

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Роздравнадзора

от _____ 200__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор региональной общественной организации «Санкт-Петербургское общество естественных испытателей»

_____ Школов
«15» августа 2007 г. 1868



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для электрофоретического разделения белковых фракций сыворотки крови на мембранах из ацетатцеллюлозы
(КлиниТест-ЭФ)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов КлиниТест-ЭФ предназначен для электрофоретического разделения белковых фракций сыворотки крови человека на мембранах из ацетатцеллюлозы в клиничко-диагностических и биохимических лабораториях и в научно-исследовательской практике.

Набор рассчитан на приготовление 1000 мл рабочего буферного раствора.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип электрофоретического разделения белков основан на движении молекул белков сыворотки крови с разной скоростью в постоянном электрическом поле. Скорость движения зависит, в первую очередь, от электрического заряда их молекул, молекулярной массы и состава буферной среды.

СОСТАВ НАБОРА:

- буферный раствор, 4-х кратный концентрат (гиппуровая кислота, 3 г/л; натрий гиппурово-кислый, 10 г/л; три(оксиметил)аминометан, 8 г/л – 2 флакона (по 125 мл);
- краситель (Пунцовый С, 0,65 г/л; трихлоруксусная кислота, 7,5 г/л; сульфосалициловая кислота, 7,5) - 1 флакон (125 мл), готов к применению;
- контрольная сыворотка – 1 флакон.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Коэффициент вариации (при анализе контрольной сыворотки) - не более 10%.

Качество набора может проверяться по отечественным или зарубежным контрольным сывороткам, аттестованным методом электрофореза.

Содержание белковых фракций в норме составляет: альбумин – 56,5 – 66,8 %,

Инструкция составлена старшим научным сотрудником РОО СПбОЕ, к.фарм.н.
С.А.Коньковым и зав. каф. СПбГМУ д.м.н. проф. В.Л.Эмануэлем

α_1 -глобулин – 2,5 – 6,0 %; α_2 -глобулин – 6,9 – 10,5 %; β -глобулин – 7,3 – 13,0 %; γ -глобулин – 12,8 – 19,0 %.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка крови человека, свободная от гемолиза.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Потенциальный риск применения набора - класс 2б.

В состав красителя входят сульфосалициловая и трихлоруксусная кислоты, поэтому при работе с набором следует избегать разбрызгивания и попадания красителя на кожу и слизистые. В случае попадания раствора красителя на кожу и слизистые необходимо промыть пораженные участки большим количеством проточной воды.

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Утилизацию рабочего буфера и красителя производить 50-ти кратным разбавлением проточной водопроводной водой и сливом через бытовую канализацию.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ:

- Устройство электрофореза сыворотки крови на пленках из ацетатцеллюлозы с регулируемыми параметрами напряжения, силы тока и режимов, включающий в состав денситометр, УЭФ-01-«АСТРА»;

- пипетка, позволяющая отбирать объем жидкостей 0,05 мл;
- колба мерная вместимостью 500 мл;
- секундомер;
- бумага фильтровальная;
- вода дистиллированная;
- кислота уксусная 5-7%;
- пинцет;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- мембраны из ацетатцеллюлозы (Мембрана Владипор типа МФАС-ОС-1).

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Приготовление рабочего буферного раствора.

Содержимое одного флакона с концентратом буферного раствора количественно перенести в мерную колбу вместимостью 500 мл, добавить дистиллированную воду до метки и перемешать.

Полученный рабочий буферный раствор можно хранить при температуре +2-8° С в течение всего срока годности набора.

Рабочий буферный раствор перелить в электрофоретическую камеру (одна порция - 100 мл).

Краситель перелить в ванночку объемом 125 мл.

Приготовление контрольной сыворотки к работе.

Осторожно вскрыть флакон, добавить в него необходимое (по Инструкции к контрольной сыворотке) количество дистиллированной воды, закрыть флакон пробкой и осторожно перемешать, избегая пенообразования. Выдержать при комнатной температуре (18-25°C) 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° С не более 10 сут.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Проведение электрофореза.

Извлечь из пачки мембрану (брать только пинцетом или надевать резиновые перчатки), осторожно поместить на поверхность рабочего буферного раствора, избегая ее быстрого погружения, и выдержать до полного смачивания мембраны. Смоченную мембрану аккуратно промокнуть между листами плотной фильтровальной бумаги, не допуская ее высыхания (при высыхании на пленке появляются белые пятна).

С помощью аппликатора нанести анализируемые образцы и контрольную сыворотку на расстоянии 2-3 см от катодного края мембраны. Мембрану поместить в электрофоретическую камеру и подключить ток.

Конкретные условия проведения электрофореза (напряжение, сила тока, время) зависят от параметров применяемой аппаратуры (например, параметры электрофоретического разделения на приборах «Астра-01»: напряжение –180 В, сила тока – 35 мА, время разгонки – 35 мин).

При непрерывном использовании готовый буферный раствор годен один месяц, допускается сливать готовый буферный раствор в герметически закрывающийся флакон.

Обработка электрофореграмм.

После отключения тока мембрану осторожно перенести в ванночку с раствором красителя на 3 - 5 мин, затем отмыть от избытка красителя в двух последовательных ваннах с 5-7 % раствором уксусной кислоты. Раствор в первой ванне быстро загрязняется и его надо периодически заменять, а раствор во второй ванне можно использовать многократно до визуального загрязнения. Отмывку ведут до полного осветления фона (обычно в течение 10-20 мин). Мембраны можно оставлять в 5% растворе уксусной кислоты на срок не более 1 сут. При непрерывном использовании краситель годен один месяц, допускается сливать краситель в герметически закрывающийся флакон.

Оценка электрофореграмм.

Электрофореграмму сканировать на денситометре при длине волны 540 нм и плотности тока 0,5-0,8 мА на 1 см ширины мембраны или обработать электрофореграмму с помощью программы анализа электрофореграмм, поставляемой изготовителями приборов для электрофореза.

Сравнить полученные при разделении белковых фракций в контрольной сыворотке значения с аттестованными.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

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

Рабочий буферный раствор можно хранить при температуре +2-8°C в течение всего срока годности набора при условии достаточной герметичности.

Краситель после вскрытия флакона можно хранить при комнатной температуре (+18-

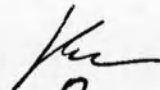
25°C) в течение всего срока годности набора при условии достаточной герметичности.

Контрольную сыворотку после приготовления можно хранить при температуре +2-8°C не более 10 сут при условии достаточной герметичности.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

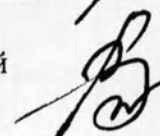
По вопросам, касающимся качества набора КлиниТест-ЭФ, следует обращаться в НПЦ «Эко-Сервис» РОО СПбОЕ по адресу: 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7/9, тел.: (812) 3289663, 4506779; и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, г. Москва, Научный проезд, 14 а, тел.: (095) 120-60-95, 120-60-96.

Старший научный сотрудник РОО СПбОЕ, к.фарм.н.



С.А.Коньков

Заведующий кафедрой клинической лабораторной
диагностики СПбГМУ, д.м.н. профессор



В.Л.Эмануэль