в ЭФ камеру 250-300 мл диагностического буферного раствора «Симацель Н» (поставляется готовый для использования раствор). Приподнимите один край камеры невысоко над столом, так чтобы буферный раствор равномерно распределился между катодным и анодным отсеками камеры. Когда ЭФ камера расположена горизонтально на столе, ее внутренняя перегородка, разделяющая катодное и анодное отделение, не позволяет смешиваться буферу между отделениями. Убедитесь, что уровень буферного раствора в каждом отделении камеры примерно одинаков. Аккуратно промокните капли буферного раствора на перегородке ЭФ камеры.

1.2. Поддерживающий мостик (держатель мембран)

Убедитесь, что размер и перфорация ацетат-целлюлозных (АЦ) мембран соответствуют размеру и зубцам перекладки поддерживающего мостика. Натяжение АЦ мембраны регулируется при помощи подвижной перекладки мостика.

1.3. Подготовка АЦ мембран

Наполните стеклянную емкость небольшим количеством диагностического буферного раствора «Симацель Н». Подпишите каждую используемую АЦ мембрану. Для пропитывания АЦ мембран буферным раствором поместите их на поверхность раствора буфера, постепенно погружив их полностью на 5-10 мин. При быстром погружении в порах мембран может остаться воздух.

Для пропитывания мембран рекомендуется использовать каждый раз свежий раствор электродного буфера.

Электродный буфер может быть использован в камере для электрофореза неоднократно.

Извлеките АЦ мембрану из буфера. Поместите ее между двумя листами фильтровальной бумаги (Blotting Paper CB 100) и легким нажатием удалите избыток буфера.



Разместите АЦ мембрану на поддерживающем мостике. Для этого сначала закрепите один край АЦ мембраны на подвижной перекладине мостика, затем натяните мембрану и закрепите другой край на противоположной перекладине.

Повторите процедуру для следующей АЦ мембраны, меняя фильтровальную бумагу. На поддерживающем мостике одновременно может быть установлено до трех АЦ мембран.

Не допускайте высыхания АЦ мембран. О высыхании свидетельствует появление на мембране белых пятен. В этом случае пропитывание мембран буфером следует повторить.

Перенесите поддерживающий мостик в камеру. Проследите, чтобы концы АЦ мембран были погружены в буферный раствор.

1.4. Нанесение исследуемых образцов

Для нанесения образцов необходимо использовать трафарет - диспокард и точно соблюдать методику.

Пометьте каждый ряд диспокарда в соответствии с маркировкой мембран. Диспокард может быть микро, полу-микро и макро формата. Каждому формату диспокарда соответствует аппликатор определенного размера. Для электрофореза белков сыворотки крови используются диспокард микро и полу микро формата.

Для нанесения исследуемых образцов на диспокард используйте микропипетки с меняющимся объемом. На микро или полу-микро диспокард нанесите по 10-12 мкл образца сыворотки крови в каждую ячейку. На макро диспокард может быть нанесено 20 – 24 мкл образца. Для нанесения каждого следующего образца меняйте наконечник пипетки. Извлекая пипетку из пробирки, снимите излишки сыворотки с внешней поверхности наконечника пипетки, проведя наконечником вдоль стенки пробирки.

Нанесите исследуемые образцы в соответствующие ячейки диспокарда. Теперь диспокард подготовлен для взятия образцов аппликатором и нанесения их на АЦ мембрану.

Установите аппликатор в ячейки диспокарда. Каждому зубцу аппликатора соответствует определенная ячейка диспокарда. Держите аппликатор вертикально над ячейками диспокарда и осторожно нажмите на него. При этом материал будет взят пористой поверхностью зубцов аппликатора. Сделайте первую пробную аппликацию материала на лист фильтровальной бумаги или на край диспокарда в стороне от ячеек. Повторите взятие материала аппликатором с диспокарда и сделайте следующую аппликацию образцов на АЦ мембране. Для этого вставьте аппликатор в пазы поддерживающего мостика, установленного в ЭФ камере. Пазы поддерживающего мостика маркированы точками. Выбор одного из них определит место старта электрофореза:

(****) – только для перфорированных мембран 57x145 мм Boskamp

(***) – для перфорированных мембран 57x130 мм Pratiga и Boskamp: белки сыворотки микро и полу-микро формат

(**) – для перфорированных мембран 57x130 мм Pratiga и Boskamp: белки сыворотки полу-микро, макро и HDV

(*) – для перфорированных мембран 57x130 мм Pratiga и Boskamp

Установите аппликатор у катодного края АЦ мембраны в пазы поддерживающего мостика, сделайте аппликацию образцов на мембрану. Время контакта аппликатора с АЦ мембраной составляет приблизительно 3-5 сек.

Пользуйтесь только сухим аппликатором. После каждого последующего использования аппликатор необходимо аккуратно промыть.



1.5. Проведение электрофореза

Закройте ЭФ камеру. Установите нужное напряжение. Подключите камеру к источнику питания. Проверьте величину силы электротока. Перед началом новой разгонки поменяйте полярность электродов в камере, если такая возможность предусмотрена, или перемешайте буферный раствор в камере, и удалите конденсат, скопившийся на перекладинах поддерживающего мостика.

Замечание: Напряжение на электродах автоматически снимается при неплотном закрытии крышки ЭФ камеры.

Правильно выберите напряжение и время разгонки:

Микро	AP8-AP6M-AP6	200 В	20-25 мин
Полу-микро	AP4-AP4MS-AP4M	200 В	25-30 мин
Макро	AP4	200 В	30-35 мин

Как правило, начальная сила тока не должна превышать 5 мА на одну мембрану.

По истечении времени разделения отключите источник питания, снимите крышку с камеры. Проследите, чтобы капли конденсата не попали на АЦ мембраны. Достаньте поддерживающий мостик из камеры, держа его в горизонтальном положении.

После окончания электрофореза мостик необходимо промыть и тщательно высушить. Обсушите крышку, закройте камеру.

Помните, что перед каждой процедурой электрофореза необходимо менять полярность электродов (если такая возможность предусмотрена) или перемешивать буферный раствор в ЭФ камере.

1.6. Окрашивание

Во время проведения электрофореза подготовьте емкость объемом приблизительно 150 мл с красящим раствором "Red Ponceau S". После отключения электротока осторожно перенесите АЦ мембраны в красящий раствор на 5 - 10 минут.

Снимите мембраны с поддерживающего мостика одну за другой. Отрежьте концы мембраны по линии перфорации. Погрузите мембраны в емкость с красящим раствором и оставьте на 10 мин. Время от времени встряхивайте емкость.

После каждых 10 процедур красящий раствор необходимо менять.

1.7. Обесцвечивание фона и просветление мембран

Пока мембраны окрашиваются, приготовьте стеклянную посуду с 200-300 мл раствора "Destaining and Clearing", который одновременно является отмывающим и просветляющим.

По окончании времени окраски извлеките мембраны из красителя и погрузите их в отмывающий раствор. Покачивайте емкость с раствором для достижения более быстрой отмывки фона мембраны. Замените раствор, когда его цвет станет одинаковым с цветом мембраны. Повторяйте процедуру до полного обесцвечивания мембраны.

Процесс отмывки фона от краски может быть ускорен, если использовать шейкер. Обычная процедура отмывки для АЦ мембран:

мембрана с голубым
разделительным листом

2-3 погружения и ок. 3 мин.
общего пребывания в растворе



мембрана с желтым
разделительным листом

2-3 погружения и ок. 4 мин.
общего пребывания в растворе

Более длительная продолжительность отмычки не исключается, но мы советуем ограничиться 10 мин.

Мембраны с обесцвеченным фоном последовательно поместите на тщательно вымытые и высушенные стеклянные пластины. Удалите остатки раствора и образовавшиеся пузырьки воздуха между мембраной и пластиной, прикатав мембрану с помощью стеклянной палочки. Чтобы просветлить мембраны, поместите стекло с расположенными на нем мембранами в печь или под инфракрасную лампу, обращая особое внимание на вентиляцию. Процесс просветления продолжается в течение 3-5 мин. при температуре 70 - 100° С, в результате чего мембраны становятся высушенными и полностью прозрачными.

Прозрачные мембраны готовы к сканированию на денситометре.

1.8. Сканирование

Электрофореграммы сканируются при длине волны 525 нм (зеленый фильтр). При необходимости и только после полного охлаждения можно снять мембрану со стекла (используйте ланцет).

1.9. Оценка результатов

Данным методом электрофореза удается получить в сыворотке крови пять белковых зон (фракций), а в плазме обнаруживается еще и фибриноген, образующий дополнительную фракцию между бета- и гамма- зонами. Альбумин – самая большая и наиболее быстро движущаяся к аноду фракция, далее α_1 -глобулины, α_2 -глобулины, β -глобулины, γ -глобулины – наиболее медленно движущаяся в аноду фракция.

Каждой лаборатории рекомендуется установить собственный диапазон нормальных значений, т.к. он может варьировать в зависимости от региона, возраста пациентов и т.п.

Альбумин: 52,0 – 70,0 %

Глобулины:

Альфа 1- 3,5 – 6,0 %

Альфа 2- 6,9 – 10,5 %

Бета - 7,3 – 13,0 %

Гамма - 12,0 – 19,0 %

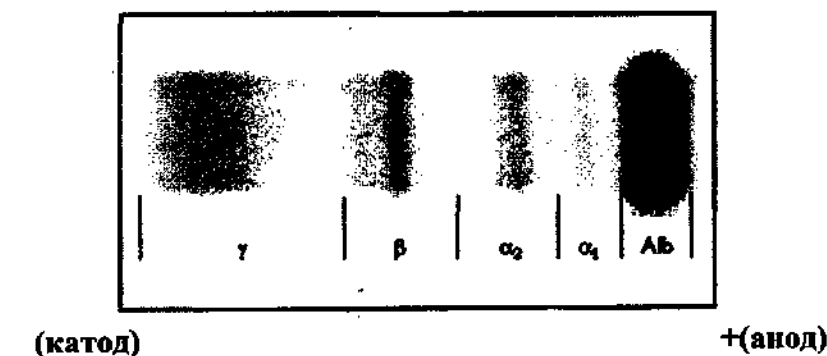
1.10. Клиническое значение метода

Многие заболевания сопровождаются изменением процентного соотношения белковых фракций (диспротеинемия), хотя общее содержание белка в сыворотке крови остается в пределах нормы. Увеличение содержания в крови α -глобулинов, включающих в себя белки острой фазы (С-реактивный белок, α_1 -гликопротеид, α_1 -антитрипсин, α_2 -макроглобулин, церулоплазмин, гаптоглобин и др.) характерно для острых воспалительных процессов. Во фракцию α_2 -глобулинов входит большинство гликопротеидов. Содержание α_2 -глобулинов увеличивается при различных хронических заболеваниях, злокачественных новообразованиях, ревматизме, инфаркте миокарда, травмах и т.д. Повышение β -глобулинов в сыворотке крови чаще наступает при гиперлипидемиях, застойной желтухе, гепатите, бета-миеломах. Фракция γ -глобулинов состоит главным образом из иммуноглобулинов. Ее увеличение связано главным образом с



интенсификацией иммунных процессов в организме при разных патологиях. Гипогаммаглобулинемии могут носить врожденный характер или сопровождать патологические процессы, связанные с истощением иммунной системы, а также при терапии цитостатиками. Некоторые патологии сопровождаются гиперпротеинемией, обусловленной увеличением количества γ -глобулинов. Сюда можно отнести гиперпротеинемию при миеломной болезни. При плазмочитарной миеломе в сыворотке крови появляются специфические «миеломные» белки – структурно аномальные, функционально инертные белки, не существующие в норме. Появление в крови аномальных белков, отсутствующих в нормальных условиях, называют парапротеинемией. В различных случаях «миеломный» белок (парапротеин) передвигается в электрическом поле с α -, β - или γ -глобулинами. Поэтому различают α -, β - или γ -глобулиновые миеломы. Если при миеломной болезни аномальные белки плазмы преодолевают почечный барьер, их можно обнаружить в моче. Парапротеинемии можно наблюдать и при макроглобулинемии Вальденштрема.

Характерное распределение белковых фракций:





§2. ЛИПОПРОТЕИДЫ

**ОКРАСКА: SUDAN BLACK (ЧЕРНАЯ)
или SUDAN RED 7B (КРАСНАЯ)**

ВРЕМЯ 2-4 часа.

2.1. Приготовление буфера

К 1000 мл диагностического буферного раствора "Симацель Н" добавить 1 флакон реагента L. В зависимости от температуры встряхивайте в течение 20-50 сек до полного растворения. При хранении буферного раствора при 4° С его можно использовать дважды.

2.2. Подготовка электрофоретической камеры к работе.

Отсоедините электрический шнур ЭФ камеры от внешнего источника электропитания. Снимите крышку и уберите поддерживающий мостик из ЭФ камеры. Налейте в ЭФ камеру 250-300 мл приготовленного диагностического буферного раствора «Симацель Н + Л». Приподнимите один край камеры невысоко над столом, так чтобы буферный раствор равномерно распределился между катодным и анодным отсеками камеры. Когда ЭФ-камера расположена горизонтально на столе, ее внутренняя перегородка, разделяющая катодное и анодное отделение, не позволяет смешиваться буферу между отделениями. Убедитесь, что уровень буферного раствора в каждом отделении камеры примерно одинаков. Аккуратно промокните капли буферного раствора на перегородке ЭФ камеры.

2.3. Поддерживающий мостик (держатель мембран).

Убедитесь, что размер и перфорация АЦ мембран соответствуют размеру и зубцам перекладки поддерживающего мостика. Натяжение АЦ мембраны регулируется при помощи подвижной перекладки мостика.

2.4. Подготовка АЦ-мембран.

Наполните стеклянную емкость небольшим количеством диагностического буферного раствора «Симацель Н+Л». Подпишите каждую используемую АЦ мембрану. Для пропитывания АЦ мембран буферным раствором поместите их на поверхность раствора буфера, постепенно погрузив их полностью на несколько минут. При быстром погружении в порах мембран может остаться воздух.

Для пропитывания мембран рекомендуется использовать каждый раз свежий раствор электродного буфера.

Извлеките АЦ мембрану из буфера. Поместите ее между двумя листами фильтровальной бумаги (Blotting Paper CB 100) и легким нажатием удалите избыток буфера.

Разместите АЦ мембрану на поддерживающем мостике. Для этого сначала закрепите один край АЦ мембраны на подвижной перекладке мостика, затем натяните мембрану и закрепите другой край на противоположной перекладке.

Повторите процедуру для следующей АЦ мембраны, меняя фильтровальную бумагу. На поддерживающем мостике одновременно может быть установлено от 1 до 3 АЦ мембран.



Перенесите поддерживающий мостик в камеру. Проследите, чтобы концы АЦ мембран были погружены в буферный раствор.

2.5. Нанесение исследуемых образцов

Для нанесения образцов строго необходимо использовать трафарет - Диспокард и точно соблюдать методику.

Для исследования используйте свежую сыворотку или ЭДТА плазму крови.

Пометьте каждый ряд диспокарда в соответствии с маркировкой мембран. Диспокард может быть микро, полу-микро и макро формата. Каждому формату диспокарда соответствует аппликатор определенного размера. Для электрофореза липопротеидов сыворотки крови используются диспокард полу-микро формата.

Для нанесения исследуемых образцов на диспокард используйте микропипетки с меняющимся объемом. На полу-микро диспокард нанесите по 10-12 мкл образца сыворотки крови в каждую ячейку. (На макро диспокард может быть нанесено 20 –24 мкл образца). Для нанесения каждого следующего образца меняйте наконечник пипетки. Извлекая пипетку из пробирки, снимите излишки сыворотки с внешней поверхности наконечника пипетки, проведя наконечником вдоль стенки пробирки.

Нанесите исследуемые образцы в соответствующие ячейки диспокарда. Теперь диспокард подготовлен для взятия образцов аппликатором и нанесения их на АЦ-мембрану.

Установите аппликатор в ячейки диспокарда. Каждому зубцу аппликатора соответствует определенная ячейка диспокарда. Держите аппликатор вертикально над ячейками диспокарда и осторожно нажмите на него. При этом материал будет взят пористой поверхностью зубцов аппликатора. Сделайте первую пробную аппликацию материала на лист фильтровальной бумаги или на край диспокарда в стороне от ячеек. Повторите взятие материала аппликатором с диспокарда и сделайте следующую аппликацию образцов на АЦ мембране. Для этого вставьте аппликатор в пазы поддерживающего мостика, установленного в ЭФ камере. Пазы поддерживающего мостика маркированы точками. Выбор одного из них определит место старта электрофореза:

(****) – только для перфорированных мембран 57х145 мм Boskamp

(***) – для перфорированных мембран 57х130 мм Pratiga и Boskamp: липопротеиды или белки сыворотки микро и полу-микро формат

(**) – для перфорированных мембран 57х130 мм Pratiga и Boskamp: белки сыворотки полу микро, макро и HDV

(*) – для перфорированных мембран 57х130 мм Pratiga и Boskamp

Установите аппликатор у катодного края АЦ-мембраны в пазы поддерживающего мостика, сделайте аппликацию образцов на мембрану. Время контакта аппликатора с АЦ-мембраной составляет приблизительно 3-5 сек. Возьмите аппликатором те же образцы с диспокарда еще раз и повторите аппликацию на АЦ мембрану. Повторная аппликация обеспечит нанесение большего количества образца, что необходимо для прокрашивания разделенных фракций липопротеидов.

Пользуйтесь только сухим аппликатором. При каждом последующем использовании аппликатора (и для хранения) его необходимо аккуратно промыть.

2.6. Проведение электрофореза

Закройте ЭФ-камеру. Установите нужное напряжение. Подключите камеру к источнику питания. Проверьте величину силы электротока. Перед началом новой разгонки поменяйте полярность



электродов в камере, если такая возможность предусмотрена, или перемешайте буферный раствор в камере и удалите конденсат, скопившийся на перекладинах поддерживающего мостика.

Замечание: Напряжение на электродах автоматически снимается при неплотном закрытии крышки ЭФ-камеры.

Правильно выберите напряжение и время разгонки:

Микро	AP8-AP6M-AP6	180 В	35-40 мин
Полу-микро	AP4-AP4MS-AP4M	180 В	40-45 мин
Макро	AP4	180 В	45-50 мин

Как правило, начальная сила тока не должна превышать 5 мА на одну мембрану.

По истечении времени разгонки отключите источник питания, снимите крышку с камеры. Проследите, чтобы капли конденсата не попали на АЦ мембраны. Достаньте поддерживающий мостик из камеры, держа его в горизонтальном положении.

После окончания электрофореза мостик необходимо промыть и тщательно высушить.

Обсушите крышку, закройте камеру.

Помните, что перед каждой процедурой электрофореза необходимо менять полярность электродов или перемешивать буферный раствор в ЭФ камере.

2.7. Окрашивание

2.7.1. Краситель SUDAN BLACK (ОКРАСКА ЧЕРНАЯ)

За 20-30 минут до конца разгонки отмерьте мерным цилиндром и смешайте 160 мл красителя Sudan Black и 40 мл раствора щелочи (упакованы вместе в наборе 50.55). Полученный раствор налейте в ванночку.

Снимите мембраны с поддерживающего мостика одну за другой. Отрежьте концы мембраны по линии перфорации. Погрузите мембраны в емкость с красящим раствором. Время окрашивания может варьировать от 40 мин. до 4 часов. Время от времени встряхивайте емкость. Более долгое время окрашивания не мешает результату, но усиливает окрашивание фона мембраны. Красящий раствор готовят заново перед каждой процедурой окрашивания фракций липопропротеидов.

2.7.2. Краситель SUDAN RED 7B (ОКРАСКА КРАСНАЯ)

За 20-30 минут до конца разгонки отмерьте мерным цилиндром и смешайте 160 мл красителя Sudan Red 7B и 40 мл раствора щелочи (упакованы вместе в наборе). Полученный раствор налейте в ванночку.

Снимите мембраны с поддерживающего мостика одну за другой. Отрежьте концы мембраны по линии перфорации. Погрузите мембраны в емкость с красящим раствором. Время окрашивания может варьировать от 25 мин. до 40 мин. Время от времени встряхивайте емкость. Более долгое время окрашивания не мешает результату, но усиливает окрашивание фона мембраны. Красящий раствор готовят заново перед каждой процедурой окрашивания фракций липопропротеидов.

2.8. Обесцвечивание фона

По истечении времени окрашивания извлеките мембраны из красящего раствора, аккуратно промойте их под струей чистой воды кончиками пальцев для удаления остатков преципитированного красителя.



При окраске суданом красным для достижения лучшего обесцвечивания фона, можно погрузить мембраны в чистый или денатурированный этанол на 1-2 мин., удалив остатки красителя кончиками пальцев.

ВНИМАНИЕ! Не используйте этанол для обесцвечивания фона мембран после окрашивания в Sudan Black, т.к. он приводит к вымыванию красителя не только с фона, но и с самих фракций липопротеидов.

2.9. Сканирование

Электрофореграмма при окрашивании суданом черным сканируется при длине волны 660-630 нм (красный фильтр).

Электрофореграмма при окрашивании суданом красным сканируется при длине волны 525 нм (зеленый фильтр).

При сканировании АЦ мембрана должна сохраняться влажной. Препарат помещают на стеклянную пластинку либо между двумя слайдами полиэтилена или в прозрачный пластиковый конверт.

Хранение электрофореграммы возможно только во влажном виде, в запаяных полиэтиленовых пакетах с добавлением дистиллированной воды или в хорошо закрывающихся емкостях с небольшим количеством дистиллированной воды.

2.10. Оценка результатов

Для получения более точных результатов и для правильного фенотипирования гиперлипопроотеидемии примите во внимание следующие правила:

1. Исключите употребление лекарств, если это возможно, в течение 3-4 недель перед исследованием.
1. Пациент должен придерживаться нормальной диеты как минимум неделю до исследования.
2. После перенесенного инфаркта миокарда или подобной травмы исследование должно проводиться не раньше, чем через 4-8 недель.
3. Пациент должен голодать в течение 12-14 часов до взятия крови на исследование. Хиломикроны в норме удерживаются в крови в течение 2-10 часов после еды, поэтому 12-14 часовой перерыв в еде необходим для исключения гиперлипидемии.

Факторы, влияющие на определение:

При терапии гепарином происходит активация фермента – липопротеинлипазы, которая увеличивает относительную скорость миграции фракций липопротеидов, особенно α -фракции. Не замораживайте сыворотку (плазму) крови.

Каждой лаборатории рекомендуется установить собственный диапазон нормальных значений, т.к. он может варьировать в зависимости от региона.

Альфа:	23,1 – 54,5 %
пре-Бета:	10,1 – 35,0 %
Бета:	30,6 – 53,9 %
Хиломикроны:	0 – 1,9 %

2.11. Клиническое значение метода

Липиды нерастворимы в воде и не циркулируют в свободной форме в плазме крови, а транспортируются связанными с ними белками, и поэтому классифицируются как липопротеиды. Различия фракций складываются из комбинаций белков, холестерина, глицеридов, эфиров



холестерина, фосфатидов и свободных жирных кислот. Липопротеиды образуют устойчивые коллоидные растворы и по многим свойствам близки к белкам. Исследование липидного состава крови методом электрофореза позволяет оценить ее липопротеидный состав.

Наиболее крупные частицы у хиломикронов и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП - VLDL), они богаты триглицеридами и содержат апопротеиды С. Хиломикроны не имеют электрофоретической подвижности и остаются при электрофорезе на стартовой линии. ЛПОНП локализуются при электрофорезе в пре-β-фракции. Менее крупные частицы у липопротеидов низкой плотности (ЛПНП - LDL), которые содержат апопротеиды В, при электрофорезе попадают главным образом в β-фракцию. Самые мелкие частицы у липопротеидов высокой плотности (ЛПВП - HDL), в состав которых входят апопротеиды А, при электрофорезе они располагаются в α-фракции.

Фредриксон, Леви и Лисс в 1967 г. впервые ввели классификацию гиперлипидемий (ГЛП), дополненную впоследствии Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ). Она описывает спектр липопротеидов при наиболее распространенных гиперлипидемиях, не разделяя причины нарушения на генетически предопределенные и вторичные. Нужно также отметить, что тип ГЛП у пациента может измениться с одного на другой под влиянием диеты, изменения веса тела и лечения. Классификация также не учитывает концентрацию холестерина липопротеидов высокой плотности (альфа-холестерин), хотя эта величина существенно влияет на вероятность развития коронарной болезни сердца у пациентов с ГЛП. Несмотря на несовершенство, система ВОЗ широко используется клиницистами.

Таблица № 1. Физические свойства липопротеинов плазмы.

Наименование	Плотность, г/мл	Средний диаметр, нм	Общий белок, мг/дл	Электрофоретическая подвижность
Хиломикроны	<0,95	100-1000	-	старт
ЛПОНП	<1,006	43	6	пре-бета
ЛПНП	1,006-1,019	27	-	бета
ЛПНП	1,019-1,063	22	80	бета
ЛПВП2	1,063-1,125	9,5	190	альфа
ЛПВП3	1,125-1,21	6,5	-	-
ЛП(а)	1,051-1,082	26	-	пре-бета



Таблица № 2. Классификация ГЛП.

Тип	Холестерин плазмы	Триглицериды плазмы	Нарушения липопротеидов
I	+	++++	избыток хиломикрон
IIa	N или ++++	N	избыток ЛПНП – повышена бета-фракция
IIb	+ или ++++	+ или ++++	избыток ЛПНП и ЛПОНП – повышены пре-бета и (в большей степени) бета-фракции
III	++	++	избыток ремнантов хиломикрон и ЛППП – широкая бета – полоса
IV	N или +	+ или ++++	избыток ЛПОНП – повышена пре-бета – фракция
V	N или +	++ или ++++	избыток хиломикрон и ЛПОНП – повышена пре-бета – фракция

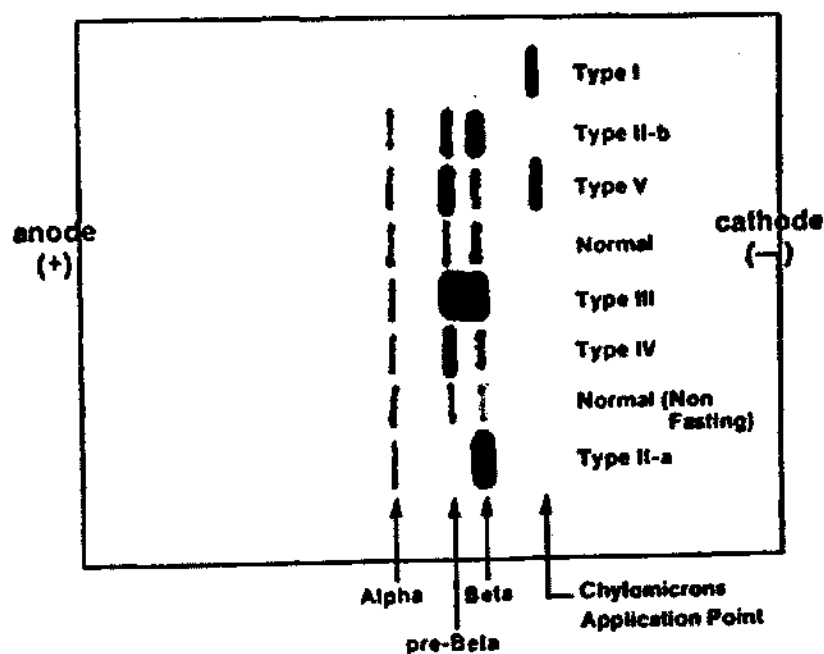
(+) – увеличенные значения

N – переменные значения

ЛППП – липопротеиды промежуточной плотности

ЛП (a) – липопротеид (a)

Характерное распределение фракций липопротеидов:





§3. ГЕМОГЛОБИНЫ

3.1. Приготовление гемолизата

Гемолиз эритроцитов дистиллированной водой (количественный метод):

Гемолиз образцов достигается добавлением дистиллированной воды.

1 - 3-4 мл крови с гепарином центрифугируйте в течение 10 мин. при 3000-3500 об.мин. (либо с другим антикоагулянтом).

2 - Удалите по возможности полностью плазму и белые частицы стромы с поверхности осадка.

3 - К 1 мл компактного осадка эритроцитов добавьте 2,5 мл дистиллированной воды.

4 - Перемешивайте на вортексе в течении 5 мин.

Гемолиз с толуолом (количественный метод):

1 - 3-4 мл крови с гепарином центрифугируйте в течение 10 мин. при 3000-3500 об.мин. (либо с другим антикоагулянтом).

2 - Удалите по возможности полностью плазму и строму белых клеток с поверхности осадка.

3 - Ресуспенсируйте взвесь эритроцитов в 4-5 мл физиологического раствора.

4 - Центрифугируйте вновь в течение 10 мин. при 3000-3500 об.мин. Удалите надосадочную жидкость.

5 - Повторите два раза шаги 3 и 4.

6 - К 1 мл компактного осадка эритроцитов добавьте 2 мл дистиллированной воды и 0,5 мл толуола.

7 - Перемешивайте на вортексе в течении 5 мин.

8 - Центрифугируйте в течение 10 мин. при 4000-4500 об.мин.

9 - Отберите надосадочную жидкость, состоящую из толуола и лизированных эритроцитов.

10 - Профильтруйте. При необходимости храните в течение 48 часов при температуре 4°C.

3.2. Подготовка проб

Приготовьте гемолизат, используя вышеописанный количественный метод (с толуолом). Определите концентрацию гемоглобина в гемолизате. Если концентрация гемоглобина слишком высокая, разбавьте гемолизат дистиллированной водой до концентрации 10 г/дл.

3.3. Подготовка электрофоретической камеры к работе

Отсоедините электрический шнур ЭФ-камеры от внешнего источника электропитания. Снимите крышку и уберите поддерживающий мостик из ЭФ-камеры.

Налейте в ЭФ-камеру 250-300 мл электродного буфера «Симацель Гб» (поставляется готовый для использования раствор). Приподнимите один край камеры невысоко над столом так, чтобы буферный раствор равномерно распределился между катодным и анодным отсеками камеры. Когда ЭФ-камера расположена горизонтально на столе, ее внутренняя перегородка, разделяющая катодное и анодное отделения, не позволяет смешиваться буферу между отделениями. Убедитесь, что уровень буферного раствора в каждом отделении камеры примерно одинаков. Аккуратно промокните капли буферного раствора на перегородке ЭФ-камеры.



3.4. Поддерживающий мостик (держатель мембран)

Убедитесь, что размер и перфорация ацетат-целлюлозных (АЦ) мембран соответствуют размеру и зубцам перекладки поддерживающего мостика. Натяжение АЦ-мембраны регулируется при помощи подвижной перекладки мостика.

3.5. Подготовка АЦ-мембран

Наполните стеклянную емкость небольшим количеством электродного буфера «Симацель Гб». Подпишите каждую используемую АЦ-мембрану. Для пропитывания АЦ-мембран буферным раствором поместите их на поверхность раствора буфера, постепенно погружив их полностью на 5-10 мин. При быстром погружении в порах мембран может остаться воздух.

Для пропитывания мембран рекомендуется использовать каждый раз свежий раствор электродного буфера.

Электродный буфер можно использовать в камере для электрофореза неоднократно.

Извлеките АЦ-мембрану из буфера. Поместите ее между двумя листами фильтровальной бумаги (Blotting Paper CB 100) и легким нажатием удалите избыток буфера.

Разместите АЦ-мембрану на поддерживающем мостике. Для этого сначала закрепите один край АЦ-мембраны на подвижной перекладке мостика, затем натяните мембрану и закрепите другой край на противоположной перекладке.

Повторите процедуру для следующей АЦ-мембраны, меняя фильтровальную бумагу. На поддерживающем мостике одновременно может быть установлено от 1 до 3 АЦ-мембран.

Не допускайте высыхания АЦ-мембран. О высыхании свидетельствует появление на пластинке белых пятен. В этом случае пропитывание мембран буфером следует повторить.

Перенесите поддерживающий мостик в камеру. Проследите, чтобы концы АЦ-мембран были погружены в буферный раствор.

3.6. Нанесение исследуемых образцов

Для нанесения образцов строго необходимо использовать трафарет - Диспокард и точно соблюдать методику.

Пометьте каждый ряд диспокарда в соответствии с маркировкой мембран. Диспокард может быть микро, полу-микро и макро формата. Каждому формату диспокарда соответствует аппликатор определенного размера.

Для нанесения исследуемых образцов на диспокард используйте микропипетки с меняющимся объемом. На микро или полу-микро диспокард нанесите по 10-12 мкл образца гемолизата крови в каждую ячейку. (На макро диспокард может быть нанесено 20 -24 мкл образца). Для нанесения каждого следующего образца меняйте наконечник пипетки. Извлекая пипетку из пробирки, снимите излишки гемолизата с внешней поверхности наконечника пипетки, проведя наконечником вдоль стенки пробирки.

Нанесите исследуемые образцы в соответствующие ячейки диспокарда. Теперь диспокард подготовлен для взятия образцов аппликатором и нанесения их на АЦ-мембрану.

Установите аппликатор в ячейки диспокарда. Каждому зубцу аппликатора соответствует определенная ячейка диспокарда. Держите аппликатор вертикально над ячейками диспокарда и осторожно нажмите на него. При этом материал будет взят пористой поверхностью зубцов аппликатора. Сделайте первую пробную аппликацию материала на лист фильтровальной бумаги или



на край диспокарда в стороне от ячеек. Повторите взятие материала аппликатором с диспокарда и сделайте следующую аппликацию образцов на АЦ-мембране. Для этого вставьте аппликатор в пазы поддерживающего мостика, установленного в ЭФ-камере. Пазы поддерживающего мостика маркированы точками. Выбор одного из них определит место старта электрофореза:

(****) – только для перфорированных мембран 57x145 мм Boskamp

(***) – для перфорированных мембран 57x130 мм Pratiga и Boskamp: микро и полу-микро формат

(**) – для перфорированных мембран 57x130 мм Pratiga и Boskamp: полу- микро, макро и HDV

(*) – для перфорированных мембран 57x130 мм Pratiga и Boskamp

Установите аппликатор у катодного края АЦ-мембраны в пазы поддерживающего мостика, сделайте аппликацию образцов на мембрану. Время контакта аппликатора с АЦ-мембраной составляет приблизительно 3-5 сек.

Пользуйтесь только сухим аппликатором. При каждом последующем использовании аппликатора (и для хранения) его необходимо аккуратно промыть.

3.7. Проведение электрофореза

Закройте ЭФ-камеру. Установите нужное напряжение. Подключите камеру к источнику питания. Проверьте величину силы электротока. Перед началом новой разгонки поменяйте полярность электродов в камере, если такая возможность предусмотрена, или перемешайте буферный раствор в камере и удалите конденсат, скопившийся на перекладинах поддерживающего мостика.

Замечание: Напряжение на электродах автоматически снимается при неплотном закрытии крышки ЭФ-камеры.

Правильно выберите напряжение и время разгонки:

Микро	AP8-AP6M-AP6	300 В	30-35 мин
Полу-микро	AP4-AP4MS-AP4M	300 В	35-40 мин
Макро	AP4	300 В	45-50 мин

Как правило, начальная сила тока не должна превышать 5 мА на одну мембрану.

По истечении времени разделения отключите источник питания, снимите крышку с камеры. Проследите, чтобы капли конденсата не попали на АЦ-мембраны. Достаньте поддерживающий мостик из камеры, держа его в горизонтальном положении.

После окончания электрофореза мостик необходимо промыть и тщательно высушить. Обсушите крышку, закройте камеру.

Помните, что перед каждой процедурой электрофореза необходимо менять полярность электродов или перемешивать буферный раствор в ЭФ-камере.



3.8. Окрашивание

Во время электрофореза приготовьте стеклянную емкость с красящим раствором - 150 мл «Red Ponceau S». После отключения электротока АЦ-мембраны осторожно переносят в красящий раствор на 5 - 10 минут.

Снимите мембраны с поддерживающего мостика одну за другой. Отрежьте концы мембраны по линии перфорации. Погрузите мембраны в емкость с красящим раствором и оставьте на 10 мин. Время от времени встряхивайте емкость.

После каждых 10 процедур красящий раствор необходимо менять.

3.9. Обесцвечивание фона и просветление мембран

Пока мембраны окрашиваются, приготовьте стеклянную посуду с 200-300 мл раствора "Destaining and Clearing", который одновременно является отмывающим и просветляющим.

По окончании времени окраски извлеките мембраны из красителя и погрузите их в отмывающий раствор. Покачивайте емкость с раствором для достижения более быстрой отмывки фона мембраны. Замените раствор, когда его цвет станет одинаковым с цветом мембраны. Повторяйте процедуру до полного обесцвечивания мембраны.

Процесс отмывки фона от краски может быть ускорен, если использовать шейкер. Обычная процедура отмывки для АЦ-мембран:

мембрана с небесно-голубым	2-3 погружения и ок.	3 мин.
разделительным листом	общего пребывания в растворе	
мембрана с желтым	2-3 погружения и ок.	4 мин.
разделительным листом	общего пребывания в растворе	

Более длительная продолжительность окраски не исключается, но мы советуем ограничиться 10 мин.

Мембраны с обесцвеченным фоном, последовательно поместите на тщательно вымытые и высушенные стеклянные пластины. Удалите остатки раствора и образовавшиеся пузырьки воздуха между мембраной и пластиной, прикатав мембрану с помощью стеклянной палочки. Чтобы просветлить мембраны, поместите стекло с расположенными на нем мембранами в печь или под инфракрасную лампу, обращая особое внимание на вентиляцию. Процесс просветления продолжается в течение 3-5 мин. при температуре 100 - 150° С, в результате чего мембраны становятся высушенными и полностью прозрачными.

Прозрачные мембраны готовы к сканированию на денситометре.

3.10. Сканирование

Электрофореграммы сканируются при длине волны 525 нм (зеленый фильтр). При необходимости и только после полного охлаждения можно снять мембрану со стекла (используйте ланцет).

3.11. Клиническое значение метода

Фракции гемоглобинов

Молекула гемоглобина здорового взрослого человека неоднородна. Основная фракция гемоглобинов – гемоглобин А - составляет около 95% всего гемоглобина; 5% приходится на малые фракции; 3,5% составляет гемоглобин А₂ и 1,0 – 1,5% - гемоглобин F. Гемоглобины



отличаются друг от друга аминокислотным составом. У новорожденных гемоглобин F составляет 20%, а к 4-5 мес. достигает величин взрослого человека. Химическое различие гемоглобина A и F состоит в структуре полипептидных цепей глобина: в гемоглобине A имеются 2 α - и 2 β -цепи ($\alpha_2\beta_2$), в гемоглобине F- β -цепи заменены γ -цепями ($\alpha_2\gamma_2$).

Повышение гемоглобина F является важным критерием для диагностики β -талассемии, при которой одновременно повышается и содержание гемоглобина A₂. Особенно высокие цифры гемоглобина F могут быть при гомозиготной β -талассемии до 20-90%. При гетерозиготной β -талассемии содержание гемоглобина F может быть нормальным или умеренно повышенным (2,5-7%). Однако надо иметь в виду, что повышение гемоглобина F не является специфичным для β -талассемии. Оно встречается при разных формах малокровия: других гемолитических анемиях, железодефицитной анемии, гипопластической анемии, лейкозах и других состояниях, сопровождающихся гипоксией. Возможно, что повышение гемоглобина F при этих заболеваниях развивается компенсаторно.

Гемоглобин A₂ отличается от гемоглобина A более медленной миграцией при электрофорезе, что является основой методов его определения. Химическая структура полипептидных цепей глобина у гемоглобина A₂ характеризуется наличием двух цепей α и двух цепей δ ($\alpha_2\delta_2$). Исследование гемоглобина A₂ наиболее информативно при исследовании методом электрофореза на ацетате целлюлозы.

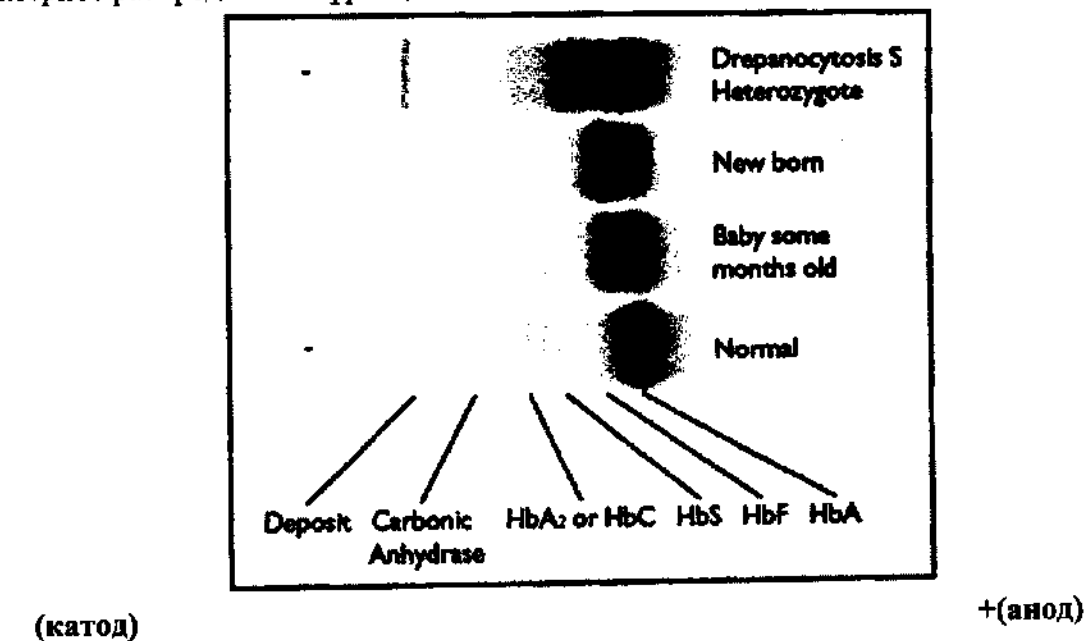
Повышение содержания гемоглобина A₂ характерно для β -талассемии; при гетерозиготной форме болезни содержание A₂ составляет 4,2 – 8,9%.

Патологические формы гемоглобина

К настоящему времени известно более 200 форм патологических гемоглобинов, отличающихся от нормальных структурой полипептидной цепи глобина, когда одна или несколько аминокислот заменены другими, или отсутствуют.

Наиболее частой наследственной патологией является гемоглобинопатия S (серповидно-клеточная анемия).

Характерное распределение фракций гемоглобинов:



1- осадок; 2- карбоангидраза; 3- HbA₂ или HbC; 4- HbS; 5- HbF; 6- HbA.



Приложение

Примеры денситограмм, полученные на денситометре *Scanion*.

1. Фракции белков сыворотки крови.

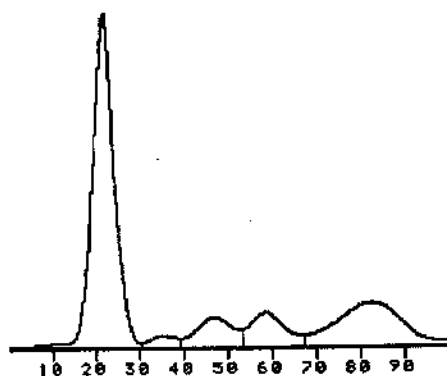
2. Фракции липопротеидов сыворотки крови.

RESEARCH INSTITUTE OF CARDIOLOGY
CLINICAL DIAGNOSTICAL
LABORATORY

DATE 30-05-02

N=3

SEROPROTEINS



TOT. PROTEINS: 64

A/G = 1

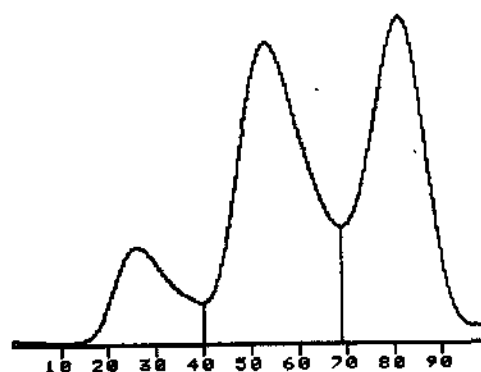
FRACTION	%	g/DL	% NORM.
ALBUMINA	56	37	52 - 78
ALFA1	2	1	3.5 - 6.0
ALFA2	8	5	6.9 - 10.5
BETA	9	6	7.3 - 12.0
GAMMA	22	14	12. - 19.0

RESEARCH INSTITUTE OF CARDIOLOGY
CLINICAL DIAGNOSTICAL
LABORATORY

DATE 06-06-02

N=1

LIPOPROTEINS



FRACTION	%	% NORM.
ALFA	12.0	9.6 - 46.2
PRE-BETA	46.0	0 - 29.6
BETA	42.0	40. - 71.9