

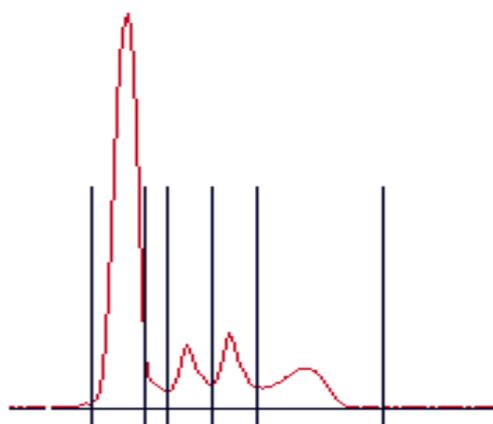
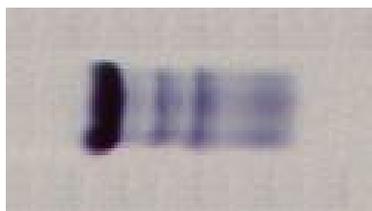
В крови человека содержится сложная смесь белков, имеющих функциональные отличия, из которых более 130 идентифицированы. Значительную часть из них можно количественно определить современными иммуноферментными и иммунотурбидиметрическими методами. Однако, во-первых, стоимость одного такого определения чрезвычайно высока, и, во-вторых, эти определения не дают общей картины белкового спектра.

Одним из наиболее информативных методов является метод электрофоретического разделения сыворотки крови, который позволяет определить качественный и количественный состав белков.

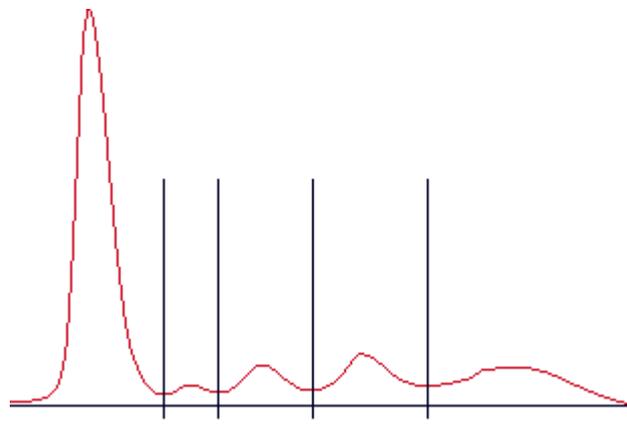
Электрофорез - это движение заряженных частиц под влиянием внешнего электрического поля. Различные белки, обладая различной молекулярной массой, под действием электрического поля движутся с разной скоростью. Дальше всего от места нанесения уходят имеющие наименьшую молекулярную массу альбумины, затем располагаются $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β - и γ -глобулины. Иногда каждая из основных фракций может разделиться на несколько подфракций. Скорость движения частиц зависит, кроме молекулярной массы, также от pH среды, свойств буферного раствора и других факторов. В качестве поддерживающей среды-носителя могут применяться бумага, мембрана из ацетата целлюлозы, агаровый, крахмальный или полиакриламидный гель или комбинированные среды.

Самым распространенным способом электрофореза до недавнего времени оставался электрофорез на бумаге, имеющий однако много недостатков. Основной из них заключается в том, что результаты исследования могут быть получены лишь на 2-3 день. Электрофорез в геле позволяет идентифицировать до 30 различных белков. К недостаткам этого способа можно отнести сложность приготовления геля, его высокую стоимость, а также трудность количественной оценки.

Метод электрофореза на ацетате целлюлозы позволяет выделять 5 фракций сыворотки крови: альбумины, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β - и γ -глобулины. Сравнение результатов ЭФ белков сыворотки крови, полученных с использованием мембран из АЦ и агарозного геля, не выявили существенных различий. Использование мембран из ацетата целлюлозы позволяет при относительно низкой их стоимости и доступности за короткое время получить четкое фракционирование и возможность количественной оценки белковых фракций.

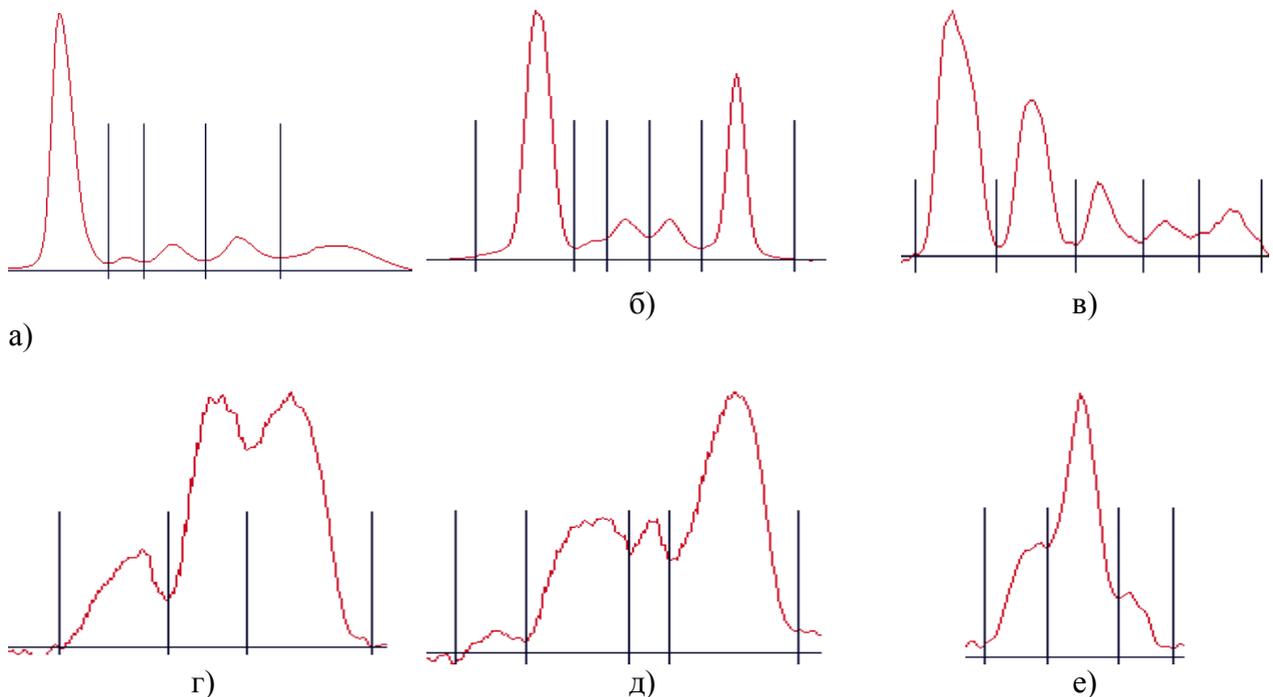


Электрофореграмма получена на гелевых пластинах; окрашена бромфеноловым синим



Электрофореграмма получена на ацетатцеллюлозных мембранах; окрашена пунцовым С

Метод электрофореза на ацетатцеллюлозных мембранах используют не только для разделения на фракции белков. Этот метод используют для фракционирования липопротеидов, ЛДГ, гемоглобина и др., причем не только в сыворотке крови, но и в моче.



Примеры электрофореграмм, полученные на пленках из ацетата целлюлозы на устройстве УЭФ-01-«Астра»:

- а, б - белки сыворотки крови
- в - ЛДГ сыворотки крови
- г, д - липопротеины сыворотки крови
- е - гликозамингликаны в моче

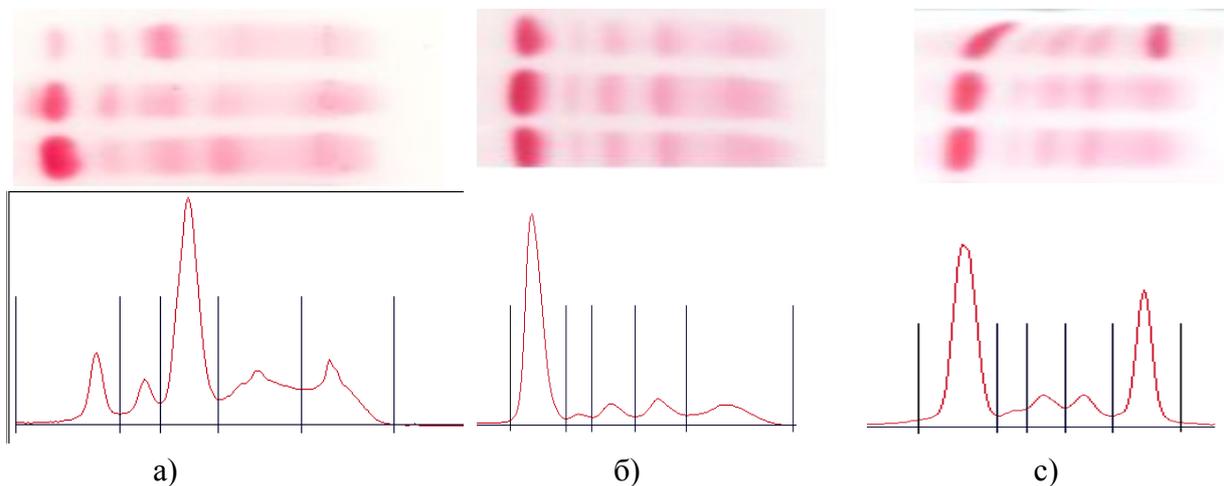
Качество электрофореза и полученные результаты зависят от многих факторов:

- от подготовки проб;
- от применяемого электрофоретического буфера;
- от качества используемых ацетатцеллюлозных мембран;
- от качества нанесения проб на мембрану и количества нанесенной сыворотки;
- от используемого красителя;
- от мастерства персонала.

Сыворотка для исследования должна быть свежей, хранившейся не более нескольких часов; в пробе не должно быть следов гемолиза.

Для хорошего разделения на мембрану необходимо нанести около 0,2 мкл сыворотки крови (для электрофореза белков) и 0,4 мкл сыворотки (для ЭФ липопротеидов) в виде узкой полоски. Это можно сделать только с помощью специального устройства, называемого аппликатором. Нанесение большого количества вещества может привести к некачественному разделению. Кроме того, большое количество вещества плохо прокрашивается, что ведет к искажению результатов электрофореза.

Наилучшими буферами для электрофореза сыворотки крови являются барбитуратные буферы (веронал-мединаловый, веронал-ацетатный, мединал-цитратный, мединаловый), однако в настоящее время эти буферы стали практически недоступны для широкого применения. Неплохие результаты получаются при работе с гиппуратным (б) и различными трис-буферами (а) и (с).



После проведения электрофореза пленки погружают в краситель для окрашивания соответствующих составляющих сыворотки крови (белков, липопротеидов, ЛДГ и др.)

Для окраски белков чаще всего пользуются красителями: пунцовым С, бромфеноловым синим, амидо-черным, причем последний чаще используется для обработки гелей, т.к. дает четко окрашенные зоны, оставляя чистым фон.

Для окраски липопротеидов чаще всего используют судан черный или красный жировой 7В (Fat Red 7В).

При количественной оценке белковых фракций нужно помнить, что альбумин связывает красителя больше, чем другие фракции, причем для разных красителей это сродство разное. Именно поэтому для разных красителей существуют свои нормальные величины белковых фракций. Поэтому же количественные результаты, полученные при электрофорезе, могут не совпадать с результатами, полученными, например, биохимическими методами.

Белковые фракции	Содержание при окраске красителем, %:		
	пунцовым С	бромфеноловым синим	амидо-черным
Альбумин	52 (46,9-61,4)	58 (53,9-62,1)	57,7-62,8
α 1-глобулин	3,3 (2,2-4,2)	3,9 (2,7-5,1)	1,4-5,4
α 2-глобулин	9,4 (7,9-10,9)	8,8 (7,4-10,2)	4,4-12,2
β -глобулин	14,3 (10,2-18,3)	13,0 (11,7-15,3)	7,2-13,8
γ -глобулин	21,1 (17,6-25,4)	13,0 (15,6-21,4)	18,8-21,6

Нужно помнить, что само понятие нормы в лабораторной практике весьма условно: приведенные нормальные значения являются ориентировочными: нормальные значения параметров зависят от местных условий и должны формироваться в конкретной лаборатории при обследовании здорового контингента.

Для обработки полученной информации на персональном компьютере существуют специальные компьютерные программы. Полученную после электрофореза, окрашивания и закрепления в слабом уксусном растворе мембрану сканируют обычным планшетным сканером и обрабатывают специальной компьютерной программой.

Выпускаемое ООО «НПЦ «АСТРА» устройство электрофореза сыворотки крови на пленках из ацетата целлюлозы УЭФ-01-АСТРА состоит из:

- источника питания - 1 шт.,
- камеры деления - 1 шт.,
- аппликаторов для нанесения проб - 3 шт.,
- мостиков для закрепления мембран - 3 шт.,
- плашек для проб сыворотки крови - 3 шт.,
- емкостей для реагентов - 5 шт.,
- емкости для дезинфекции - 1 шт.,
- рабочего столика - 1 шт.,
- пинцетов 2 шт.,

Источник питания представляет собой программируемый источник напряжения. Питается от сети 220 В ± 10 %, частота 50 Гц. Имеет возможность регулировки:

- по напряжению $U = 2 \dots 300$ В (дискретность 2 В);
- по току $I = 1 \dots 99$ мА (дискретность 1 мА);
- времени $t = 1 \dots 99$ мин (дискретность 1 мин).

Источник питания не требует времени подготовки к работе.

В процессе электрофореза имеется возможность контролировать заданные и текущие параметры (напряжение, ток, время), которые отображаются на четырехразрядном индикаторе (три разряда - цифровая информация, один разряд - регулируемый параметр). Существует, также, звуковая сигнализация режимов работы (таймер, обрыв цепи, короткое замыкание, окончание работы).

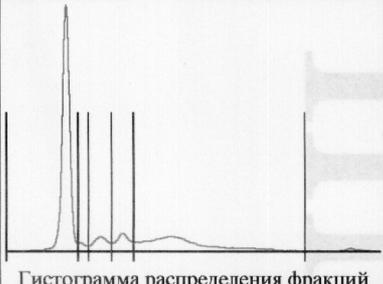
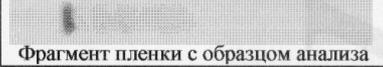
Источник питания имеет восемь режимов работы: 0-й режим – электрофорез белков сыворотки крови; 1-й режим – электрофорез липопротеидов. Кроме того, источник питания имеет дополнительно 6 программ, параметры которых можно задавать по собственному усмотрению (электрофорез ЛДГ, гемоглобина и др.). Все режимы имеют возможность изменения параметров: их последние значения хранятся в памяти источника питания. Габаритные размеры источника питания 125x165x225 мм.

Камера деления позволяет работать одновременно с тремя ацетатцеллюлозными пленками формата 57x140 мм. Исследуемые пробы сыворотки крови можно наносить на пленки непосредственно в камере деления. Конструкция камеры обеспечивает наиболее оптимальные параметры для электрофореза, а также электрическую безопасность персонала при работе. Габаритные размеры камеры деления 300x180x80 мм.

Многоразовый **апликатор** позволяет наносить на пленку одновременно 8 проб сыворотки крови. Объем наносимой пробы - не более 0,2 мкл. Апликатор обеспечивает нажатие, не зависящее от усилия нажатия. Апликатор имеет конструкцию, защищающую рабочую поверхность от механических повреждений при падении и ударах.

Апликаторы, мостики для закрепления пленки и **плашки** для раскапывания сыворотки крови имеют цветовую маркировку, исключающую ошибку в нумерации проб.

Полученная в результате электрофореза ацетатцеллюлозная пленка, обработанная специальным образом (окраска, фиксирование), помещается в сканер. Считывание результатов электрофореза и их обработка производится с помощью специальной программы (С) “Анализ фракций сыворотки крови”, которая совместно с персональным компьютером и планшетным сканером выполняет функции денситометра. Протокол распечатывается на принтере.

Больница №8, г. Уфа.		Научно-производственный центр "АСТРА" (3472) 25-63-29		
		ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ		
Фамилия И.О.	Иванов А.П.	15.07.1997 год		
Номер анализа	2	Врач:		
Код	реан			
 <p>Гистограмма распределения фракций</p>	Результаты анализа			
		Рез-т %	Норма %	Сод. г/л
	Альбумины	56.46	53-68	42.35
	Альфа1	2.04	2-5	1.53
	Альфа2	6.46	7-10	4.85
	Beta	7.28	8-13	5.46
	Gamma	27.75	13-21	20.82
А/Г	1.30	Норма 1,2-2		
Общ.белок	75.00	Норма 65-85 г/л		
 <p>Фрагмент пленки с образцом анализа</p>		Комментарии: Ревматоидный артрит		
Дата печати протокола 11:08:1998 Время: 16:30				