

Analiza frakcji lipidowej żółtka jaja kurzego

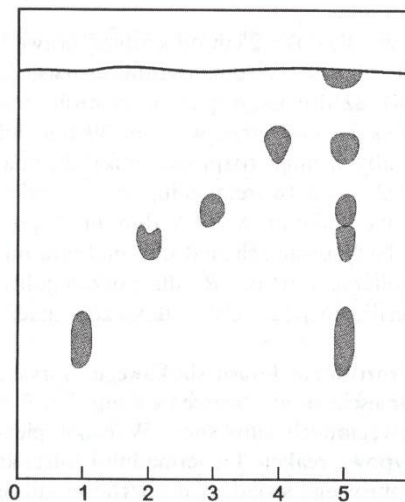
Cel ćwiczenia: Badanie właściwości tłuszczów oraz wykrywanie poszczególnych składników lipidów z jaja kurzego

Podstawy teoretyczne

Lipidy (powszechnie nazywane tłuszczami) występujące w tkankach zwierzęcych dzieli się na proste (tłuszcze właściwe, woski) i złożone (fosfo-, gliko- i sulfolipidy) oraz prekursorzy i pochodne lipidów (kwasy tłuszczowe, glicerol, sfingozyna, związki ketonowe i inne). Do lipidów zalicza się też frakcję lipoprotein, czyli złożonych kompleksów białkowo-lipidowych, które pełnią głównie funkcję transportową lipidów w osoczu oraz biorą udział w przemianach lipidów w organizmie.

Ze względu na różnorodny charakter związków wchodzących w skład frakcji lipidowej analiza ich jest procesem złożonym. Standardowe postępowanie zakłada ekstrakcję tłuszczów rozpuszczalnikami organicznymi oraz rozdziały chromatograficzne i identyfikację otrzymanych związków za pomocą reakcji charakterystycznych.

Frakcja lipidowa otrzymana z tkanek zwierzęcych po ekstrakcji tłuszczów prostych zawiera obok fosfolipidów, także cerebrozydy i gangliozydy. Z uwagi na ich wspólny charakter fizykochemiczny często frakcja ta określana jest mianem lipidów (tłuszczów) polarnych. Do wstępnej identyfikacji i potwierdzenia obecności w ekstrakcie wykorzystuje się metody chromatograficzne, w tym chromatografię cienkowarstwową na żelu krzemionkowym z domieszką gipsu (modyfikacje Silica GEL G). Ze względu na polarny charakter związków jako fazę rozwijającą używa się mieszanin zawierających w składzie, oprócz typowych rozpuszczalników jak chloroform, też alkohol (zazwyczaj metanol), czy wodę i dla zapewnienia odpowiedniego pH kwas octowy lub amoniak.



Chromatogram cienkowarstwowo (Silica Gel G) tłuszczów złożonych:

- 1 – sfingomieliny,
 - 2 – lecytyny,
 - 3 – kefaliny,
 - 4 – cerebrozydy,
 - 5 – ekstrakt lipidów mózgu,
- w czole rozpuszczalnika – glikolipidy, tłuszcze obojętne i estry steroli.

Do wywoływania chromatogramów cienkowarstwowo lipidów zazwyczaj używa się reakcji barwnych używając takich odczynników jak:

- roztwory kwasu siarkowego (50%), po spryskaniu chromatogramu powodują zwęglenie substancji organicznych i ich uwidocznienie w postaci ciemnych plamek,
- roztworów lub par jodu, związki zawierające wiązania nienasycone wybarwiają się na brunatno-żółto,
- roztwory dipikrolaminy, cholina i jej pochodne zabarwiają się na czerwono,



- roztwory molibdenianu amonu, związki zawierając resztę kwasu fosforowego wybarwiają się na niebiesko (reakcje można cofnąć umieszczając chromatogram w parach amoniaku),
- roztwory ninhydryny, związki zawierające etylenoaminę i serynę wybarwiają się na czerwono-fioletowo.

Lecytyna, jako przykład lipidu zawierającego grupy hydrofilowe: reszty kwasu fosforowego i IV-rzędowej zasady — choliny, występuje w dużych ilościach w żółtku jaja kurzego, skąd może być wyekstrahowana mieszaniną rozpuszczalników polarnych (np. roztworami etanolu, metanolu).

Literatura

1. Ćwiczenia z biochemii, Redakcja: Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz, 2013, Wydawnictwo Naukowe PWN ISBN: 9788301139445

Odczynniki

żółtko jaja kurzego, około 30-90 g
aceton
chloroform
metanol
BAKERBOND spe™ z wypełnieniem C18
kwas octowy
jod (kryształki)

Sprzęt

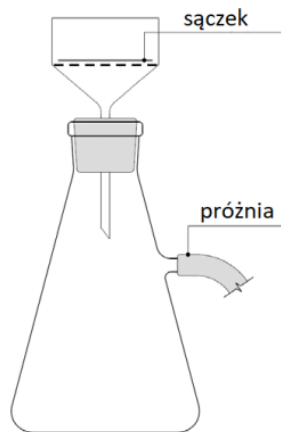
wirówka MPW 212
vortex
lejek Büchnera z kolbą
wodna pompka próżniowa
sączki
probówki szklane ze szlifem na 25 ml
próbówki szklane z nakrętką na 10 ml
zlewki szklane 100, 250 ml
zestaw Baker spe-12G
komora chromatograficzna
płytki chromatograficzna 10x10 cm HPTLC Silica gel 60 F_{254S}
suszarka do włosów
eksykator (z kryształkami jodu)
pipetki Pasteura
pęseta, skalpel
linijka, ołówek
oprogramowanie GelAnalyzer (www.gelanalyzer.com) lub inne o podobnych możliwościach np.: ImageJ (imagej.net, wersja w przeglądarce ij.imjoy.io)



Wykonanie: ekstrakcja i frakcjonowanie lipidów

Ekstrakcja tłuszczu

1. Do dwóch zlewek o pojemności 100 ml oddzielić żółtko od białka jaja. Żółtko homogenizować bagietką do uzyskanie jednorodnej płynnej konsystencji.
2. Za pomocą pipetki Pasteura odważyć około 5 g żółtka do probówki na 25 ml (ze skalą).
3. Dodać porcjami 2 x 5 ml acetonu. Probówkę zatkać korkiem (lub parafilmem) i intensywnie mieszać na vortexie przez 5 minut po każdej porcji.



4. Przesączyć na lejku Büchnera pod zmniejszonym ciśnieniem. Przenieść zawartość probówki na lejek z sączkiem zwilżonym niewielką ilością acetonu. Podłączyć próżnię.

Do filtracji użyć sączka dopasowanego średnicą do lejka. Sączek powinien pokryć całkowicie powierzchnię lejka. Aby ułatwić przyleganie można zwilżyć sączek niewielką ilością rozpuszczalnika przed nałożeniem ekstraktu.

5. Zawartość probówki przepłukać 3 x 1 ml acetonu, za każdym razem wylewając zawartość równomiernie na osad na lejku.
6. Filtrat zawiera tłuszcze właściwe i karotenoidy. Zebrać do szklanej próbówki, opisać jako próba A.

Do analizy używać klarownego przesączu z nad osadu (po odstawieniu lub odwirowaniu próbówki).

7. Ostrożnie zdjąć sączek z lejka i przenieść na szalkę Petriego. Osad wysuszyć w strumieniu powietrza pod dygestorium. Suchy osad delikatnie zdrapać z sączka i używać do kolejnych analiz.

Ekstrakcja fosfolipidów

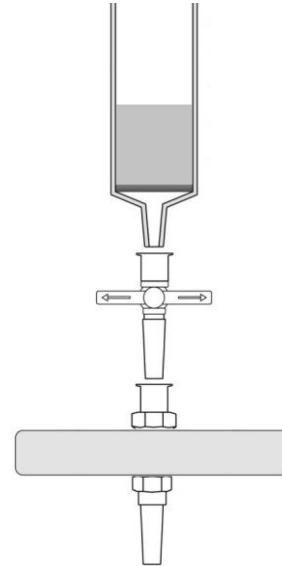
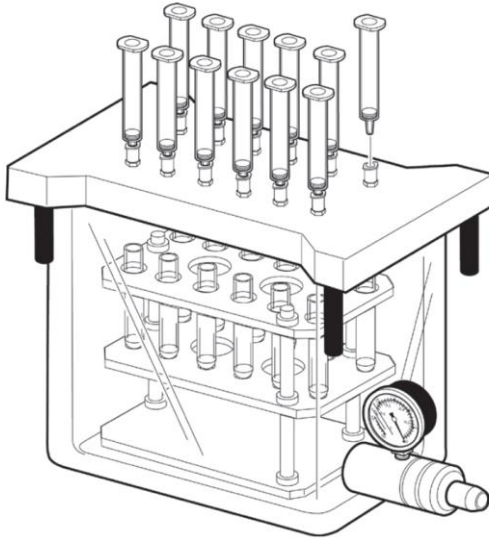
1. Około 0,5 g zebranego z sączka osadu przenieść do szklanej probówki z nakrętką.
2. Do próbówki dodać 2 ml mieszaniny chloroformu z metanolem (1:1), mieszać intensywnie na vortexie przez około 5 min.
3. Roztwór przesączyć przez sączek karbowany do szklanej próbówki.
4. Powstały osad zawrócić do próbówki, ponownie dodać 2 ml mieszaniny chloroform : metanolem (1:1), mieszać na vortexie przez 5 minut i ponownie przesączyć.
5. Powtórzyć punkt 4.
6. Powstały filtrat zawierający głównie fosfolipidy oznaczyć jako próba B. Do analizy używać klarownego przesączu z nad osadu.



Ekstrakcja i frakcjonowanie lipidów polarnych i niepolarnych

1. W probówce eppendorf o pojemności 5 ml odważyć około 0,25 g zebranego z sącza osadu i rozpuścić w 2 ml mieszaniny chloroform : metanol 95:5. Mieszać intensywnie na vortexie przez około 5 min.
2. Odwirować powstały ekstrakt przez 15 minut. Zebrać klarowny roztwór z dna probówki.

Przed włożeniem końcówki pipety do probówki wcisnąć przycisk ta aby wypychane powietrze nie zruszyło osadu.



3. W zestawie do SPE umieścić kolumnkę BAKERBOND spe™ z wypełnieniem C18. W pozostałe, niewykorzystane, pozycje wstawić i zakręcić kraniki (lub strzykawki).
4. Podłączyć zestaw do pompy próżniowej, odkręcić zwór przy manometrze.

Przepływ przez kolumnki regulować poprzez podłączanie i odłączanie próżni, w tym celu po naniesieniu roztworu zakręcić w prawo zawór przy manometrze (mierzone ciśnienie zacznie maleć), gdy przepłynie cały roztwór odkręcić w lewo zawór przy manometrze (mierzone ciśnienie wzrośnie).

5. Złóże kondycjonować 3x 1 ml mieszaniny chloroform : metanol (95:5).
6. Po zakręceniu kraników pod kolumnkę umieścić probówkę eppendorfa o pojemności 5 ml.

W przypadku gdy wylot kolumnki nie sięga do probówki użyć igły jako przedłużenia.

7. Nanieść na kolumnkę 1 ml roztworu po wirowaniu, odkręcić kranik. Dodać 1 ml mieszaniny chloroform : metanol 95:5. Wyjąć probówkę i oznaczyć jako próbka C.
8. Po zakręceniu kraniku odłączyć próżnię i zmienić probówkę pod kolumnką.
9. Eluować lipidy polarne 1 ml metanolem. Wyjąć probówkę i oznaczyć jako próbkę D.
10. Kolumnkę przepłukać za pomocą 3 x1 ml metanolu a następnie 3 x1 ml mieszaniny chloroform : metanol 95:5.

Analiza lipidów żółtka jaja kurzego za pomocą chromatografii cienkowarstwowej

1. W komorze chromatograficznej umieścić układ rozwijający chloroform : metanol : kwas octowy : woda w stosunku 60:50:1:4 w ilości 115 ml (na wysokość około 1 cm od dna). Do komory wstawić



bibułę filtracyjną. Przykryć komorę szklaną płytką i pozostawić na około 30 minut, nie umieszczać komory w przeciągu.

2. Na płytce do chromatografii 10x10 cm HPTLC Silica gel 60 F254S zaznaczyć ołówkiem linię startu, około 1,5 cm od krawędzi płytki, pozycje startu i linię końca (około 0,5 cm do przeciwległej krawędzi płytki). Zaznaczyć ołówkiem punkty nanoszenia próbek (2x4 sztuki w odległości około 1 cm od siebie).

Linie i punkty nanieść delikatnie ołówkiem, unikając uszkodzenia powierzchni płytki.

3. Za pomocą pipetki nanieść po 5 μ l w 2 powtórzeniach otrzymanych frakcji lipidowych (próbki A, B, C oraz D).
4. Plamki wysuszyć pod dygestorium przy użyciu suszarki do włosów (zimnym strumieniem powietrza) lub na powietrzu około 10 minut.
5. Umieścić płytkę w komorze chromatograficznej, fazą w stronę włożonej wcześniej bibuły, upewnić się że układ rozwijający jest poniżej naniesionych prób.
6. Rozwijać chromatogram do momentu dotarcia frontu rozpuszczalnika do momentu osiągnięcia pozycji 1-1,5 cm od górnej krawędzi, około 40-45 minut.
7. Wysuszyć płytkę pod dygestorium przy użyciu suszarki do włosów (zimnym strumieniem powietrza) lub na powietrzu około 15 minut.

Przed wywoływaniem chromatogramu upewnić się, że płytki wyschła całkowicie.

8. Wywołać chromatogram przez umieszczenie płytki w eksykatorze z kryształkami jodu.

Pierwsze plamki będą widoczne już po około 5 minutach, wybarwiać 15-20 minut.

9. Bezpośrednio po wyjęciu z pojemnika wykonać dokumentację fotograficzną rozdziału. Zmierzyć i zapisać odległości poszczególnych plamek (a) i czoła rozpuszczalnika (Z) od linii startu.

Lipidy wybarwiają się w postaci ciemnych plamek, które w miarę upływu czasu tracą intensywność barwy.

Opracowanie wyników

1. Przedstawić otrzymane chromatogramy.
2. Obliczyć współczynnik retencji dla widocznych na chromatogramie lipidów.

$$R_f = \frac{a}{Z}$$

gdzie:

a – odległość przebyta przez związek od linii startu

Z – odległość przebyta przez rozpuszczalnika

3. Za pomocą oprogramowania GelAnalyzer wykreślić chromatogram dla każdej z próbek, obliczyć R_f oraz objętość plamki, wyniki przedstawić w formie tabelarycznej. Wyjaśnić różnice w objętości plamki pomiędzy próbami.
4. Wskazać jakie frakcje lipidów uwidoczniono na chromatogramie (zaznaczyć na rysunku). Wyjaśnić dlaczego.



Analiza białek moczu

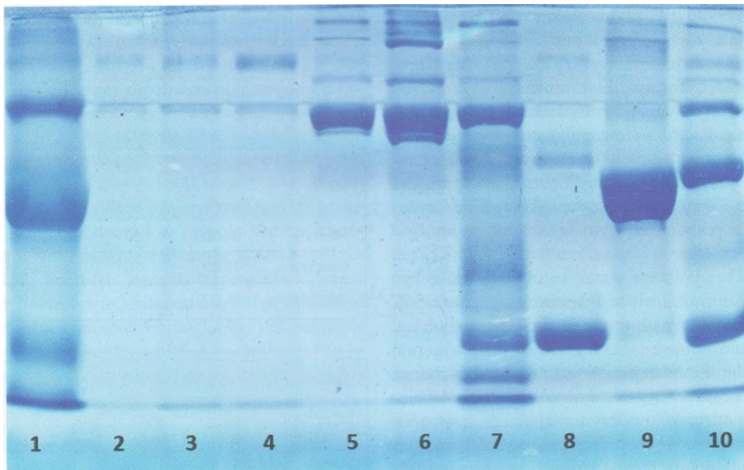
Cel ćwiczenia: Porównanie składu białek w moczu u różnych gatunków zwierząt metodą elektroforezy w żelach poliakrylamidowych.

Podstawy teoretyczne

W ciągu doby nerki filtrują znaczne objętości krwi, u dorosłego człowieka około 1600 litrów, a całkowita ilość białek osocza przechodzących przez nie w tym czasie sięga poziomu 45 kg. Mimo, że błona podstawna kłębuszków nerkowych jest wysoce efektywnym filtrem, szacuje się, że około 0,0027% białka w ciągu doby (około 1,5 g) przechodzi do filtratu. Zawarte białka są resorbowane niemal całkowicie i ich zawartość w moczu zdrowego człowieka nie przekracza kilku mg/l. Stwierdzenie w moczu podwyższonego poziomu białka całkowitego jest ważnym parametrem diagnostycznym. Ze względu na skład białek w moczu możemy wyróżnić trzy podstawowe typy białkomoczu:

- białkomocz kłębuszkowy – spowodowany uszkodzeniem błony podstawnej kłębuszka nerkowego,
- białkomocz cewkowy – świadczący o uszkodzeniu komórek nabłonkowych cewek nerkowych,
- białkomocz przeciążeniowy (nadmiarowy) – powstaje gdy w osoczu wzrasta stężenie białek drobnocząsteczkowych.

W niektórych próbach moczu prawidłowego można zaobserwować znaczne ilości uromoduliny (białka Tamma-Horsfalla), która wydzielana jest w ilości do 25 mg na dobę. Przez błonę podstawną kłębuszka nerkowego przechodzą głównie substancje o masie poniżej 40 kDa, więc do różnicowania białkomoczów można wykorzystać elektroforezę w żelach poliakrylamidowych. Przykłady rozdzielności elektroforetycznych różnych typów białkomoczów znajdują się na Rys 1. Oprócz referencyjnej metody SDS-PAGE (elektroforezy w żelach poliakrylamidowych w obecności siarczanu dodecylu sodu) dostępne są też komercyjne systemy umożliwiające różnicowanie wielu próbek moczu jednocześnie.



Rys. 1 Rozdział elektroforetyczny różnych typów białkomoczów u ludzi.

- 1 – standard mas cząsteczkowych,
- 2 – mocz prawidłowy (stężenie albuminy 4 mg/l),
- 3 – mikroalbuminuria (stężenie albuminy 25 mg/l),
- 4 – mocz prawidłowy z uromoduliną (białkiem Tamma-Horsfalla powyżej albuminy),
- 5 – białkomocz kłębuszkowy selektywny (powyżej albuminy widoczna transferyna),
- 6 – białkomocz kłębuszkowy nie selektywny (widoczna transferyna i immunoglobuliny),
- 7 – białkomocz cewkowy (poniżej albumin widoczne białka drobnocząsteczkowe),
- 8 – białkomocz nadmiarowy (widoczne dimery łańcuchów lekkich ~46kDa i monomery ~23kDa – białka Bence'a Jonesa),
- 8 – białkomocz nadmiarowy (widoczne dimery łańcuchów lekkich ~46kDa – białka Bence'a Jonesa).

Literatura

1. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej, wyd. IV, 2017, A. Dembińska-Kieć, J.W. Naskalski, B. Solnica, ISBN 978-83-65625-50-2, Edra Urban & Partner,
2. Isani, G., Ferlizza, E., Nally, J.E. (2018). Proteomic Research in Urine and Other Fluids. In: de Almeida, A., Eckersall, D., Miller, I. (eds) Proteomics in Domestic Animals: from Farm to Systems Biology. Springer, Cham. doi.org/10.1007/978-3-319-69682-9_7.



Odczynniki

5 ml moczu różnych gatunków zwierząt: krowa, koń, koza, owca, pies, inne

TEMED

standard mas cząsteczkowych do elektroforezy Bio-Rad, Dual Color 10-250 kDa, 161-0375

biuła filtracyjna

50 ml 30% akrylamid, 2,67% bis-akrylamid

14,6 g akrylamid

0,4 g N,N'metylene-bis-akrylamid

woda do 50ml

Przefiltrować przez saczek 0,2 μ m, można przechowywać do miesiąca w lodówce.

*Roztwory akrylamidu i bis-akrylamidu kwalifikowane są jako środki o potencjalnym działaniu rakotwórczym.
W trakcie operowania odczynnikami należy zachować szczególną ostrożność!*

50 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

9,075 g Tris

30 ml woda

za pomocą 6M HCl ustawić pH na 8,8 (dodając kropelkami pod kontrolą pH-metru)

woda do 50 ml

Przefiltrować przez sączek 0,2 μ m, można przechowywać do miesiąca w lodówce.

50 ml 5 M Tris-HCl, pH 6,8

3 g Tris

30 ml woda

za pomocą 6 M HCl ustawić pH na 6,8 (dodając kropelkami pod kontrolą pH-metru)

woda do 50 ml

Przefiltrować przez sączek 0,2 μ m, można przechowywać do miesiąca w lodówce.

10 ml 10% SDS

1,0 g SDS

woda do 10 ml

0,2 ml 10% APS (przygotować bezpośrednio przed użyciem)

0,02 g APS

0,2 ml woda

1 ml bufor próbkowy, 62,5 mM Tris-HCl, 20% glicerol, 2% SDS, 5% β -merkaptoetanol, pH 6,8

0,15 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

0,2 ml 10% SDS

0,2 ml glicerol

0,4 ml woda

0,05 ml 0,5% bromofenol blue

0,05 ml β -merkaptoetanol

Przygotowany roztwór nie zawiera β -merkaptoetanolu, dodać bezpośrednio przed analizą.



200 ml 5x bufor rozdzielający, po rozcieńczeniu 25 mM Tris, 192 mM Gly, 0,1% SDS, pH 8,3

2,4 g Tris
11,52 g Gly
1 g SDS
woda do 100 ml

Bezpośrednio przed użyciem roztwór rozcieńczyć do wartości roboczych. Do wykonania oznaczenia wystarczy 2000 ml roztworu rozcieńzonego.

100 ml 0,125% CBB w woda : metanol : kwas octowy (50:40:10)

0,125 g CBB R250
50 ml H₂O
40 ml MeOH
10 ml CH₃COOH

500 ml roztwór odbarwiający woda : metanol : kwas octowy (50:40:10)

250 ml H₂O
200 ml MeOH
50 ml CH₃COOH

10 ml 50% izopropanol

5 ml izopropanol
5 ml woda

Sprzęt

wirówka MPW 351R z rotorem 11467

kolumniki do zagęszczania Amicon® Ultra – 2ml 3K

zasilacz do elektroforezy EPS 601

zestaw do elektroforezy Tetra System Mini Protean (z zaślepką na 1 żel)

zestaw do wylewania żeli, klamry, gąbki, szybki z przekładkami 1,0 mm

łaźnia wodna o temperaturze 95°C

statyw pływający do łaźni wodnej

kolba miarowa z korkiem 10, 50, 100, 200, 500 ml

cyliny miarowe 50, 100, 250, 1000 ml

zlewki szklane 100, 1000 ml

szalka Pertiego o średnicy ok 15 cm

próbówki Falcon 15 ml

próbówki Eppendorf 1,5 ml

statyw do próbek Falcon 15 ml

statyw na próbki Eppendorf 1,5 ml

pipetki Pasteura

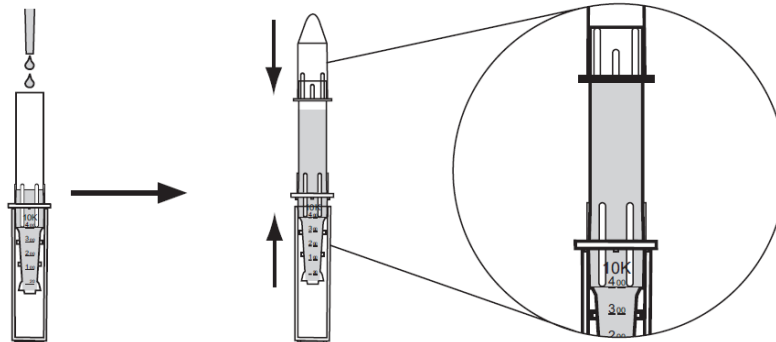
oprogramowanie GelAnalyzer (www.gelanalyzer.com) lub inne o podobnych możliwościach np.: ImageJ (imagej.net, wersja w przeglądarce ij.imjoy.io)



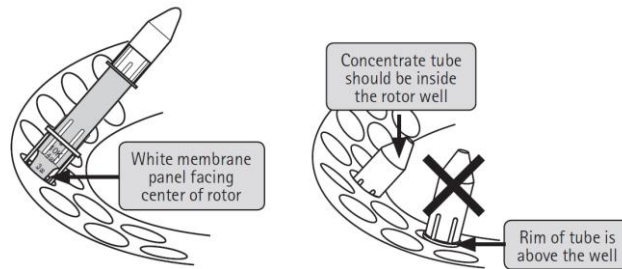
Wykonanie

Zagęszczanie białek moczu

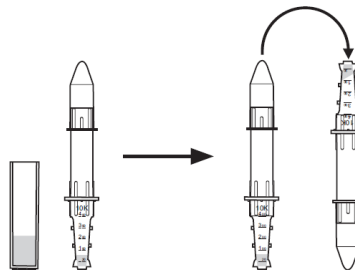
Procedurę wykonać analogicznie dla wszystkich dostępnych próbek moczu.



1. Kolumnenkę do zagęszczania Amicon® Ultra – 2 ml 3K umieścić probówce na filtrat (zgodnie z rysunkiem).
2. Nanieść próbę moczu o pojemności 2 ml, założyć probówkę odbierającą na kolumnenkę.



3. Umieścić układ filtracyjny w wirówce, wirować przez 60 min przy prędkości 4500 x g.



4. Zdjąć probówkę z filtratem (dolną). Odwrócić i wstawić wkład filtracyjny do probówki odbierającej, wirować przez 2 min przy 1000 x g.
5. Do analiz użyć zagęszczony mocz (z probówki odbierającej po drugim wirowaniu).

Przygotowanie żeli do elektroforezy

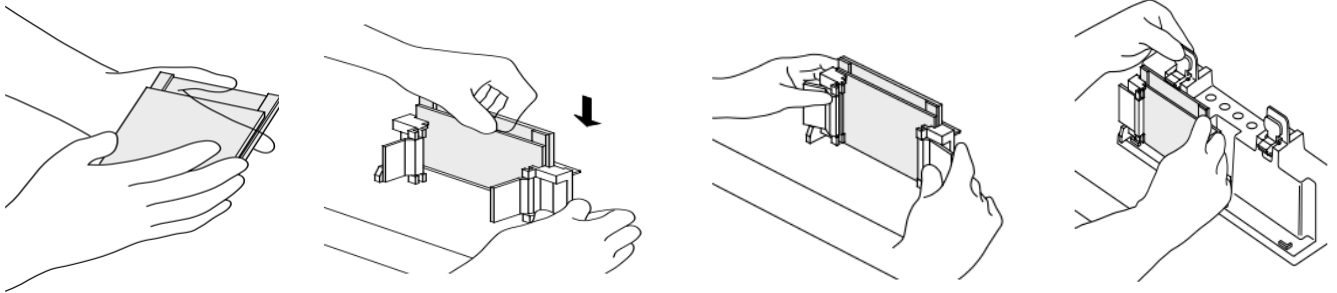
1. Przygotować 10% roztwór APS.
2. Przygotować 12 ml 15% żelu rozdzielającego zgodnie z tabelką (w probówce Falcon 15 ml):

Składnik	Ilość
H ₂ O	2,52 ml
30% akrylamid	6,36 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,00 ml
10% SDS	0,12 ml



Unikać intensywnego mieszania roztworu, tlen jest inhibitorem polimeryzacji akrylamidu katalizowanej APS.

3. Przygotować szybki z przekładkami 1,0 mm do wylania żeli.



4. Złożyć szybki z przekładkami i szybki wewnętrzną/krótszą (zgodnie z rysunkiem). Umieścić złożone szybki w statywie, zamknąć klamerki odginając je do oporu na zewnątrz, upewniając się, że dolne krawędzie szybki są równo złożone.
5. Umieścić zestaw w statywie do wylewania żeli upewniając się, że gąbka uszczelniająca szczelnie zamyka dół zestawu.

Sprawdzić szczelność zestawu wlewając wodę do pełna. Jeśli układ jest szczelny wylać wodę a jej pozostałości usunąć odsączając paskiem bibuły filtracyjnej..

6. Po złożeniu zestawu do wylewania żelu dodać 10% APS i TEMED, wymieszać i natychmiast wylewać żele:

Składnik	Ilość
10% APS	0,12 ml
TEMED	4,8 μ l

7. Za pomocą pipetki Pasteura wylać żel pomiędzy płytki, do poziomu dolnej krawędzi zielonej belki. Około 1,5 ml żelu przenieść do Eppendorfa (jako kontrola polimeryzacji).
8. Odizolować żel od dostępu powietrza rozprowadzając po całej powierzchni żelu 0,2 ml 50% roztworu izopropanolu. Żele odstawić do polimeryzacji (około 15-20 min).
9. Przygotować 10 ml 4% roztworu żelu zagęszczającego:

Składnik	Ilość
woda	6,1 ml
30% akrylamid	1,3 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml

Unikać intensywnego mieszania roztworu, tlen jest inhibitorem polimeryzacji akrylamidu katalizowanej APS.

10. Ze spolimeryzowanego żelu usunąć roztwór izopropanolu, powierzchnię przepłukać kilkakrotnie wodą.
11. Przepłukać powierzchnię żelu za pomocą niewielkiej ilości żelu zagęszczającego.
12. Po przepłukaniu żeli rozdzielających, dodać 10% APS i TEMED, wymieszać i natychmiast wylewać żele:



Składnik	Ilość
10% APS	0,05 ml
TEMED	10 μ l

13. Za pomocą pipetki Pasteura nanieść żel zagęszczający do pełna, usuwając pęcherzyki i pianę jeśli potrzeba. Około 1,5 ml żelu przenieść do Eppendorfa (jako kontrola polimeryzacji).
14. Wcisnąć grzebień do oporu (część żelu może wypłynąć). Żele odstawić do polimeryzacji (około 10-15 min).

Przygotowanie próbek

1. W probówkach Eppendorf o pojemności 1,5 ml wykonać rozcieńczenia zagęszczonych próbek moczu z buforem próbkowym (w stosunku 1:1), schemat próbek zapisać w tabeli.

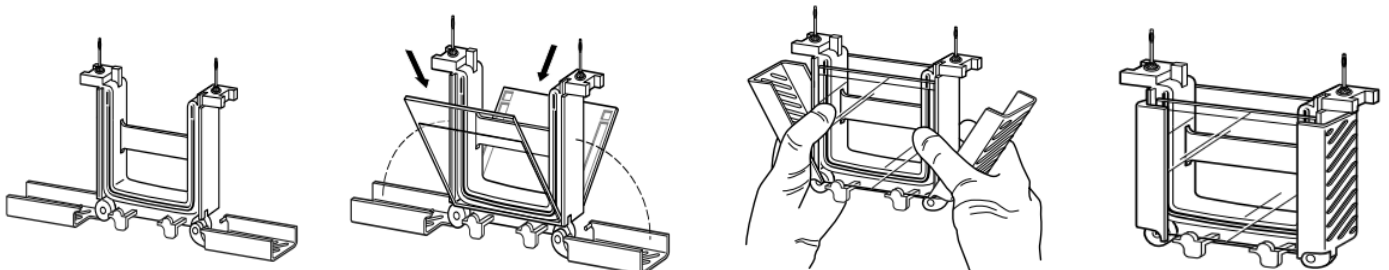
Próba	Ilość próby	Bufor próbkowy	Dołek w żelu
standard mas	-	-	1
	50 μ l	50 μ l	2
			3
			4
			5
			6
			7
			8
			9
			10

Jeśli ilość próbek jest mniejsza niż ilość wolnych dołków w żelu można dozować próbki w powtórzeniach.

2. Próby wymieszać na vortexie i wstawić w statywie pływającym do łaźni wodnej o temperaturze 95°C na 5 min.
3. Próby ochłodzić do temperatury otoczenia.

Nanoszenie próby na żel

1. Po polimeryzacji szybki z żelem wyjąć ze statywu, opłukać wodą usuwając z zewnątrz pozostałości żelu.
2. Delikatnie wyjąć grzebień, grzebień wyciągamy zdecydowanym ruchem zwracając uwagę aby nie uszkodzić studzienek.

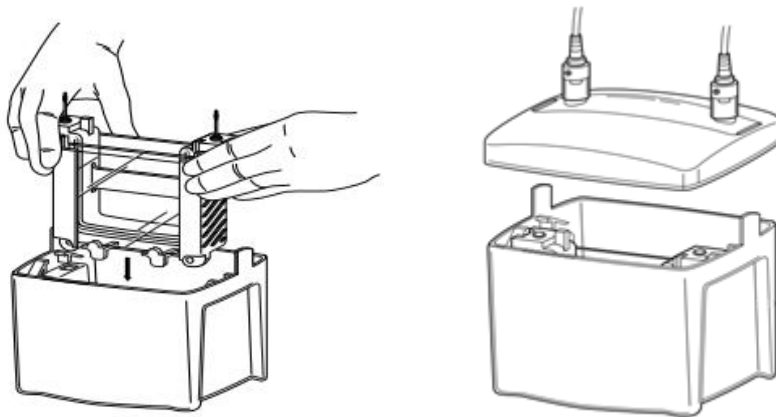


1. Włożyć szybki z żelem do układu do elektroforezy (zgodnie z rysunkiem).

W przypadku 1-2 żeli użyć zestawu z wyprowadzeniami na elektrody (jak na rysunku), w przypadku 3-4 żeli wykorzystać dodatkowo zestaw bez wyprowadzeń na elektrody, gdy liczba żeli jest nieparzysta użyć zaślepki zestawu.

2. Szybki wkładamy krótszą szybką do środka, upewniając się, że krawędzie szybki dopasowały się do pogrubień w uszczelkach zestawu. Zaciśnąć klamerki składając je do środka.
3. Za pomocą pipetki Pasteura trzykrotnie przepłukać buforem rozdzielającym studzienki w żelu (delikatnie wprowadzając roztwór do studzienek, aż się wyleje, wyłączyć roztwór przekręcając zestaw do góry nogami).
4. Zalać buforem wprowadzającym układ do elektroforezy (do pełna).
5. Za pomocą pipety do studzienek nanieść 15 µl próby (zgodnie ze schematem dozowania w tabeli). Do studzienki 1 dodać 5 µl standardu mas cząsteczkowych.

W celu ułatwienia dozowania można użyć odpowiednio ukształtowanego pomocnika ładowania. Końcówkę pipety wprowadzać pomiędzy szybki poniżej krawędzi szybki krótszej, próbę dozować powolnym jednostajnym ruchem.



6. Większy pojemnik zestawu do elektroforezy napełnić buforem rozdzielającym do poziomu oznaczonego „2 Gels”, umieścić zestaw z naniesionymi próbami w pojemniku. Założyć pokrywkę z wyprowadzeniami (upewnić się, że weszła w prowadnice)

Zestaw z wyprowadzonymi elektrodami umieścić w większym pojemniku w pozycji przy wystających prowadnicach upewnić się że zestaw wszedł w prowadnice w dnie pojemnika, zwracając uwagę na biegunowość elektrod (czarny do czarnego, czerwony do czerwonego), założyć pokrywkę z wyprowadzeniami (upewnić się, że weszła w prowadnice).

Rozdział elektroforetyczny

1. Podłączyć zestaw do zasilacza. Prowadzić rozdział przy parametrach: 200 V, 100 mA przez około 45 min (do momentu aż barwnik osiągnie koniec żelu).
2. Po zakończeniu rozdziału odłączyć zasilacz od zestawu, zdjąć pokrywkę z wyprowadzeniami, wyłączyć roztwór i wyjąć szybki z żelem.

Barwienie białek CBB

1. Przy pomocy klina otworzyć szybki i przenieść żel do pojemnika do wybarwiania (szalka Pertiego o średnicy ok 15 cm).
2. Zalać żel 50 ml roztworu barwiącego (0,125% CBB w roztworze woda : metanol : kwas octowy



50:40:10).

3. Przykryć pojemnik i wstawić na kotłuskę. Proces wybarwiania w temperaturze pokojowej prowadzić przez co najmniej 12h.
4. Za pomocą pompki z pojemnikiem odessać roztwór CBB, żel przepłukać 3 x 5 minut po 50 ml w roztworze woda : metanol : kwas octowy 50:40:10). Po trzeciej zmianie pozostawić na kilka godzin w roztworze woda : metanol : kwas octowy 50:40:10) do odbarwienia.
5. Po odbarwieniu przenieść żel do pojemnika z wodą.

Archiwizacja i obróbka wybarwionych żeli

1. Po odbarwieniu żele zeskanować lub wykonać fotografię.

Żele można przechowywać w wodzie w warunkach chłodniczych przez kilka tygodni.

Żele można też wysuszyć pomiędzy dwoma przekładkami celofanowymi po uprzednim namoczeniu w 5% roztworze glicerolu w wodzie (około 30-45 minut).

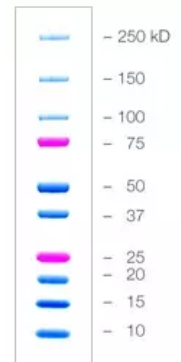
Opracowanie wyników

1. Do sprawozdania dołączyć dokumentację fotograficzną żelu.

W trakcie trwania ćwiczeń przygotować roztwór odbarwiający.

Ze względu na długotrwały proces odbarwiania po żele proszę zgłosić się do prowadzącego.

2. Za pomocą oprogramowania GelAnalyzer (www.gelalyzer.com) wykreślić elektroforegram dla każdej z próbek, obliczyć masę oraz objętość plamki, wyniki przedstawić w formie wykresu i tabelarycznej.
3. Wskazać różnice w elektroforegramach moczu różnych gatunków zwierząt.



Analiza białek osocza

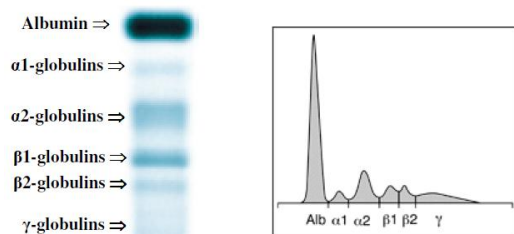
Cel ćwiczenia: Porównanie składu białek osocza u różnych gatunków zwierząt metodą elektroforezy w żelach poliakrylamidowych.

Podstawy teoretyczne

Białka osocza stanowią mieszaninę wielu białek o różnorodnej funkcji, budowie oraz znacznych różnicach w stężeniu (ilości). W rutynowej diagnostyce laboratoryjnej stosuje się do oznaczenia stężenia białek osocza metodę biuretową używając jako wzorca preparatu albuminy z krwi bydłowej. U ludzi całkowite stężenie białka w osoczu jest stabilne i mieści się w zakresie 65-82 g/l. Znaczne zaburzenia stężenia białek w osoczu są zawsze związane z poważnymi stanami chorobowymi. W zależności od kierunku zmian stężenia białek mówimy o hipoproteinemii (obniżeniu stężenia białek poniżej wartości prawidłowej) lub rzadziej hiperproteinemii (wzroście stężenia białka całkowitego powyżej wartości referencyjnej). Równocześnie należy pamiętać, że ze względu na zróżnicowany skład grupy białek osocza zaburzenia składu białek osocza mogą nie zmieniać wartości białka całkowitego (wyjścia poza zakres referencyjny).

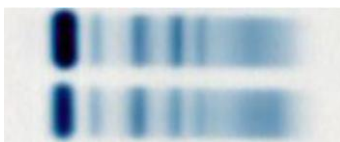
Użyteczna metoda pozwalająca wykrywać zaburzenia składu białkowego to rozdziały elektroforetyczne pozwalające różnicować białka ze względu na ruchliwość elektroforetyczną (w dużym uproszczeniu można przyjąć, że ze względu na wielkość cząsteczek). W wyniku elektroforezy białek osocza możemy zaobserwować obecność frakcji albumin oraz 5 frakcji globulin. Uzyskane w wyniku rozdziału obrazy są charakterystyczne dla odpowiednich stanów klinicznych, takich jak utrata białka czy zwiększenie jego ilości (jak na przykład w przebiegu szpiczaka). Najbardziej charakterystyczne obrazy uzyskane w wyniku rozdziałów przedstawiono na rysunkach. Otrzymane elektroforegramy po transformacji do krzywych fotodensytometrycznych można kwantyfikować określając procentową zawartość poszczególnych frakcji, prawidłowy skład frakcji białkowych w osoczu ludzkim po rozdziale elektroforetycznym przedstawiono w tabeli poniżej.

Frakcja	Stężenie białka (g/l)	Udział procentowy (%)
Albuminy	35,0 – 55,0	55,0 – 70,0
α_1 -globuliny	0,9 – 2,1	1,4 – 2,9
α_2 -globuliny	5,0 – 7,9	7,0 – 11,0
β -globuliny	8,0 – 13,0	5,7 – 7,9
γ -globuliny	9,0 – 16,0	5,7 – 7,9
razem	65 – 82	100

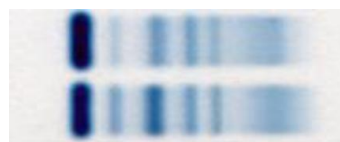


Typowy rozdział elektroforetyczny białek osocza

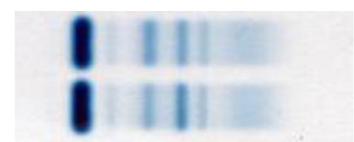
Przykładowe obrazy uzyskane w wyniku analizy prób fizjologicznych i z typowymi zaburzeniami:



Osocze normalne (górnny pasek)
i z hypoalbuminemią (dolny pasek)

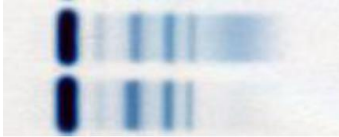


Osocze normalne (górnny pasek)
i z podwyższony poziom α_2 -globulin (dolny pasek)



Osocze normalne (górnny pasek)
i z niedoborem β -globulin (przy niedożywieniu,
dolny pasek)

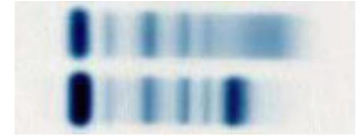




Osocze normalne (górný pasek)
i z hipogammaglobulinemią (w zespole
nefrotycznym, dolny pasek)



Osocze normalne (górný pasek)
i z podwyższonym poziomem γ -globulin (przy
marskości wątroby, dolny pasek)



Osocze normalne (górný pasek)
i z intensywnym sygnałem białka monoklonalnego
(w przebiegu szpiczaka, dolny pasek)

Literatura

1. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej, wyd. IV, 2017, A. Dembińska-Kieć, J.W. Naskalski, B. Solnica, ISBN 978-83-65625-50-2, Edra Urban & Partner,
2. Roby D A, Shetty S, Bhandary R, Evaluation of electrophoretic pattern in renal disease: A retrospective study. Int J Clin Biochem Res 2019;6(3):437-441, doi.org/10.18231/j.ijcbr.2019.092

Odczynniki

0,5 ml osocza różnych gatunków zwierząt

TEMED

standard mas cząsteczkowych do elektroforezy Bio-Rad, Dual Color 10-250 kDa, 161-0375
bibuła filtracyjna

50 ml 30% akrylamid, 2,67% bis-akrylamid

14,6 g akrylamid

0,4 g N,N'metylene-bis-akrylamid

woda do 50ml

Przefiltrować przez sączek 0,2 μ m, można przechowywać do miesiąca w lodówce.

*Roztwory akrylamidu i bis-akrylamidu kwalifikowane są jako środki o potencjalnym działaniu rakotwórczym.
W trakcie operowania odczynnikami należy zachować szczególną ostrożność!*

50 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

9,075 g Tris

30 ml woda

za pomocą 6M HCl ustawić pH na 8,8 (dodając kropelkami pod kontrolą pH-metru)

woda do 50 ml

Przefiltrować przez sączek 0,2 μ m, można przechowywać do miesiąca w lodówce.

50 ml 5 M Tris-HCl, pH 6,8

3 g Tris

30 ml woda

za pomocą 6 M HCl ustawić pH na 6,8 (dodając kropelkami pod kontrolą pH-metru)

woda do 50 ml

Przefiltrować przez sączek 0,2 μ m, można przechowywać do miesiąca w lodówce.

10 ml 10% SDS



1,0 g SDS
woda do 10 ml

0,2 ml 10% APS (przygotować bezpośrednio przed użyciem)

0,02 g APS
0,2 ml woda

1 ml bufor próbkowy, 62,5 mM Tris-HCL, 20% glicerol, 2% SDS, 5% β -merkaptoetanol, pH 6,8

0,15 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
0,2 ml 10% SDS
0,2 ml glicerol
0,4 ml woda
0,05 ml 0,5% bromofenol blue
0,05 ml β -merkaptoetanol

Przygotowany roztwór nie zawiera β -merkaptoetanolu, dodać bezpośrednio przed analizą.

200 ml 5x bufor rozdzielający, po rozcieńczeniu 25 mM Tris, 192 mM Gly, 0,1% SDS, pH 8,3

2,4 g Tris
11,52 g Gly
1 g SDS
woda do 100 ml

Bezpośrednio przed użyciem roztwór rozcieńczyć do wartości roboczych. Do wykonania oznaczenia wystarczy 2000 ml roztworu rozcieńczonego.

100 ml 0,125% CBB w woda : metanol : kwas octowy (50:40:10)

0,125 g CBB R250
50 ml H₂O
40 ml MeOH
10 ml CH₃COOH

500 ml roztwór odbarwiający woda : metanol : kwas octowy (50:40:10)

250 ml H₂O
200 ml MeOH
50 ml CH₃COOH

10 ml 50% izopropanol

5 ml izopropanol
5 ml woda

Sprzęt

zasilacz do elektroforezy Biometra Power Pack P25T

zestaw do elektroforezy Tetra System Mini Protean (z zaślepką na 1 żel)

zestaw do wylewania żeli, klamry, gąbki, szybki z przekładkami 1,0 mm

łaźnia wodna o temperaturze 95°C

statyw pływający do łaźni wodnej



kolba miarowa z korkiem 10, 50, 100, 200, 500 ml

cyliny miarowe 50, 100, 250, 1000 ml

zlewki szklane 100, 1000 ml

szalka Pertiego o średnicy ok 15 cm

próbówki Falcon 15 ml

próbówki Eppendorf 1,5 ml

statyw do próbek Falcon 15 ml

statyw na próbówki Eppendorf 1,5 ml

pipetki Pasteura

oprogramowanie GelAnalyzer (www.gelanalyzer.com) lub inne o podobnych możliwościach np.: ImageJ (imagej.net, wersja w przeglądarce ij.imjoy.io)

Wykonanie

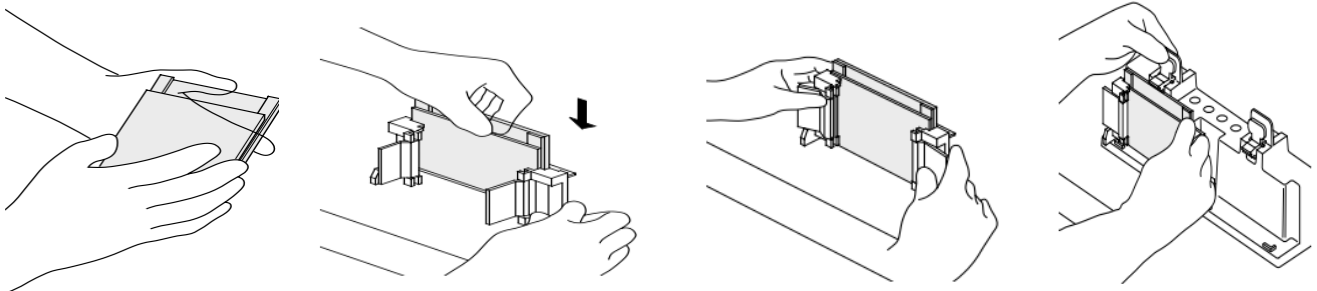
Przygotowanie żeli

1. Przygotować 10% roztwór APS.
2. Przygotować 12 ml 15% żelu rozdzielającego zgodnie z tabelką (w próbówce Falcon 15 ml):

Składnik	Ilość
H ₂ O	2,52 ml
30% akrylamid	6,36 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,00 ml
10% SDS	0,12 ml

Unikać intensywnego mieszania roztworu, tlen jest inhibitorem polimeryzacji akrylamidu katalizowanej APS.

3. Przygotować szybki z przekładkami 1,0 mm do wylania żeli.



4. Złożyć szybkę z przekładkami i szybką wewnętrzną/krótszą (zgodnie z rysunkiem). Umieścić złożone szybki w statywie, zamknąć klamerki odginając je do oporu na zewnątrz, upewniając się, że dolne krawędzie szybek są równo złożone.
5. Umieścić zestaw w statywie do wylewania żeli upewniając się, że gąbka uszczelniająca szczelnie zamyka dół zestawu.



Sprawdzić szczelność zestawu wlewając wodę do pełna. Jeśli układ jest szczelny wylać wodę a jej pozostałości usunąć odsączając paskiem bibuły filtracyjnej..

6. Po złożeniu zestawu do wylewania żelu dodać 10% APS i TEMED, wymieszać i natychmiast wylewać żele:

Składnik	Ilość
10% APS	0,12 ml
TEMED	4,8 μ l

7. Za pomocą pipetki Pasteura wylać żel pomiędzy płytki, do poziomu dolnej krawędzi zielonej belki. Około 1,5 ml żelu przenieść do Eppendorfa (jako kontrola polimeryzacji).
 8. Odizolować żel od dostępu powietrza rozprowadzając po całej powierzchni żelu 0,2 ml 50% roztworu izopropanolu. Żele odstawić do polimeryzacji (około 15-20 min).
 9. Przygotować 10 ml 4% roztworu żelu zagęszczającego:

Składnik	Ilość
woda	6,1 ml
30% akrylamid	1,3 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml

Unikać intensywnego mieszania roztworu, tlen jest inhibitorem polimeryzacji akrylamidu katalizowanej APS.

10. Ze spolimeryzowanego żelu usunąć roztwór izopropanolu, powierzchnię przepłukać kilkakrotnie wodą.
 11. Przepłukać powierzchnie żelu za pomocą niewielkiej ilości żelu zagęszczającego.
 12. Po przepłukaniu żeli rozdzielających, dodać 10% APS i TEMED, wymieszać i natychmiast wylewać żele:

Składnik	Ilość
10% APS	0,05 ml
TEMED	10 μ l

13. Za pomocą pipetki Pasteura nanieść żel zagęszczający do pełna, usuwając pęcherzyki i pianę jeśli potrzeba. Około 1,5 ml żelu przenieść do Eppendorfa (jako kontrola polimeryzacji).
 14. Wcisnąć grzebień do oporu (część żelu może wypłynąć). Żele odstawić do polimeryzacji (około 10-15 min).

Przygotowanie próbek

1. W probówkach Eppendorf o pojemności 1,5 ml rozcieńczyć próbki: 10 μ l osocza z 150 μ l buforu próbkowego. Oznaczenia próbek zapisać w tabeli.

Próba	Ilość osocza	Bufor próbkowy	Dołek w żelu
standard mas	-	-	1
	10 μ l	150 μ l	2
			3



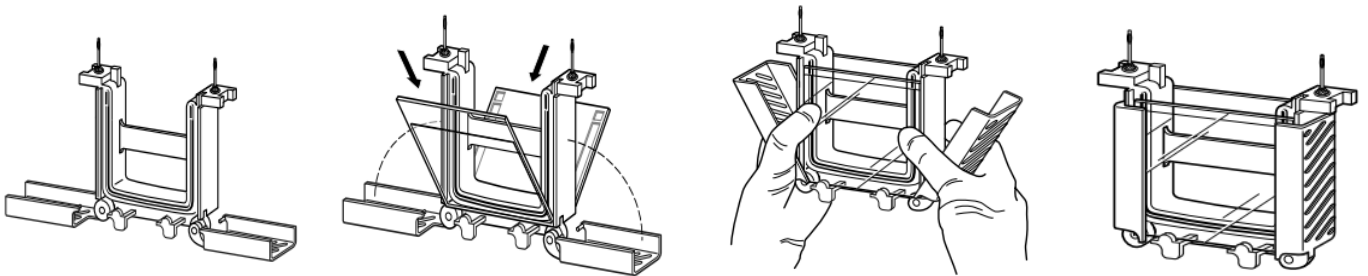
Próba	Ilość osocza	Bufor próbkowy	Dołek w żelu
			4
			5
			6
			7
			8
			9
			10

Jeśli ilość próbek jest mniejsza niż ilość wolnych dołków w żelu można dozować próbki w powtórzeniach.

1. Próby wymieszać na vortexie i wstawić w statywie pływającym do łaźni wodnej o temperaturze 95°C na 5 min.
2. Próby ochłodzić do temperatury otoczenia.

Nanoszenie próby na żel

1. Po polimeryzacji szybki z żelem wyjąć ze statywu, opłukać wodą usuwając z zewnątrz pozostałości żelu.
2. Delikatnie wyjąć grzebień, grzebień wyciągamy zdecydowanym ruchem zwracając uwagę aby nie uszkodzić studzienek.



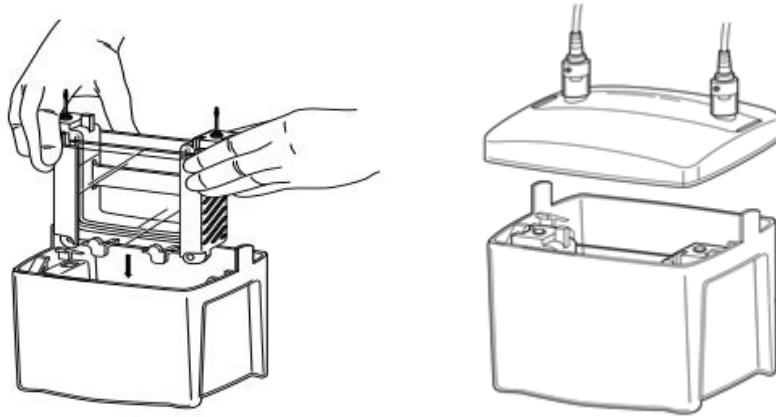
1. Włożyć szybki z żelem do układu do elektroforezy (zgodnie z rysunkiem).

W przypadku 1-2 żeli użyć zestawu z wyprowadzeniami na elektrody (jak na rysunku), w przypadku 3-4 żeli wykorzystać dodatkowo zestaw bez wyprowadzeń na elektrody, gdy liczba żeli jest nieparzysta użyć zaślepki zestawu.

2. Szybki wkładamy krótszą szybką do środka, upewniając się, że krawędzie szybki dopasowały się do pogrubień w uszczelkach zestawu. Zaciśnięć klamery składając je do środka.
3. Za pomocą pipetki Pasteura trzykrotnie przepłukać buforem rozdzielającym studzienki w żelu (delikatnie wprowadzając roztwór do studzienek, aż się wyleje, wylać roztwór przekręcając zestaw do góry nogami).
4. Zalać buforem wprowadzającym układ do elektroforezy (do pełna).
5. Za pomocą pipety do studzienek nanieść 15 μ l próby (zgodnie ze schematem dozowania w tabeli). Do studzienki 1 dodać 5 μ l standardu mas cząsteczkowych.

W celu ułatwienia dozowania można użyć odpowiednio ukształtowanego pomocnika ładowania. Końcówkę pipety wprowadzać pomiędzy szybki poniżej krawędzi szybki krótszej, próbę dozować powolnym jednostajnym ruchem.





- Więszy pojemnik zestawu do elektroforezy napełnić buforem rozdzielającym do poziomu oznaczonego „2 Gels”, umieścić zestaw z naniesionymi próbami w pojemniku. Założyć pokrywkę z wyprowadzeniami (upewnić się, że weszła w prowadnice)

Zestaw z wyprowadzonymi elektrodami umieścić w większym pojemniku w pozycji przy wystających prowadnicach upewnić się że zestaw wszedł w prowadnice w dnie pojemnika, zwracając uwagę na biegunowość elektrod (czarny do czarnego, czerwony do czerwonego), założyć pokrywkę z wyprowadzeniami (upewnić się, że weszła w prowadnice).

Rozdział elektroforetyczny

- Podłączyć zestaw do zasilacza. Prowadzić rozdział przy parametrach: 200 V, 100 mA przez około 45 min (do momentu aż barwnik osiągnie koniec żelu).
- Po zakończeniu rozdziału odłączyć zasilacz od zestawu, zdjąć pokrywkę z wyprowadzeniami, wylać roztwór i wyjąć szybkę z żelem.

Barwienie białek CBB

- Przy pomocy klina otworzyć szybki i przenieść żel do pojemnika do wybarwiania (szalka Pertiego o średnicy ok 15 cm).
- Zalać żel 50 ml roztworu barwiącego (0,125% CBB w roztworze woda : metanol : kwas octowy 50:40:10).
- Przykryć pojemnik i wstawić na kołyskę. Proces wybarwiania w temperaturze pokojowej prowadzić przez co najmniej 12h.
- Za pomocą pompki z pojemnikiem odessać roztwór CBB, żel przepłukać 3 x 5 minut po 50 ml w roztworze woda : metanol : kwas octowy 50:40:10). Po trzeciej zmianie pozostawić na kilka godzin w roztworze woda : metanol : kwas octowy 50:40:10) do odbarwienia.
- Po odbarwieniu przenieść żel do pojemnika z wodą.

Archiwizacja i obróbka wybarwionych żeli

- Po odbarwieniu żele zeskanować lub wykonać fotografię.

Żele można przechowywać w wodzie w warunkach chłodniczych przez kilka tygodni.

Żele można też wysuszyć pomiędzy dwoma przekładkami celofanowymi po uprzednim namoczeniu w 5% roztworze glicerolu w wodzie (około 30-45 minut).



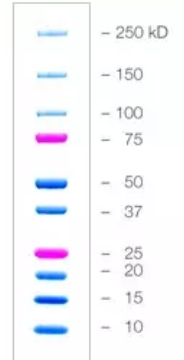
Opracowanie wyników

1. Do sprawozdania dołączyć dokumentację fotograficzną żelu.

W trakcie trwania ćwiczeń przygotować roztwór odbarwiający.

Ze względu na długotrwały proces odbarwiania po żele proszę zgłosić się do prowadzącego.

2. Za pomocą oprogramowania GelAnalyzer (www.gelanalyzer.com) wykreślić elektroforegram dla każdej z próbek, obliczyć masę oraz objętość plamki, wyniki przedstawić w formie wykresu i tabelarycznej.
3. Wskazać różnice w elektroforegramach osocza różnych gatunków zwierząt.



FRAP (ferric reducing ability of plasma)

Cel ćwiczenia: Ocena całkowitej zdolności redukcyjnych prób osocza zwierzęcego.

Podstawy teoretyczne

Potencjalnie szkodliwe reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS), produkowane w wyniku metabolizmu tlenowego, są zwykle usuwane przez różne przeciwutleniacze. Aczkolwiek, deficyty w obronie antyoksydacyjnej (np. w przebiegu różnych chorób serca, czy nowotworów) mogą prowadzić do zwiększonego stresu oksydacyjnego. Testy, które mierzą zdolność do przeciwdziałania utleniania w płynach ustrojowych mogą być użyteczne do oceny zdolności obrony organizmu przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Jedną z metod oceny całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (ang. total antioxidant capacity, TAC) jest FRAP (ang. ferric reducing ability of plasma) – opierająca się o zdolność osocza do redukcji jonów żelaza. W niskim pH, kiedy kompleks tripirydylotriazyny (Fe^{3+} -TPTZ) jest redukowany do formy Fe^{2+} -TPTZ, roztwór przyjmuje intensywnie niebieski kolor, który można zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 593 nm (maximum absorpcji).

	Kwas moczowy	Grupy -SH białek	Tokoferol	Askorbinian
TRAP	58	21	7	14
FRAP	60	10	5	15

Udział procentowy poszczególnych składników osocza w całkowitej zdolności redukcyjnej wybranymi metodami. TRAP, metoda oparta na zdolności do redukcji rodnika 2,2'-azobis(2-amidynopropan) (ABAP). FRAP, metoda oparta na pomiarze zdolności do redukcji jonu żelazowego(Fe^{3+})-2,4,6-tripirydylo-s-triazyny (TPTZ).

Literatura

1. Benzie IF, Strain JJ – The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power”: The FRAP assay. Anal Biochem 1996, 239, 70-76
2. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie, Bartosz Grzegorz, Wydawnictwo Naukowe PW, 2022; ISBN: 9788301138479

Odczynniki

0,5 ml osocza różnych gatunków zwierząt
kazeina lub BSA

50 ml 10 mmol/l TPTZ w 40mmol/l HCl
0,156 g TPTZ (2,4,6-tripirydylo-s-triazine)
0,174 ml stężonego HCl
woda do 50 ml

50 ml 20 mmol/l $FeCl_3$
0,27 g $FeCl_3 \times 6 H_2O$
woda do 50 ml



100 ml 300 mmol/l CH_3COONa
4,08 g $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$
woda do 100 ml

1000 ml 300 mmol/l CH_3COOH
18 ml lodowatego CH_3COOH
woda do 1000 ml

1000 ml 300 mmol/l bufor octanowy, pH 3,6
75 ml 300 mmol/l CH_3COONa
do 1000 ml uzupełnić 300 mmol/l CH_3COOH
sprawdzić za pomocą pH-metru wartość pH.

100 ml 20 mmol/l FeSO_4
0,556 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
woda do 100 ml

Bezpośrednio przed użyciem roztwór rozcieńczyć 10x wodą uzyskując roztwór standardowy 2000 $\mu\text{mol/l}$ Fe^{2+} .

roztwór roboczy FRAP 30 ml (na 12 pomiarów)
25 ml buforu octanowego
2,5 ml 10 mmol/l TPTZ w 40mmol/l HCl
2,5 ml 20 mmol/l FeCl_3

Przygotować bezpośrednio przed oznaczeniem, dobrać ilość wystarczającą na przeprowadzenie wszystkich oznaczeń.

500 ml 10% NaOH
50 g NaOH
woda do 500 ml

1000 ml odczynnik biuretowy
1,5 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$,
6,0 g winianu sodowo-potasowego
300 ml 10% NaOH
2 g KI
woda do 1000 ml

Najpierw rozpuścić $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ i winianu sodowo-potasowego w 500 ml wody destylowanej w kolbie miarowej na 1 dm^3 . Następnie małymi porcjami, stale mieszając, dodać 10% NaOH oraz KI. Odczynnik jest stabilny w temperaturze pokojowej przez co najmniej 6 miesięcy.

Sprzęt

spektrofotometr UV/Vis

vortex

kolby miarowe 50, 100, 500 i 1000 ml



Wykonanie

Pomiar białka w próbach metodą biuretową

- Przygotować roztwory kazeiny do krzywej kalibracyjnej metody biuretowej pomiaru białka zgodnie z tabelą, następnie dodać 2 ml odczynnika miedziowego. Próbkę wymieszać na vortexie i po 30 minutach zmierzyć absorbancję przy długości fali 545 nm. Pomiary wykonać co najmniej w 2 powtórzeniach.

Próba	Roztwór kazeiny [1 g/l], ml	Woda destylowana, ml	Stężenie białka [g/l]	Absorbancja
0	-	0,5	0	
1	0,5	-	1	
2	0,4	0,1	0,8	
3	0,3	0,2	0,6	
4	0,2	0,3	0,4	
5	0,1	0,4	0,2	

- Równolegle zmierzyć stężenie białka w rozcieńczonych próbach osocza (rozcieńczyć 10 – 20x). Odmierzyć 0,5 ml rozcieńczonego osocza i 2 ml odczynnika miedziowego, wymieszać na vortexie, po 30 minutach mierzyć absorbancję analogicznie jak w próbach kazeiny.

Krzywa kalibracyjna FRAP

- Poprzez kolejne rozcieńczenia roztworu standardu wykonać standardy jonów Fe^{2+} w zakresie 0-1000 $\mu\text{mol/l}$ zgodnie z tabelą.
- Rozcieńczenia wykonać w 3 powtórzeniach i zmierzyć absorbancję roztworów przy długości fali 593 nm wobec wody jako próby zerowej. Wyniki zapisać w tabeli.

Próba	Stężenie Fe^{2+} [$\mu\text{mol/l}$]	Absorbancja				
		pomiar 1	pomiar 2	pomiar 3	średnia	odchylenie standardowe
1	2000					
2	1000					
3	500					
4	250					
5	125					
6	62,5					
7	0					

Pomiar FRAP

- Rozcieńczyć próbki osocza w 0,9% NaCl. Standardowo używa się rozcieńczenia 2x.
- W kuwetce do spektrofotometru do 2,25 ml roztworu roboczego FRAP dodać 25 μl rozcieńczonego osocza.



3. Obliczyć FRAP [$\mu\text{mol/g}$] korzystając z równania:

$$FRAP \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \right] = \frac{[(P_{10} - P_0)/a] \times R}{C \text{ białka}}$$

P_0 , P_{10} - absorbancje próby w czasie 0 i po 10 min, odpowiednio

R - rozcieńczenie próby

C białka – stężenie białka [g/l]

Opracowanie wyników

1. Wykreślić krzywą wzorcową, zależność absorbancji od stężenia próby. Obliczyć i podać równanie krzywej regresji uwzględniając punkt 0. Do sprawozdania dołączyć źródłowy plik arkusza kalkulacyjnego i niezbędne obliczenia.
2. Obliczyć wartości FRAP [$\mu\text{mol/g}$] dla wszystkich zmierzonych próbek, a następnie wartości średnie pomiarów oraz obliczyć odchylenie standardowe serii pomiarów. Wyniki przedstawić w formie wykresu słupkowego z zaznaczonymi punktami pomiarowymi. Do sprawozdania dołączyć źródłowy plik arkusza kalkulacyjnego i niezbędne obliczenia.
3. Wyjaśnić co wpływa na zdolność antyoksydacyjną osocza.



Ilościowe oznaczanie hemoglobiny

Cel ćwiczenia Porównanie wyników oznaczania hemoglobiny we krwi za pomocą różnych metod analitycznych

Podstawy teoretyczne

W skład erytrocytów aż 30% (suchej masy) wchodzi barwnik krwi – hemoglobina. Jest to chromoproteina powstająca w czerwonym szpiku kostnym o masie około 65 000 kDa, zawierającej 0,34% żelaza. Zawartość hemoglobiny w krwi jest zmienna i waha się w granicach 11-17 g/100ml (g/dl, u ludzi w zależności od płci, aktywności fizycznej). Zmniejszenie stężenia hemoglobiny występuje w niedokrwistościach i stanach zwiększonej podaży wody (przewodnienia), natomiast zwiększenie w przypadku odwodnienia oraz policytemii pierwotnej i wtórnej. Wynik oznaczenia hemoglobiny sztucznie zawyża lipemia.

	pies	kot	krowa	koń	świnia	owca	koza
Białko w osoczu, [g/l]	55-75	60-80	60-80	57-75	58-80	65-84	65-89
Hemoglobina, [g/l]	133-197	93-153	84-120	112-169	99-158	99-151	67-132
Hematokryt, [l/l]	0,39-0,56	0,28-0,49	0,21-0,30	0,28-0,44	0,32-0,50	0,26-0,41	0,25-0,40

Wartości referencyjne dla wybranych gatunków zwierząt. Konie trenujące mogą mieć znacznie wyższe parametry hemoglobiny do 127–188 g/l oraz hematokrytu do 0,38–0,55 l/l.

Hemoglobina jest koloru silnie czerwonego, co pozwala na użycie technik kolorymetrycznych lub spektrofotometrycznych do jej analizy. Pomiar hemoglobiny we krwi można wykonać kilkoma metodami, jedną z najpopularniejszych metod jest ta z odczynnikiem Drabkina lub poprzez pomiar zawartości żelaza i odpowiednie przeliczenie.

Hemoglobina i jej pochodne (z wyjątkiem sulfohemoglobiny) pod wpływem odczynnika Drabkina ulegają przekształceniu w trwałą pochodną cyjanową – cyjanomethemoglobinę, wykazującą maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda_{\max}=540$ nm z molowym współczynnikiem absorpcji $\epsilon_{540}=44000(\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$.

Cząsteczka hemoglobiny zawiera 0,34% żelaza. Z ilości żelaza w roztworze można obliczyć stężenie hemoglobiny.

W analizatorach automatycznych z zawartości hemoglobiny i objętości krwinek czerwonych obliczany jest hematokryt, w przypadku zaburzeń ciśnienia osmotycznego lub policytemii pociąga to za sobą błędy oszacowania.

Literatura

- Ćwiczenia z biochemii, 2013, Redakcja: Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz, ISBN: 978-83-01139-44-5, Wydawnictwo Naukowe PWN
- Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej, wyd. IV, 2017, A. Dembińska-Kieć, J.W. Naskalski, B. Solnica, ISBN 978-83-65625-50-2, Edra Urban & Partner,
- Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology, 2011, Latimer KS, Duncan & Prasse's 5th ed., Wiley-Blackwell,
- Veterinary Hematology, 6th ed., 2010, Weiss DJ, Wardrop KJ, Schalm's Wiley-Blackwell,



Odczynniki

około 0,5 ml próbek krwi
perhydrol (30% H₂O₂)
25% roztwór NH₃
72% HClO₄.

1000 ml odczynnik Drabkina

0,305 g K₃[Fe(CN)₆],
1 g NaHCO₃
0,05 g KCN
woda do 1000 ml

W ciemnej butelce i temperaturze ok 4°C odczynnik można przechowywać przez kilka miesięcy.

1000 ml 20% kwas sulfosalicylowy

233,03 g kwas 5-sulfosalicylowy 2 hydrat
woda do 1000 ml

1000 ml roztwór wzorcowy żelaza Fe 10µg/ml.

86,3 mg NH₄Fe(SO₄)₂ · 12H₂O
10 ml stężonego H₂SO₄
woda do 1000 ml

Sprzęt

spektrofotometr UV/Vis
kolby miarowe 1000 ml

Wykonanie

Pomiar hemoglobiny za pomocą odczynnika Drabkina

1. Odmierzyć 5 ml odczynnika Drabkina, a następnie dodać 20 µl krwi, przepłukując pipetę odczynnikiem.
2. Po 15 minutach odczytać wartość absorbancji przy λ_{max}=540 nm wobec odczynnika Drabkina jako próby zerowej (odczynnikowej).
3. Steżenie hemoglobiny można obliczyć z odczytanej absorbancji, przyjmując wartość ε₅₄₀=44000 M⁻¹·cm⁻¹ (milimolowy współczynnik absorpcji):

$$Hb \left[\frac{g}{100ml} \right] = \frac{A \cdot M_{Hb} \cdot R}{\epsilon_{540} \cdot 10} = \frac{A \cdot 64400 \left[\frac{g}{M} \right] \cdot 251}{44000 [M^{-1} \cdot cm^{-1}] \cdot 10} = A \cdot 36,7$$

gdzie:

A – absorbancja przy 540 nm po 15 minutach

M_{Hb} – masa molowa hemoglobiny 64400 [g/M]

R – współczynnik rozcieńczenia = 5020 µl / 20 µl = 251

ε₅₄₀ - molowy współczynnik absorpcji = 44000 (M⁻¹·cm⁻¹)

Alternatywnie można wykorzystać krzywą kalibracyjną używając gotowego wzorca cyjanomethemoglobiny.



Ilościowe oznaczanie hemoglobiny na podstawie zawartości żelaza

1. Do probówki wprowadzić 50 μl krwi, następnie dodać 200 μl roztworu HClO_4 i 200 μl perhydrolu.
2. Ogrzewać przez 30 minut we wrzącej łaźni wodnej do całkowitego odbarwienia się roztworu.
3. Po mineralizacji dodać 500 μl 20% roztworu kwasu sulfosalicylowego i 1 ml roztworu amoniaku, uzupełnić wodą do 5 ml i oznaczyć absorbancję przy $\lambda_{\text{max}}=420$ nm wobec próby kontrolnej (wykonanej analogicznie tylko bez krwi).
4. Oznaczenia stężenia w roztworach wzorcowych przeprowadza się dodając 2 ml roztworu zawierającego kilka mg Fe.
5. Obliczenie stężenia żelaza:

$$\mu\text{g Fe w próbce badanej} = \frac{A_b}{A_w} \cdot \mu\text{g Fe w roztworze wzorcowym}$$

Obliczenie stężenia procentowego hemoglobiny we krwi:

$$\text{Hb}[\%] = \frac{A_b}{A_w} \cdot x \cdot \frac{100}{0,05} \cdot \frac{100}{0,34} \cdot \frac{1}{1000000} = \frac{A_b}{A_w} \cdot x \cdot 0,59$$

gdzie

A_b – absorbancja próby badanej

A_w – absorbancja próby wzorcowej

x – ilość μg Fe w roztworze wzorcowym

Opracowanie wyników

1. Przedstawić otrzymane wyniki oznaczenia hemoglobiny w próbach.
2. Wskazać skąd mogą pochodzić różnice w oznaczeniach dwoma metodami.



A-400 BIL TOTAL

Nr kat. **7-445** (PL)

ZASTOSOWANIE

Zestaw diagnostyczny do oznaczania stężenia bilirubiny całkowitej, przeznaczony do wykonywania oznaczeń na automatycznych analizatorach BS-400 i BS-480. Odczynniki powinny być stosowane do badań diagnostycznych *in vitro*, przez odpowiednio przeszkolony personel, tylko zgodnie z ich przeznaczeniem, w odpowiednich warunkach laboratoryjnych.

WPROWADZENIE

Bilirubina jest żółtym barwnikiem – produktem degradacji hemu. Dla celów klinicznych bilirubinę wyraża się jako dwie frakcje: związaną i wolną. W hepatocytach bilirubina jest enzymatycznie wiązana z resztami kwasu glukuronowego. Taką formę bilirubiny nazywa się bezpośrednią lub związaną. Bilirubina niezmodyfikowana kwasem glukuronowym wiąże się z albuminą i jest określana jako pośrednia lub wolna. Bilirubinę pośrednią oblicza się jako różnicę bilirubiny całkowitej i bezpośredniej.

Określanie poziomu bilirubiny w surowicy krwi jest powszechnie stosowanym badaniem monitorującym czynność wątroby. Hiperbilirubinemia jest zazwyczaj wynikiem żółtaczki (mechanicznej lub hemolitycznej), zespołów: Dubina-Jonsona, Gilberta, Criglera-Najjara, chorób dróg żółciowych.

ZASADA METODY

Metoda oparta na oksydacji z użyciem wanadanu jako czynnika utleniającego.

W obecności detergentu i soli kwasu wanadowego, w środowisku kwaśnym, bilirubina całkowita (zarówno związana - bezpośrednia jak i niezwiązana) jest utleniana do biliwerdyny.

Reakcja oksydacji powoduje zmianę żółtego zabarwienia, charakterystycznego dla bilirubiny, do barwy zielonej, właściwej dla biliwerdyny. Dlatego stężenie bilirubiny całkowitej w próbce może być wyznaczone przez pomiar absorbancji przed i po oksydacji wanadanem.

ODCZYNNIKI

Skład zestawu
1-REAGENT 2 x 31 ml
2-REAGENT 1 x 17 ml

Ilość testów BS-400 300
Ilość testów BS-480 200

Odczynniki przechowywane w temp. 10-25°C zachowują trwałość do daty ważności podanej na opakowaniu. Stabilność odczynników przechowywanych na pokładzie aparatu w 2-10°C wynosi 11 tygodni.

Stężenia składników w zestawie

1-REAGENT
bufor cytrynianowy (pH 2,8) 90 mmol/l
detergent

2-REAGENT
bufor fosforanowy (pH 7,0) 4,6 mmol/l
metawanadan sodu 3,0 mmol/l

Ostrzeżenia i uwagi

- Nie zamrażać odczynników.
- Chronić przed bezpośrednim światłem słonecznym i zanieczyszczeniem!
- Nie używać po upływie daty ważności.
- Nie zamieniać nakrętek.
- Przed użyciem wszystkie odczynniki należy delikatnie wymieszać przez odwracanie butelki.
- Pojawienie się zmętnienia lub wyniki oznaczeń surowic kontrolnych poza wyznaczonym zakresem mogą wskazywać na niestabilność odczynników.
- Brak widocznej zmiany zabarwienia mieszaniny reakcyjnej przy próbkach o niższym stężeniu bilirubiny nie oznacza nieprawidłowego działania odczynnika.
- Należy zapoznać się z Kartą charakterystyki (MSDS), która zawiera szczegółowe informacje dotyczące zasad bezpiecznego przechowywania i stosowania wyrobu.
- 1-REAGENT spełnia kryteria klasyfikacji zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008.

Uwaga



H319 Działa drażniąco na oczy.
H410 Działa bardzo toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.
P280 Stosować rękawice ochronne, odzież ochronną, ochronę oczu lub ochronę twarzy.
P305 + P351 + P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć.



Nadal płukać.
P273 Unikać uwolnienia do środowiska.
P391 Zebrać wyciek.

MATERIAŁ BIOLOGICZNY

Surowica bez śladów hemolizy.
Czerwone krwinki należy jak najszybciej oddzielić od surowicy.

Stężenie bilirubiny całkowitej w surowicach lipemicznych może być fałszywie zaniżone, dlatego wskazane jest wykonanie badania na czczo. Przy pobieraniu i dalszym postępowaniu z próbką zaleca się stosowanie procedur CLSI. Bilirubina jest wrażliwa na światło (ulega fotooksydacji), dlatego próbki należy chronić przed bezpośrednią ekspozycją na światło zarówno słoneczne, jak i sztuczne. Dlatego wymagane jest aby surowica była przechowywana w ciemności w temp. 2-8°C, nie dłużej niż 3 dni.

Jednak polecamy wykonywać badania na świeżo pobranym materiale biologicznym!

WYKONANIE OZNACZENIA

1-REAGENT i 2-REAGENT są gotowe do użycia. Do wykonania próby zerowej należy używać wody dejonizowanej.

Wymagane działania:

W przypadku wykonywania oznaczeń z użyciem analizatora **BS-400**, może wystąpić, wpływający na wyniki oznaczeń, efekt **przeniesienia** pomiędzy odczynnikami: CREATININE – BIL TOTAL II GEN. W celu uniknięcia tego efektu należy zastosować się do zaleceń zawartych w instrukcji: 51_03_24_002_BS-400_CARRYOVER.

WARTOŚCI PRAWDŁOWE ⁴

Wiek	mg/dl	μmol/l
0 - 1 dni	< 8	< 137
1 - 2 dni	< 12	< 205
3 - 5 dni	< 16	< 274
5 dni - 60 lat	0,3 - 1,2	5 - 21
60 - 90 lat	0,2 - 1,1	3 - 19
> 90 lat	0,2 - 0,9	3 - 15

Zalecane jest opracowanie przez każde laboratorium własnych zakresów wartości prawidłowych charakterystycznych dla lokalnej populacji.

KONTROLA JAKOŚCI

W celu wewnętrznej kontroli jakości, do każdej serii oznaczeń należy dołączyć surowice kontrolne CORMAY SERUM HN (Nr kat. 5-172) i CORMAY SERUM HP (Nr kat. 5-173). Do kalibracji analizatorów automatycznych należy stosować CORMAY MULTICALIBRATOR LEVEL 1 (Nr kat. 5-174; 5-176) i LEVEL 2 (Nr kat. 5-175; 5-177). Jako kalibrator 0 należy używać wody dejonizowanej. Krzywa kalibracyjna powinna być sporządzana co 9 tygodni, przy każdej zmianie serii odczynnika lub w razie potrzeby np. jeśli wartości oznaczenia surowic kontrolnych nie mieszczą się w wyznaczonym zakresie.

CHARAKTERYSTYKA OZNACZENIA

Podane niżej rezultaty uzyskano używając automatycznych analizatorów BS-400 i BS-480. W przypadku przeprowadzenia oznaczenia na innym analizatorze lub manualnie otrzymane wyniki mogą różnić się od podanych.

■ Czulość:

0,06 mg/dl (1,03 μmol/l) – BS-400
0,07 mg/dl (1,20 μmol/l) – BS-480

■ Liniowość:

do 69 mg/dl (1180 μmol/l) – BS-400
do 48,7 mg/dl (832,9 μmol/l) – BS-480

■ Specyficzność / Interferencje

Hemoglobina do 0,25 g/dl, kwas askorbinowy do 500 mg/l i intralipid do 250 mg/dl nie wpływają na wyniki oznaczenia.

■ Precyzja

Powtarzalność (run to run)		Średnia [mg/dl]	SD [mg/dl]	CV [%]
BS-400 (n = 20)	poziom 1	1,00	0,02	1,73
	poziom 2	4,20	0,02	0,49
BS-480 (n = 10)	poziom 1	1,17	0,01	0,49
	poziom 2	4,33	0,01	0,13
Odtwarzalność (day to day)		Średnia [mg/dl]	SD [mg/dl]	CV [%]
BS-400 (n = 19)	poziom 1	1,03	0,08	7,26
	poziom 2	4,20	0,14	3,28
BS-480 (n = 10)	poziom 1	1,20	0,01	1,20
	poziom 2	4,46	0,05	1,21

■ Porównanie metody:

Porównanie zestawu firmy CORMAY (y) z innym ogólnie dostępnym zestawem komercyjnym (x), z użyciem 41 próbek, dało następujące wyniki:
 $y = 0,8872x + 0,0143$ mg/dl;
 $R = 0,999$ (R – współczynnik korelacji)
Porównanie wyników oznaczeń bilirubiny całkowitej wykonanych na **BS-480** (y) i na **Advia 1650** (x), z użyciem 82 próbek, dało następujące wyniki:
 $y = 0,9187x + 0,0385$ U/l;
 $R = 0,999$ (R – współczynnik korelacji)

UTYLIZACJA ODPADÓW

Postępować zgodnie z aktualnymi przepisami.

LITERATURA

- Tokuda K. Tanimoto K. New method of measuring serum bilirubin using vanadic acid. Jpn J Clin. Chem. 1993;22(2):116-122.
- Burtis C.A., Ashwood E.R., ed. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1999: 1803.
- Tietz NW. Fundamentals of Clinical Chemistry, 4th ed. Edited by Burtis CA. and Ashwood ER. WB Saunders Company; 1996: 547.
- Alan H.B. Wu: Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests, 4th ed. WB Saunders, 172 (2006).

Data wydania: 10. 2023.

A-400 BIL TOTAL

Cat. No **7-445** (EN)

INTENDED USE

Diagnostic kit for determination of total bilirubin concentration intended to use in automatic analysers BS-400 and BS-480.

The reagents must be used only for *in vitro* diagnostic, by suitably qualified laboratory personnel, only for the intended purpose, under appropriate laboratory conditions

INTRODUCTION

Bilirubin is a yellow pigment – product of heme degradation. For clinical purposes, bilirubin is expressed as two fractions: conjugated and unconjugated. In hepatocytes bilirubin is enzymatically conjugated with glucuronic acid residues. This form is called direct or conjugated. Bilirubin without glucuronic acid modification is bound to albumin and is termed unconjugated or indirect. Indirect bilirubin is calculated as the difference between total and direct bilirubin.

Serum bilirubin measurement is widely used as a screening test for liver functions. Hiperbilirubinemia is usually the result of jaundice (mechanical, hemolytic), Dubin-Johnson syndrome, Gilbert's syndrome, Crigler-Najjar syndrome, bile ducts disease.

METHOD PRINCIPLE

Method is based on chemical oxidation, utilizing vanadate as an oxidizing agent.

In the presence of detergent and vanadate in an acidic solution, total bilirubin (both conjugated – direct, and unconjugated bilirubin) is oxidized to produce biliverdin.

This oxidation reaction causes change of the yellow colour, which is specific to bilirubin to the green colour typical for biliverdin. Therefore, the total bilirubin concentration in the sample can be obtained by measuring the absorbance before and after the vanadate oxidation.

REAGENTS

Package

1-REAGENT 2 x 31 ml
2-REAGENT 1 x 17 ml

The reagents when stored at 10-25°C are stable up to expiry date printed on the package. The reagents are stable for 11 weeks on board the analyser at 2-10°C.

Concentrations in the test

1-REAGENT
citrate buffer (pH 2.8) 90 mmol/l
detergent
2-REAGENT
phosphate buffer (pH 7.0) 4.6 mmol/l
sodium metavanadate 3.0 mmol/l

Warnings and notes

- Do not freeze reagents.
- Protect from direct sunlight and avoid contamination!
- Do not use after expiry date.
- Do not interchange caps.
- Reagent bottles should be shaken before use by gently inverting several times.
- The appearance of turbidity or control sera values outside the manufacturer's acceptable range may indicate of the reagents instability.
- Lack of significant changes in the color of the reaction mixture at the samples with low bilirubin concentration does not indicate the assay malfunction.
- Please refer to the MSDS for detailed information concerning safe storage and use of the product.
- 1-REAGENT meeting the criteria for classification in accordance with Regulation (EC) No 1272/2008.

Warning



H319 Causes serious eye irritation.
H410 Very toxic to aquatic life with long lasting effects.



P280 Wear protective gloves, protective clothing, eye protection or face protection.
P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P273 Avoid release to the environment.

P391 Collect spillage.

SPECIMEN

Serum free from haemolysis.

Serum should be separated from red blood cells as soon as possible after blood collection.

Lipemic specimens may show falsely decreased bilirubin concentration thus fasting specimen is recommended. It is recommended to follow CLSI procedures regarding specimen collecting and handling.

Because bilirubin is photooxidized when exposed to light, specimen should be protected from direct exposure to either artificial light or sunlight. Therefore it is essential to store specimens in the dark at 2-8°C, at the most 3 days.

Nevertheless it is recommended to perform the assay with freshly collected samples!

PROCEDURE

1-REAGENT and 2-REAGENT are ready to use.

For reagent blank deionized water is recommended.

Actions required:

When performing assays at analyzer **BS-400**, there is a probability of **cross-contamination** affecting the tests results: CREATININE – BIL TOTAL II GEN. To avoid this effect follow the recommendations contained in the instruction 51_03_24_002_BS-400_CARRYOVER.

REFERENCE VALUES⁴

Age	mg/dl	μmol/l
0 - 1 days	< 8	< 137
1 - 2 days	< 12	< 205
3 - 5 days	< 16	< 274
5 days - 60 years	0.3 - 1.2	5 - 21
60 - 90 years	0.2 - 1.1	3 - 19
> 90 years	0.2 - 0.9	3 - 15

It is recommended for each laboratory to establish its own reference ranges for local population.

QUALITY CONTROL

For internal quality control it is recommended to use with each batch of samples the CORMAY SERUM HN (Cat. No 5-172) and CORMAY SERUM HP (Cat. No 5-173).

For the calibration of automatic analysers systems are recommended the CORMAY MULTICALIBRATOR LEVEL 1 (Cat. No 5-174; 5-176) and LEVEL 2 (Cat. No 5-175; 5-177). As a 0 calibrator deionized water should be used.

The calibration curve should be prepared every 9 weeks, with change of reagent lot number or as required e.g. quality control findings outside the specified range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The following results have been obtained using automatic analysers BS-400 and BS-480. Results may vary if a different instrument or a manual procedure is used.

Sensitivity:

0.06 mg/dl (1.03 μmol/l) – BS-400

0.07 mg/dl (1.20 μmol/l) – BS-480

Linearity:

up to 69 mg/dl (1180 μmol/l) – BS-400

up to 48.7 mg/dl (832.9 μmol/l) – BS-480

Specificity / Interferences

Haemoglobin up to 0.25 g/dl, ascorbic acid up to 500 mg/l and intralipid up to 250 mg/dl do not interfere with the test.

Precision

Repeatability (run to run)		Mean [mg/dl]	SD [mg/dl]	CV [%]
BS-400 (n = 20)	level 1	1.00	0.02	1.73
	level 2	4.20	0.02	0.49
BS-480 (n = 10)	level 1	1.17	0.01	0.49
	level 2	4.33	0.01	0.13
Reproducibility (day to day)		Mean [mg/dl]	SD [mg/dl]	CV [%]
BS-400 (n = 19)	level 1	1.03	0.08	7.26
	level 2	4.20	0.14	3.28
BS-480 (n = 10)	level 1	1.20	0.01	1.20
	level 2	4.46	0.05	1.21

Method comparison

A comparison between CORMAY reagent (y) and another commercially available assay (x) using 41 samples gave following results:

$y = 0.8872x + 0.0143$ mg/dl;

$R = 0.999$ (R – correlation coefficient)

A comparison between total bilirubin values determined at **BS-480** (y) and at **Advia 1650** (x) using 82 samples gave following results:

$y = 0.9187x + 0.0385$ U/l;

$R = 0.999$ (R – correlation coefficient)

WASTE MANAGEMENT

Please refer to local legal requirements.

LITERATURE

- Tokuda K, Tanimoto K. New method of measuring serum bilirubin using vanadic acid. Jpn J Clin. Chem. 1993;22(2):116-122.
- Burtis C.A., Ashwood E.R., ed. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1999: 1803.
- Tietz NW. Fundamentals of Clinical Chemistry, 4th ed. Edited by Burtis CA. and Ashwood ER. WB Saunders Company; 1996: 547.
- Alan H.B. Wu: Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests, 4th ed. WB Saunders, 172 (2006).

Date of issue: 10. 2023.

A-400 BIL TOTAL

Кат.№ 7-445

(RUS)

ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Диагностический набор для определения концентрации общего билирубина, предназначен для использования на автоматических анализаторах: BS-400 и BS-480. Реагенты должны использоваться только для диагностики *in vitro*, квалифицированным лабораторным персоналом, в целях, для которых они предназначены, в соответствующих лабораторных условиях.

ВВЕДЕНИЕ

Билирубин (пигмент желтого цвета) является продуктом распада гема. Для диагностических целей билирубин разделяют на две фракции: связанный и свободный. В гепатоцитах билирубин ферментативно связан с остатками глюкуроновой кислоты. Эта форма называется прямой или связанной. Немодифицированный билирубин связывается с альбумином и называется свободный или непрямой. Непрямой билирубин рассчитывается как разность между общим и прямым билирубином. Измерение сывороточного билирубина широко используется в качестве скрининг-теста при диагностике состояния печени. Гипербилирубинемия характерна для механической и гемолитической желтухи, синдромов Дубина-Джонсона, Гильберта, Криглера-Найра, поражений желчевыводящих путей.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на окислении в присутствии ванадата в качестве окислителя. В присутствии детергента и соли ванадовой кислоты, в кислой среде, общий билирубин (прямой и свободный) окисляется до биливердина. Данная реакция приводит к изменению желтой окраски, характерной для билирубина, на зеленую, характерную для биливердина. Поэтому концентрация общего билирубина в пробе может быть определена измерением абсорбции до и после окисления ванадатом.

РЕАГЕНТЫ

Состав набора

1-REAGENT 2 x 31 мл
2-REAGENT 1 x 17 мл

Реагенты при температуре 10-25°C сохраняют стабильность в течение всего срока годности, указанного на упаковке. Стабильность на борту анализатора при 2-10 °C составляет 11 недель.

Концентрации компонентов в реагентах

1-REAGENT
цитратный буфер (pH 2,8) 90 ммоль/л
детергент

2-REAGENT
фосфатный буфер (pH 7,0) 4,6 ммоль/л
метаванадат натрия 3,0 ммоль/л

Предостережения и примечания

- Не замораживать реагенты.
- Предохранять от загрязнений и прямого света!
- Не использовать после истечения срока годности.
- Не взаимозаменять крышек флаконов.
- Перед использованием все реактивы следует аккуратно перемешать, вращая флаконы.
- Помутнение растворов или непопадание результатов измерений контрольного материала в референтный диапазон, рекомендованный производителем, указывает на нестабильность реагентов.
- Отсутствие видимого изменения цвета реакционной смеси в образцах с низкой концентрацией билирубина не является признаком плохого качества реагента.
- Внимательно прочитайте паспорт безопасности химической продукции (MSDS), который содержит подробную информацию о правилах безопасного хранения и использования товара.
- 1-REAGENT соответствует критериям классификации согласно постановлению (ЕС) № 1272/2008.

Внимание



H319 Вызывает серьезное раздражение глаз.
H410 Очень токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями.



P280 Пользоваться защитными перчатками, защитной одеждой, средствами защиты глаз или лица.
P305 + P351 + P338 При попадании в глаза: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.
P273 Избегать попадания в окружающую среду.
P391 Собрать пролитую жидкость.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

Сыворотка крови без следов гемолиза. Эритроциты следует максимально быстро отделить от сыворотки. Липемические образцы могут давать псевдозаниженные результаты по билирубину, поэтому исследование следует производить натощак. При взятии биологического материала и дальнейшей работе с ним рекомендуется соблюдение процедур CLSI. Поскольку билирубин подвержен фотоокислению, образцы следует защищать от попадания прямых лучей, как от солнечного света, так и от искусственных источников света. Поэтому сыворотку следует хранить в темноте и при температуре 2-8°C не более 3-х дней. Тем не менее, рекомендуется производить исследования на свежезятом биологическом материале!

ПРОЦЕДУРА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1-REAGENT и 2-REAGENT готовы к использованию. В качестве бланк-реагента рекомендуется использовать деионизованную воду.

Необходимые действия:

При проведении анализов на анализаторе **BS-400**: возможно искажение результатов анализов, вызванное **перекрестным загрязнением** между реагентами **CREATININE – BIL TOTAL II GEN**. Чтобы избежать этого эффекта, следуйте рекомендациям, содержащимся в инструкции 51_03_24_002_BS-400_CARRYOVER.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ⁴

Возраст	мг/дл	мкмоль/л
0-1 дней	< 8	< 137
1-2 дней	< 12	< 205
3-5 дней	< 16	< 274
5 дней – 60 лет	0,3 - 1,2	5 - 21
60-90 лет	0,2 - 1,1	3 - 19
> 90 лет	0,2 - 0,9	3 - 15

Каждой лаборатории рекомендуется разработать собственные нормы, характерные для обследуемого контингента.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для внутреннего контроля качества при проведении исследований рекомендуется использовать контрольные сыворотки **CORMAY SERUM HN** (Кат. № 5-172) и **CORMAY SERUM HP** (Кат. № 5-173) для каждой серии измерений. Для калибровки автоматических анализаторов рекомендуется использовать **CORMAY MULTICALIBRATOR LEVEL 1** (Кат. № 5-174; 5-176) и **LEVEL 2** (Кат. № 5-175; 5-177). В качестве 0-калибратора рекомендуется использовать деионизованную воду. Калибровку рекомендуется проводить каждые 9 недель, при каждой смене лота реагентов и в случае необходимости, напр. если результаты определения контрольных сывороток не попадают в референтный диапазон.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Эти метрологические характеристики были получены при использовании автоматических анализаторов BS-400 и BS-480. Результаты, полученные на других анализаторах и вручную, могут отличаться.

Чувствительность:

0,06 мг/дл (1,03 мкмоль/л) – BS-400
0,07 мг/дл (1,20 мкмоль/л) – BS-480

Линейность:

до 69 мг/дл (1180 мкмоль/л) – BS-400
до 48,7 мг/дл (832,9 мкмоль/л) – BS-480

Специфичность / Интерференции

Гемоглобин до 0,25 г/дл, аскорбиновая кислота до 500 мг/л и интралипид до 250 мг/дл не влияют на результаты измерений.

Точность

Повторяемость (между сериями)		Среднее [мг/дл]	SD [мг/дл]	CV [%]
BS-400 (n = 20)	уровень 1	1,00	0,02	1,73
	уровень 2	4,20	0,02	0,49
BS-480 (n = 10)	уровень 1	1,17	0,01	0,49
	уровень 2	4,33	0,01	0,13

Воспроизводимость (изо дня в день)		Среднее [мг/дл]	SD [мг/дл]	CV [%]
BS-400 (n = 19)	уровень 1	1,03	0,08	7,26
	уровень 2	4,20	0,14	3,28
BS-480 (n = 10)	уровень 1	1,20	0,01	1,20
	уровень 2	4,46	0,05	1,21

Сравнение метода

Сравнение между реагентом **CORMAY** (y) и другим коммерчески доступным тестом (x) для 41 образцов дало следующие результаты:
y = 0,8872 x + 0,0143 мг/дл;
R = 0,999 (R – коэффициент корреляции)

Сравнение результатов определения общего билирубина, произведенных на анализаторах **BS-480** (y) и **Advia 1650** (x) для 82 образцов дало следующие результаты:
y = 0,9187 x + 0,0385 Ед/л;
R = 0,999 (R – коэффициент корреляции)

УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

В соответствии с локальными требованиями.

ЛИТЕРАТУРА

- Tokuda K. Tanimoto K. New method of measuring serum bilirubin using vanadic acid. Jpn J Clin. Chem. 1993;22(2);116-122.
- Burtis C.A., Ashwood E.R., ed. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1999: 1803.
- Tietz NW. Fundamentals of Clinical Chemistry, 4th ed. Edited by Burtis CA. and Ashwood ER. WB Saunders Company; 1996: 547.
- Alan H.B. Wu: Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests, 4th ed. WB Saunders, 172 (2006).

Дата создания: 10. 2023.

A-400 BIL TOTAL

PROGRAM NA ANALIZATOR: / APPLICATION: / АДАПТАЦИЯ:

• BS-400

• Basic		Reagent Volume		Sample Volume	
Test information					
No.	<input type="text" value="5"/>	R1	<input type="text" value="160"/>	Standard	<input type="text" value="3"/> <input type="text" value="15"/> <input type="text" value="10"/>
Test	<input type="text" value="BIL T"/>	R2	<input type="text" value="40"/>	Increased	<input type="text" value="6"/> <input type="text" value="15"/> <input type="text" value="10"/>
Full Name	<input type="text" value="Bilirubin Total"/>	R3	<input type="text"/>	Decreased	<input type="text"/>
Std. No.	<input type="text" value="5"/>	R4	<input type="text"/>		
Reaction Parameters				Result Setup	
Reac. Type	<input type="text" value="Endpoint"/>	Direction	<input type="text" value="Decrease"/>	Decimal	<input type="text" value="0.01"/> Slope <input type="text" value="1"/>
Pri. Wave	<input type="text" value="450 nm"/>	Rtg. Blank	<input type="text" value="38"/> <input type="text" value="39"/>	Unit	<input type="text" value="mg/dl"/> Inter <input type="text" value="0"/>
Sec. Wave	<input type="text" value="546 nm"/>	Reac. Time	<input type="text" value="79"/> <input type="text" value="80"/>		
Judgment Criteria					
Absorbance	<input type="text" value="0"/> <input type="text" value="0"/>	Lin. Range	<input type="text" value="0.06"/> <input type="text" value="69"/>	<input type="checkbox"/> Prozone	<input type="checkbox"/> Rate
Incre. Test	<input type="text" value="0"/>	Lin. Limit	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Q2	<input type="checkbox"/> Q3
Decre. Test	<input type="text" value="0"/>	Subs. Limit	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Q4	<input type="checkbox"/> Antigen
		PC	<input type="text" value="0"/>	ABS	<input type="text" value="0"/>

• Calibration		Judgment Criteria			
Calibration					
Rule	<input type="text" value="Multi-point Linear"/>	Sensitivity	<input type="text"/>	Blank Abs.	<input type="text"/>
Replicate	<input type="text" value="3"/>	Factor Diff.	<input type="text"/>	Error Limit	<input type="text"/>
K	<input type="text"/>	SD	<input type="text"/>	Corr. Coeff.	<input type="text"/>
• QC				Auto QC	
Rules					
Westgard Multi-rule		Cum. Sum Check		Interval <input type="text"/>	
<input type="checkbox"/> 1-2S	<input type="checkbox"/> R-4S	<input type="checkbox"/> 1.0 - 2.7			
<input type="checkbox"/> 1-3S	<input type="checkbox"/> 4-1S	<input checked="" type="checkbox"/> 1.0 - 3.0			
<input type="checkbox"/> 2-2S	<input type="checkbox"/> 10-X	<input type="checkbox"/> 0.5 - 5.1			

• BS-480

Chem	<input type="text" value="BIL T"/>	No.	<input type="text" value="005"/>	Sample Type	<input type="text" value="SERUM"/>
Chemistry	<input type="text" value="Bilirubin Total"/>	Print name	<input type="text" value="BIL T"/>		
Reaction Type	<input type="text" value="Endpoint"/>	Reaction Direction	<input type="text" value="Decrease"/>		
Pri Wave	<input type="text" value="450"/>	Sec Wave	<input type="text" value="546"/>		
Unit	<input type="text" value="mg/dl"/>	Decimal	<input type="text" value="0.01"/>		
Blank Time	<input type="text" value="46"/> <input type="text" value="47"/>	Reaction Time	<input type="text" value="81"/> <input type="text" value="82"/>		
Standard	Sample Vol <input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/>	Aspirated	<input type="text" value="20"/> <input type="text" value="20"/> <input type="text" value="20"/> <input type="text" value="20"/> <input type="text" value="20"/> <input type="text" value="20"/>	Diluent	<input type="text" value="180"/> <input type="text" value="180"/> <input type="text" value="180"/> <input type="text" value="180"/> <input type="text" value="180"/> <input type="text" value="180"/>
Decreased	<input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/>	Reagent Vol	<input type="text" value="240"/> <input type="text" value="240"/> <input type="text" value="240"/> <input type="text" value="240"/> <input type="text" value="240"/> <input type="text" value="240"/>	Diluent	<input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/>
Increased	<input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/> <input type="text" value="11"/>	R1	<input type="text" value="240"/> <input type="text" value="240"/> <input type="text" value="240"/> <input type="text" value="240"/> <input type="text" value="240"/> <input type="text" value="240"/>	R2	<input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/>
	<input type="checkbox"/> Sample Blank <input type="checkbox"/> Auto Retun	R3	<input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/>	R4	<input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/> <input type="text" value="60"/>
Linearity Range (Standard)	<input type="text" value="0.07"/> <input type="text" value="48.7"/>	Linearity Limit	<input type="text"/>		
Linearity Range (Decreased)	<input type="text"/>	Substrate Depletion	<input type="text"/>		
Linearity Range (Increased)	<input type="text"/>	Mixed Blank Abs	<input type="text" value="-33000"/> <input type="text" value="33000"/>		
R1 Blank Abs	<input type="text" value="-33000"/> <input type="text" value="33000"/>	Uncapping Time	<input type="text" value="84"/> Day(s)		
Blank Response	<input type="text" value="-33000"/> <input type="text" value="33000"/>	Reagent Alarm Limit	<input type="text"/>		
Twin Chemistry	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Enzyme Linear Extension			
<input type="checkbox"/> Prozone Check	<input type="checkbox"/> Rate Check	• Antigen Addition			
Q1 <input type="text" value="0"/>	Q2 <input type="text" value="0"/>	Q3 <input type="text" value="0"/>	Q4 <input type="text" value="0"/>		
PC <input type="text" value="0"/>	ABS <input type="text" value="0"/>				

Calibration Settings		Auto Calibration	
Math Model	<input type="text" value="Multi-point Linear"/>	<input type="checkbox"/> Bottle Changed	
Factor	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Lot Changed	
Replicates	<input type="text" value="3"/>	<input type="checkbox"/> Cal Time	
Acceptance Limits			
Cal Time	<input type="text" value="2016"/> Hour	SD	<input type="text"/>
Slope Diff	<input type="text"/>	Repeatability	<input type="text"/>
Sensitivity	<input type="text"/>		
Deter Coeff	<input type="text"/>		

Data wydania/ Date of issue:/ Дата создания: 10. 2023.

A-400 CHOL

Nr kat. **7-404** (PL)

ZASTOSOWANIE

Zestaw diagnostyczny do oznaczania stężenia cholesterolu całkowitego, przeznaczony do wykonywania oznaczeń na automatycznych analizatorach: BS-400 i BS-480.

Odczynniki powinny być stosowane do badań diagnostycznych *in vitro*, przez odpowiednio przeszkolony personel, tylko zgodnie z ich przeznaczeniem, w odpowiednich warunkach laboratoryjnych.

WPROWADZENIE

Cholesterol jest istotnym składnikiem strukturalnym błon komórkowych, prekursorem kwasów żółciowych i wszystkich hormonów steroidowych. Z tego wynika jego ogromne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Mimo to, istnieje również dobrze zbadana zależność pomiędzy poziomem cholesterolu we krwi a chorobą wieńcową serca. Oznaczenie poziomu cholesterolu w surowicy jest cenne w profilaktyce i monitorowaniu choroby naczyniowej serca oraz dla oceny funkcjonowania wątroby, pęcherzyka żółciowego i wchłaniania jelitowego.

ZASADA METODY

Metoda kolorymetryczna, enzymatyczna z esterazą i oksydazą cholesterolu (CHOD/PAP).

estry cholesterolu + H₂O $\xrightarrow{\text{CHE}}$ cholesterol + kwasy tłuszczowe

cholesterol + O₂ $\xrightarrow{\text{CHO}}$ cholest-4-en-3-on + H₂O₂

2 H₂O₂ + 4-aminoantypiryna + fenol $\xrightarrow{\text{POD}}$ chinonoimina + 4 H₂O
(czerwone zabarwienie)

Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia cholesterolu.

ODCZYNNIKI

Skład zestawu

1-REAGENT 4 x 40 ml

Ilość testów BS-400 640

Ilość testów BS-480 650

Odczynnik przechowywany w temp. 2-8°C zachowuje trwałość do daty ważności podanej na opakowaniu. Stabilność odczynników przechowywanych na pokładzie aparatu w 2-10°C wynosi 11 tygodni.

Stężenia składników w odczynniku

Bufor Good'a (pH 6,4) < 120 mmol/l
fenol < 6 mmol/l
4-aminoantypiryna < 0,4 mmol/l
esteraza cholesterolu (CHE) < 4 μkat/l
oksydaza cholesterolu (CHO) < 5 μkat/l
peroksydaza (POD) < 24 μkat/l
konserwanty, detergenty, stabilizatory

Ostrzeżenia i uwagi

- Chronic przed bezpośrednim światłem słonecznym i zanieczyszczeniem!

- Należy zapoznać się z Kartą charakterystyki (MSDS), która zawiera szczegółowe informacje dotyczące zasad bezpiecznego przechowywania i stosowania wyrobu.
- 1-REAGENT spełnia kryteria klasyfikacji zgodnie z Rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008.

Uwaga



H319 Działa drażniąco na oczy.
P280 Stosować rękawice ochronne, odzież ochronną, ochronę oczu lub ochronę twarzy.
P305+P351+P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać

MATERIAŁ BIOLOGICZNY

Surowica lub osocze krwi pobrane na EDTA lub heparynę (sól litowa, sodowa lub amonowa) bez śladów hemolizy. Przed pobraniem krwi pacjent powinien zachować ścisłą dietę (min. 12 godzin). Wskazane jest przyjęcie przez pacjenta pozycji siedzącej (ok. 30 minut). Do badań należy pobrać krew żylną. Czerwone krwinki należy jak najszybciej oddzielić od surowicy.

Wyniki stężeń cholesterolu dla osocza są niższe o ok. 3-5% w porównaniu do wyników uzyskiwanych dla surowicy. Surowica i osocze mogą być przechowywane do 3 dni w temp. 2-8°C lub 6 miesięcy w -20°C.

Jednak polecamy wykonywać badania na świeżo pobranym materiale biologicznym!

WYKONANIE OZNACZENIA

1-REAGENT jest gotowy do użycia.

Do wykonania próby zerowej należy używać wody dejonizowanej.

Wymagane działania:

W przypadku wykonywania oznaczeń z użyciem analizatora BS-400, może wystąpić, wpływający na wyniki oznaczeń, efekt przeniesienia pomiędzy odczynniki: CHOL – LIPASE II GEN, CHOL – LIPASE. W celu uniknięcia tego efektu należy stosować się do zaleceń zawartych w instrukcji: 51_03_24_002_BS-400_CARRYOVER.

WARTOŚCI PRAWDŁOWE

surowica / osocze	mg/dl	mmol/l
dzieci ⁹		
< 1 roku	66,1 – 228,5	1,71 – 5,91
1 – 19 lat	111,4 – 202,2	2,88 – 5,23
dorośli ^{9,10,11}	< 190	< 5,00

Zalecane jest opracowanie przez każde laboratorium własnych zakresów wartości prawidłowych charakterystycznych dla lokalnej populacji.

KONTROLA JAKOŚCI

W celu wewnętrznej kontroli jakości, do każdej serii oznaczeń należy dołączyć surowice kontrolne CORMAY LIPID CONTROL 1 (Nr kat. 5-179) i CORMAY LIPID CONTROL 2 (Nr kat. 5-180) lub CORMAY SERUM HN (Nr kat. 5-172) i CORMAY SERUM HP (Nr kat. 5-173).

Do kalibracji analizatora automatycznego BS-400 należy używać CORMAY MULTICALIBRATOR LEVEL 1 (Nr kat. 5-174; 5-176) i/ lub LEVEL 2 (Nr kat. 5-175; 5-177). Kalibrację należy wykonać z użyciem dwóch kalibratorów lub kalibratora oraz wody dejonizowanej.

Do kalibracji analizatora automatycznego BS-480 należy używać CORMAY MULTICALIBRATOR LEVEL 1 (Nr kat. 5-174; 5-176) i LEVEL 2 (Nr kat. 5-175; 5-177). Jako kalibratora 0 należy używać wody dejonizowanej. Krzywa kalibracyjna powinna być sporządzana co 11 tygodni, przy każdej zmianie serii odczynnika lub w razie potrzeby np. jeśli wartości oznaczenia surowic kontrolnych nie mieszczą się w wyznaczonym zakresie.

CHARAKTERYSTYKA OZNACZENIA

Podane niżej rezultaty uzyskano używając automatycznych analizatorów BS-400 i BS-480. W przypadku przeprowadzenia oznaczenia na innym analizatorze lub manualnie otrzymane wyniki mogą różnić się od podanych.

■ Czulość

20 mg/dl (0,518 mmol/l) – BS-400

12 mg/dl (0,311 mmol/l) – BS-480

■ Liniość

do 750 mg/dl (19,4 mmol/l) – BS-400

do 800 mg/dl (20,7 mmol/l) – BS-480

■ Specyficzność / Interferencje

Hemoglobina do 0,31 g/dl, kwas askorbinowy do 62 mg/l, bilirubina do 20 mg/dl i triglicerydy do 1000 mg/dl nie wpływają na wyniki oznaczenia.

■ Precyzja

Powtarzalność (run to run)		Średnia [mg/dl]	SD [mg/dl]	CV [%]
BS-400 (n = 20)	poziom 1	156,11	0,62	0,40
	poziom 2	293,39	1,88	0,64
BS-480 (n = 10)	poziom 1	93,45	0,31	0,33
	poziom 2	244,81	0,81	0,33
Odtwarzalność (day to day)		Średnia [mg/dl]	SD [mg/dl]	CV [%]
BS-400 (n = 14)	poziom 1	158,91	1,41	0,89
	poziom 2	298,05	2,24	0,75
BS-480 (n = 10)	poziom 1	92,55	0,67	0,72
	poziom 2	239,64	1,48	0,62

■ Porównanie metody

Porównanie wyników oznaczeń cholesterolu wykonanych na BS-400 (y) i na Olympus AU640 (x), z użyciem 40 próbek, dało następujące wyniki:

y = 0,9112 x + 8,1417 mg/dl;

R = 0,996

(R – współczynnik korelacji)

Porównanie wyników oznaczeń cholesterolu wykonanych na BS-480 (y) i na Cobas Integra 400 Plus (x), z użyciem 40 próbek, dało następujące wyniki:

y = 0,9826 x + 3,3927 mg/dl;

R = 0,993

(R – współczynnik korelacji)

UTYLIZACJA ODPADÓW

Postępować zgodnie z aktualnymi przepisami.

LITERATURA

- Siedel J., Hägele E.O., Zigenhorn J., Wahlefeld A.W.: Clin. Chem. 29, 6 (1983).
- Tel R.M., Berends G.T.: J Clin.Chem. Clin. Biochem. 18, 10 (1980).
- Rautela G.S., Liedtke R.J.: Clin. Chem. 24. 1 (1978)
- Schettler G., Nussel E.: Arbeitsmed. Sozialmed. Praventivmed. 10, 25 (1975).
- Richmond W.: Clin. Chem. 19, 1350 (1973).
- Roeschlau P., Bernt E., Gruber W.: J. Clin. Chem. Biochem. 12, 403 (1974).
- Tietz N.W., ed. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 130 (1995).
- Trinder P.: Ann. Clin. Biochem. 6, 24 (1969).
- Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B.: Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej, Wyd. IV, str. 670, 875 (2017).
- Cybulska B, Szostak WB, Filipiak KJ, et al. Polish Forum for Prevention Guidelines on Dyslipidaemia: update 2016. Kardiol Pol. 2017; 75(2): 187–190, doi: 10.5603/KP.2017.0031.
- Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). Eur Heart J. 2016; 37(29): 2315–2381, doi: 10.1093/eurheartj/ehw106, indexed in Pubmed: 27222591.
- NCEP Expert Panel. Arch Inter Med (148), 36-69, (1988).
- Jacobso D.S., DeMott W.R., Grady H.J., et. al., ed., Laboratory Tests Handbook, 4th ed., Hudson, Lexi-Comp, 143, (1996).

Data wydania: 06. 2023.

A-400 CHOL

Cat. No **7-404**

(EN)

Warning



H319 Causes serious eye irritation.
P280 Wear protective gloves, protective clothing, eye protection or face protection.
P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

SPECIMEN

Serum, EDTA or heparinized plasma (recommended: heparine lithium, sodium or ammonium salt) free from hemolysis. Blood should be collected only if the patient has been fasting for minimum of 12 hours. Before blood collection patient should stay in rest position for about 30 minutes. Venous blood is recommended for cholesterol measurement. Plasma cholesterol values have been reported to be 3% to 5% lower than serum cholesterol values. Serum should be separated from red blood cells as soon as possible after blood collection. Serum and plasma can be stored up to 3 days at 2-8°C or 6 months at -20°C. Nevertheless it is recommended to perform the assay with freshly collected samples!

PROCEDURE

I-REAGENT is ready to use.
For reagent blank deionized water is recommended.

Actions required:

When performing assays at analyser **BS-400**, there is a probability of **cross-contamination** affecting the tests results: CHOL – LIPASE II GEN, CHOL – LIPASE. To avoid this effect follow the recommendations contained in the instruction 51_03_24_002_BS-400_CARRYOVER.

REFERENCE VALUES

serum / plasma	mg/dl	mmol/l
children ⁹ < 1year	66.1 – 228.5	1.71 – 5.91
1 – 19 years	111.4 – 202.2	2.88 – 5.23
adults ^{9,10,11}	< 190	< 5.00

It is recommended for each laboratory to establish its own reference ranges for local population.

QUALITY CONTROL

For internal quality control it is recommended to use, with each batch of samples CORMAY LIPID CONTROL 1 (Cat. No 5-179) and CORMAY LIPID CONTROL 2 (Cat. No 5-180) or CORMAY SERUM HN (Cat. No 5-172) and CORMAY SERUM HP (Cat. No 5-173).

For the calibration of automatic analyzer system BS-400 the CORMAY MULTICALIBRATOR LEVEL 1 (Cat. No 5-174; 5-176) and/or LEVEL 2 (Cat. No 5-175; 5-177). **These two calibrators or calibrator and deionised water** should be used for calibration.

For the calibration of automatic analyzer system BS-480 the CORMAY MULTICALIBRATOR LEVEL 1 (Cat. No 5-174; 5-176) and LEVEL 2 (Cat. No 5-175; 5-177) is recommended. Deionised water should be used as a calibrator 0.

The calibration curve should be prepared every 11 weeks, with change of reagent lot number or as required e.g. quality control findings outside the specified range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The following results have been obtained using automatic analyzers BS-400 and BS-480. Results may vary if a different instrument or a manual procedure is used.

Sensitivity:

20 mg/dl (0.518 mmol/l) – BS-400
12 mg/dl (0.311 mmol/l) – BS-480

Linearity:

up to 750 mg/dl (19.4 mmol/l) – BS-400
up to 800 mg/dl (20.7 mmol/l) – BS-480

Specificity / Interferences

Haemoglobin up to 0.31 g/dl, ascorbate up to 62 mg/l, bilirubin up to 20 mg/dl and triglycerides up to 1000 mg/dl do not interfere with the test.

Precision

Repeatability (run to run)		Mean [mg/dl]	SD [mg/dl]	CV [%]
BS-400 (n = 20)	level 1	156.11	0.62	0.40
	level 2	293.39	1.88	0.64
BS-480 (n = 10)	level 1	93.45	0.31	0.33
	level 2	244.81	0.81	0.33
Reproducibility (day to day)		Mean [mg/dl]	SD [mg/dl]	CV [%]
BS-400 (n = 14)	level 1	158.91	1.41	0.89
	level 2	298.05	2.24	0.75
BS-480 (n = 10)	level 1	92.55	0.67	0.72
	level 2	239.64	1.48	0.62

Method comparison

A comparison between cholesterol values determined at **BS-400** (y) and at **Olympus AU640** (x) using 40 samples gave following results:

$y = 0.9112x + 8.1417$ mg/dl;
 $R = 0.996$ (R – correlation coefficient)

A comparison between cholesterol values determined at **BS-480** (y) and at **Cobas Integra 400 Plus** (x) using 40 samples gave following results:

$y = 0.9826x + 3.3927$ mg/dl;
 $R = 0.993$ (R – correlation coefficient)

WASTE MANAGEMENT

Please refer to local legal requirements.

LITERATURE

- Siedel J., Hägele E.O., Zigenhorn J., Wahlefeld A.W.: Clin. Chem. 29. 6 (1983).
- Tel R.M., Berends G.T.: J Clin.Chem. Clin. Biochem. 18. 10 (1980).
- Rautela G.S., Liedtke R.J.: Clin. Chem. 24. 1 (1978)
- Schettler G., Nussel E.: Arbeitsmed. Sozialmed. Präventivmed. 10. 25 (1975).
- Richmond W.: Clin. Chem. 19. 1350 (1973).
- Roeschlau P., Bernt E., Gruber W.: J. Clin. Chem. Biochem. 12. 403 (1974).
- Tietz N.W., ed. Clinical Guide to Laboratory Tests. 3rd ed. Philadelphia. PA: WB Saunders. 130 (1995).
- Trinder P.: Ann. Clin. Biochem. 6. 24 (1969).
- Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B.: Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej, Wyd. IV, str. 670, 875 (2017).
- Cybulska B, Szostak WB, Filipiak KJ, et al. Polish Forum for Prevention Guidelines on Dyslipidaemia: update 2016. Kardiol Pol. 2017; 75(2): 187–190, doi: 10.5603/KP.2017.0031.
- Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). Eur Heart J. 2016; 37(29): 2315–2381, doi: 10.1093/eurheartj/ehw106, indexed in Pubmed: 27222591.
- NCEP Expert Panel. Arch Inter Med (148). 36-69. (1988).
- Jacobso D.S., DeMott W.R., Grady H.J., et. al., ed.. Laboratory Tests Handbook. 4th ed.. Hudson. Lexi-Comp. 143. (1996).

Date of issue: 06. 2023.

A-400 CHOL

Кат.№ **7-404** (RUS)

ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Диагностический набор для определения концентрации холестерина, предназначен для использования на автоматических биохимических анализаторах: BS-400 и BS-480.

Реагенты должны использоваться только для диагностики in vitro, квалифицированным лабораторным персоналом, в целях, для которых они предназначены, в соответствующих лабораторных условиях.

ВВЕДЕНИЕ

Холестерин является важной составной частью клеточных мембран, прекурсором желчных кислот и всех стероидных гормонов. Поэтому холестерин очень важен для нормального функционирования организма. Существует также хорошо изученная зависимость между уровнем холестерина в крови и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Определение уровня холестерина в сыворотке крови важно в профилактике и мониторинговании сердечно-сосудистых заболеваний, для оценки функций печени, желчного пузыря и кишечника.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод колориметрический, энзиматический с эстеразой и оксидазой холестерина (CHOD/PAP).

эфиры холестерина + H₂O $\xrightarrow{\text{CHE}}$ холестерин + жирные кислоты

холестерин + O₂ $\xrightarrow{\text{CHO}}$ холест-4-ин-3-он + H₂O₂

2 H₂O₂ + 4-аминоантипирин + фенол $\xrightarrow{\text{POD}}$ хинонимин + 4 H₂O
(красная окраска)

Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации холестерина.

РЕАГЕНТЫ

Состав набора
1-REAGENT 4 x 40 мл

При температуре 2-8°C, реагент сохраняет стабильность в течение всего срока годности, указанного на упаковке. Стабильность на борту анализатора при 2-10°C составляет 11 недель.

Концентрации компонентов в реагенте

Буфер Гуда (pH 6,4)	< 120 ммоль/л
Фенол	< 6 ммоль/л
4-аминоантипирин (4-AA)	< 0,4 ммоль/л
Холинэстераза (CHE)	< 4 мккат/л
Холестериноксидаза (CHO)	< 5 мккат/л
Пероксидаза (POD)	> 24 мккат/л

консерванты, моющие средства, стабилизаторы

Предупреждения и примечания

- Предохранять от прямых солнечных лучей и загрязнения!
- Внимательно прочитайте паспорт безопасности химической продукции (MSDS), который содержит подробную информацию о правилах безопасного хранения и использования товара.
- 1-REAGENT соответствует критериям классификации согласно постановлению (ЕС) № 1272/2008.

Внимание



H319 Вызывает серьезное раздражение глаз.
P280 Пользоваться защитными перчатками, защитной одеждой, средствами защиты глаз или лица.

P305+P351+P338 При попадании в глаза: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

Сыворотка или плазма крови, взятой на гепарин либо EDTA (соли литиевая, натриевая или аммониевая) без следов гемолиза.

Перед отбором крови пациент должен голодать не менее 12 часов. Непосредственно перед пункцией, рекомендуется находится в расслабленном положении в течение 30 минут. Кровь необходимо брать из вены.

Эритроциты следует максимально быстро отделить от сыворотки.

Значения холестерина в плазме обычно на 3-5% ниже, чем в сыворотке.

Сыворотка и плазма могут храниться в течение 3 дней при температуре 2-8°C, либо 6 месяцев при -20°C.

Тем не менее, рекомендуется проводить определения на свежезвзятом биологическом материале!

ПРОЦЕДУРА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1-REAGENT готов к использованию.

В качестве бланк-реагента рекомендуется использовать деионизованную воду.

Необходимые действия:

При проведении анализов на анализаторе **BS-400** возможно искажение результатов анализов, вызванное **перекрестным загрязнением** между реагентами: CHOL – LIPASE II GEN, CHOL – LIPASE. Чтобы избежать этого эффекта, следуйте рекомендациям, содержащимся в инструкции 51_03_24_002_BS-400_CARRYOVER.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ

сыворотка / плазма	мг/дл	ммоль/л	
дети ⁹	< 1 год	66,1 – 228,5	1,71 – 5,91
	1 – 19 лет	111,4 – 202,2	2,88 – 5,23
взрослые ^{9,10,11}	< 190	< 5,0	< 5,0

Каждой лаборатории рекомендуется разработать свои собственные нормы, характерные для обследуемого контингента.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для внутреннего контроля качества рекомендуется использовать CORMAY LIPID CONTROL 1 (Кат. № 5-179) и CORMAY LIPID CONTROL 2 (Кат. № 5-180) или CORMAY SERUM HN (Кат. № 5-172) и CORMAY SERUM HP (Кат. № 5-173) для каждой серии измерений.

Для калибровки автоматического анализатора **BS-400** рекомендуется использовать CORMAY

MULTICALIBRATOR LEVEL 1 (Кат.№ 5-174, 5-176) и/или LEVEL 2 (Кат.№ 5-175, 5-177). Калибрацию следует производить с использованием **двух уровней калибратора** либо **калибратора и деионизованной воды**.

Для калибровки автоматического анализатора **BS-480** рекомендуется использовать CORMAY MULTICALIBRATOR LEVEL 1 (Кат.№ 5-174, 5-176) и LEVEL 2 (Кат.№ 5-175, 5-177). В качестве 0-калибратора рекомендуется использовать деионизованную воду

Калибровочную кривую следует составлять каждые 11 недель, при каждой смене лота реагента или в случае необходимости, напр., если результаты контроля качества не попадают в референтный диапазон.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Эти метрологические характеристики были получены при использовании автоматических анализаторов BS-400 и BS-480. Результаты, полученные на других анализаторах и вручную, могут отличаться.

Чувствительность

20 мг/дл (0,518 ммоль/л) – BS-400
12 мг/дл (0,311 ммоль/л) – BS-480

Линейность

до 750 мг/дл (19,4 ммоль/л) – BS-400
до 800 мг/дл (20,7 ммоль/л) – BS-480

Специфичность / Интерференции

Гемоглобин до 0,31 г/дл, аскорбат до 62 мг/л, билирубин до 20 мг/дл и триглицериды до 1000 мг/дл не влияют на результаты определений.

Точность

Повторяемость (между сериями)		Среднее [мг/дл]	SD [мг/дл]	CV [%]
BS-400 (n = 20)	уровень 1	156,11	0,62	0,40
	уровень 2	293,39	1,88	0,64
BS-480 (n = 10)	уровень 1	93,45	0,31	0,33
	уровень 2	244,81	0,81	0,33
Воспроизводимость (изо дня в день)		Среднее [мг/дл]	SD [мг/дл]	CV [%]
BS-400 (n = 14)	уровень 1	158,91	1,41	0,89
	уровень 2	298,05	2,24	0,75
BS-480 (n = 10)	уровень 1	92,55	0,67	0,72
	уровень 2	239,64	1,48	0,62

Сравнение метода

Сравнение результатов определения холестерина полученных на анализаторе **BS-400** (y) и на **Olympus AU640** (x) с использованием 40 образцов дало следующие результаты:

y = 0,9112 x + 8,1417 мг/дл;

R = 0,996 (R – коэффициент корреляции)

Сравнение результатов определения холестерина полученных на анализаторе **BS-480** (y) и на **Cobas Integra 400 Plus** (x) с использованием 40 образцов дало следующие результаты:

y = 0,9826 x + 3,3927 мг/дл;

R = 0,993 (R – коэффициент корреляции)

УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

В соответствии с локальными требованиями.

ЛИТЕРАТУРА

- Siedel J., Hägele E.O., Zigenhorn J., Wahlefeld A.W.: Clin. Chem. 29, 6 (1983).
- Tel R.M., Berends G.T.: J Clin.Chem. Clin. Biochem. 18, 10 (1980).
- Rautela G.S., Liedtke R.J.: Clin. Chem. 24, 1 (1978)
- Schettler G., Nussel E.: Arbeitsmed. Sozialmed. Praventivmed. 10, 25 (1975).
- Richmond W.: Clin. Chem. 19, 1350 (1973).
- Roeschlaup P., Bernt E., Gruber W.: J. Clin. Chem. Biochem. 12, 403 (1974).
- Tietz N.W., ed. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 130 (1995).
- Trinder P.: Ann. Clin. Biochem. 6, 24 (1969).
- Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B.: Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Wyd. IV, str. 670, 875 (2017).
- Cybulska B, Szostak WB, Filipiak KJ, et al. Polish Forum for Prevention Guidelines on Dyslipidaemia: update 2016. Kardiol Pol. 2017; 75(2): 187–190, doi: 10.5603/KP.2017.0031.
- Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). Eur Heart J. 2016; 37(29): 2315–2381, doi: 10.1093/eurheartj/ehw106, indexed in Pubmed: 27222591.
- NCEP Expert Panel. Arch Inter Med (148), 36-69, (1988).
- Jacobso D.S., DeMott W.R., Grady H.J., et. al., ed., Laboratory Tests Handbook, 4th ed., Hudson, Lexi-Comp, 143, (1996).

Дата создания: 06. 2023.

A-400 CHOL

PROGRAM NA ANALIZATORY / APPLICATION for / АДАПТАЦИЯ для:

BS-400

Basic

Test information		Reagent Volume		Sample Volume	
No.	2	R1	200	Standard	2.5 15 10
Test	CHOL	R2		Increased	5 15 10
Full Name	CHOLESTEROL	R3		Decreased	
Std. No.	2	R4			
Reaction Parameters		Result Setup			
Reac. Type	Endpoint	Direction	Increase	Decimal	1 Slope 1
Pri. Wave	505	Rtg. Blank	11 12	Unit	mg/dl Inter 0
Sec. Wave	800	Reac. Time	43 45		
Judgment Criteria					
Absorbance	0 0	Lin. Range	20 750	Prozone	Rate
Incr. Test	0	Lin. Limit		Q1 0 Q2 0 Q3 0 Q4 0	Antigen
Decr. Test	0	Subs. Limit		PC 0 ABS 0	

Calibration

Calibration	Judgment Criteria		
Rule	Two-point Linear	Sensitivity	
Replicate	3	Factor Diff.	
K		SD	
QC		Blank Abs.	
Rules		Error Limit	
Westgard Multi-rule		Corr. Coeff.	
v 1-2S	v R-4S	Cum. Sum Check	1.0 - 2.7
v 1-3S	v 4-1S		1.0 - 3.0
v 2-2S	v 10-X		0.5 - 5.1
		Auto QC	Interval

BS-480

Chem	CHOL	No.	002	Sample Type	SERUM
Chemistry	CHOLESTEROL			Print name	CHOL
Reaction Type	Endpoint	Reaction Direction	Increase		
Pri Wave	505	Sec Wave	800		
Unit	mg/dL	Decimal	1		
Blank Time	11 12	Reaction Time	44 46		
Standard	Sample Vol 2.5 μL Aspirated 20 μL Diluent 180 μL	Reagent Vol	200 μL	Diluent	
Decreased	2.5 μL 20 μL 180 μL	R1			
Increased		R2			
		R3			
		R4			
Linearity Range	12 800	Linearity Limit			
Linearity Range (Decreased)		Substrate Depletion			
Linearity Range (Increased)		Mixed Blank Abs	-33000 33000		
R1 Blank Abs	-33000 33000	Uncapping Time	77 Dav(s)		
Blank Response	-33000 33000	Reagent Alarm Limit			
Twin Chemistry		Enzyme Linear Extension			
	Prozone Check o Rate Check	Antigen Addition			
Q1 0 Q2 0 Q3 0 Q4 0					
PC 0 ABS 0					

Calibration Settings

Math Model	Multi-point Linear	Bottle Changed	
Factor		Lot Changed	
Replicates	3	Cal Time	

Acceptance Limits

Cal Time	1848 Hour	SD	
Slope Diff		Repeatability	
Sensitivity			
Deter Coeff			