

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА МЕМБРАНАХ ИЗ АЦЕТАТЦЕЛЛЮЛОЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРАСИТЕЛЯ АМИДО ЧЁРНЫЙ 10 Б (КАТ.№№ В-41312к, В-41322к)

НАЗНАЧЕНИЕ

Краситель Амидо чёрный 10 Б предназначен для окрашивания белковых фракций сыворотки крови после их разделения методом электрофореза на мембранах из ацетатцеллюлозы в клинично-диагностических лабораториях и научно-исследовательской практике.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип электрофоретического разделения белков основан на различной скорости движения молекул белков сыворотки крови в постоянном электрическом поле определённой напряженности. 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.

Кат. № В-42312к

Амидо чёрный 10 Б100 мл

Кат. № В-42322к

Амидо чёрный 10 Б250 мл

НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ

Буфер для электрофореза, трихлоруксусная кислота, 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°С в течение 8 часов, при 2-8°С – в течение 3 дней, при -20°С – в течение 1 месяца[1].

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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 фореа и др.) зависят от конструкции применяемой аппаратуры.

2. Обработка электрофореграммы

2.1. После отключения тока мембрану поместить на 2-3 минуты в 3% раствор трихлоруксусной кислоты, затем на 5 минут в раствор красителя. Прокрашенную мембрану поместить в 5-7%раствор уксусной кислоты (набор «КлиниТест-ЭФ ПР») до отбеливания фона.

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

Амидо чёрный 10 Б

2.2. Электрофореграмму промерить на денситометре при длине волны 620 нм или обработать с помощью программы анализа фореграмм, поставляемой изготовителями приборов для электрофореза.

2.3. При необходимости мембрану можно сделать прозрачной, погружая её в осветляющий раствор (набор «КлиниТест-ЭФ ОР»). Для этого после проведения электрофореза мембрану промокнуть фильтровальной бумагой и погрузить на 2-4 минуты в 96% этиловый спирт. Затем влажную мембрану перенести на чистое обезжиренное предметное стекло, тщательно удалить пузырьки воздуха, погрузить на 2-4 минуты в осветляющий раствор, дать стечь избыткам раствора и поместить стекло с мембраной в разогретый до 95-100°C сушильный шкаф на 5-10 минут до полного осветления.

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

| Белковые фракции, % | Амидо чёрный 10 Б |
|---------------------|-------------------|
| Альбумин | 57,7-69,8 |
| Глобулины | |
| альфа 1 | 1,4-5,4 |
| альфа 2 | 4,4-12,2 |
| бета | 7,2-13,8 |
| гамма | 18,8-21,6 |

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

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Краситель необходимо хранить при температуре 18-25°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности (18 месяцев).

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль качества может быть проведён по контрольным сывороткам «КлиниТест-ЭФ Контроль» производства НПЦ «Эко-Сервис» или по зарубежным контрольным сывороткам, аттестованным данным методом.

ЛИТЕРАТУРА

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