

ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА-ВИТАЛ-02

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ УНИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДОМ

Кат. № В 09.02 - 200 определений
(при объеме пробы 5,55 мл)

ПРИНЦИП МЕТОДА

п-нитрофенилфосфат + вода → п-нитрофенол + фосфат
Количество образовавшегося в единицу времени п-нитрофенола, пропорциональное активности фермента, определяется по оптической плотности образца.

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ (ОБРАЗЕЦ)

Сыворотка или плазма крови (без цитрата, оксалата, фторида, ЭДТА).

СОСТАВ НАБОРА

РЕАГЕНТ № 1 - БУФЕР, pH 10,4

Глицин.....55 ммоль/л
Mg/Zn

РЕАГЕНТ № 2 – НАТРИЙ ЕДКИЙ

NaOH.....200 ммоль/л

РЕАГЕНТ № 3 - П-НИТРОФЕНИЛФОСФАТ

п-нитрофенилфосфат.....27,6 ммоль/л

РЕАГЕНТ № 4 - КАЛИБРАТОР

п-нитрофенол.....50 мкмоль/л

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Линейность - отклонение не более 10 %
до активности 2500 нмоль/(схл)

Чувствительность - не менее 100 нмоль/(схл)

Коэффициент вариации – не более 10 %

Время проведения анализа – 30 мин

ХРАНЕНИЕ

- Срок годности набора – 12 мес
(хранение при 2-4°C в темноте).

ВНИМАНИЕ! Тщательно закрывайте флаконы непосредственно после каждого использования реагентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РЕАГЕНТОВ

РАБОЧИЙ РЕАГЕНТ № 1.

Смешать необходимые количества реагента № 1 и реагента № 3 в соотношении 4+1.

Рабочий реагент стабилен 10 дней при температуре хранения 2-4°C или 3 месяца при -20°C. Хранить в плотно закрытой посуде в темноте.

РАБОЧИЙ РЕАГЕНТ № 2.

Содержимое флакона № 2 (или аликвоту) развести бидистиллированной водой в 10 раз (например, 1 мл реагента № 2 + 9 мл бидистиллированной воды).

Концентрация полученного рабочего реагента – 0,02 моль/л.

Срок хранения – 3 мес в плотно закрытой полиэтиленовой таре при 18-25°C.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Длина волны: 405 нм (ФЭК 400-410 нм).

Длина оптического пути: 1 см.

Температура инкубации : 37°C

Внести в пробирки:

	Опытная проба	Холодная проба
Рабочий реагент № 1	0,5 мл	0,5 мл
Образец	0,05 мл	-

Инкубировать точно 30 мин при 37°C (желательно на водяной бане). Затем пробы охладить.

Добавить в пробирки:

	Опытная проба	Холодная проба
Рабочий реагент № 2	5 мл	5 мл
Образец	-	0,05 мл

Пробы перемешать и фотометрировать против холодной пробы.

Стабильность окраски – не менее 8 часов.

Расчет активности щелочной фосфатазы в сыворотке и плазме крови производят по калибровочному графику.

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОГО ГРАФИКА

	1	2	3
Проба 1	0,5	5,05	278
Проба 2	1,0	4,55	556
Проба 3	1,5	4,05	834
Проба 4	2,5	3,05	1390
Проба 5	3,5	2,05	1946

- Реагент № 4 (калибратор), мл
- Рабочий реагент № 2, мл
- Активность щелочной фосфатазы, нмоль/(схл)

Пробы №№ 1-5 перемешать и фотометрировать против рабочего реагента № 2.

Построить калибровочный график зависимости адсорбций от активности фермента.

НОРМАЛЬНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ

278-830 нмоль/(схл)

1U/л = 16,67 нмоль/(схл).

ПРИМЕЧАНИЕ

- При построении калибровочного графика количества рабочего реагента № 2 и реагента № 4 могут быть пропорционально уменьшены.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Правильность проверена при помощи контрольных сывороток "Sigma enzyme control 2N" & "Sigma enzyme control 2E" (Sigma chemical company, USA).