

## Набор реагентов для определения активности $\alpha$ 2-антиплазмина оптическим методом.

$\alpha$ 2-антиплазмин – это ингибитор фибринолиза, очень быстро связывающий плазмин и необратимо ингибирующий его. Это одноцепочечный гликопротеин, имеющий молекулярную массу 60 – 70 кД и мигрирующий при электрофорезе как  $\alpha$ 2-глобулин. Врожденный дефицит  $\alpha$ 2-антиплазмина ассоциирован с геморрагическими состояниями. Снижение уровня  $\alpha$ 2-антиплазмина наблюдается при болезнях печени и ДВС-синдроме. Увеличенный уровень  $\alpha$ 2-антиплазмина часто наблюдается в постоперационный период.

### Принцип метода.

Метод определения активности  $\alpha$ 2-антиплазмина основан на его способности нейтрализовать плазмин. Активность  $\alpha$ 2-антиплазмина в плазме определяют, добавляя к ней избыток плазмина. При этом происходит ингибирование плазмина пропорционально количеству  $\alpha$ 2-антиплазмина в плазме. Оставшееся количество плазмина катализирует отщепление паранитроанилина (pNA) от синтетического хромогенного субстрата. Абсорбция свободного pNA, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна активности  $\alpha$ 2-антиплазмина в плазме. Процесс идет по следующей схеме:

$\alpha$ 2-антиплазмин (плазма) + плазмин (избыток)  $\Rightarrow$   
( $\alpha$ 2-антиплазмин – плазмин) + плазмин (остаток).

Субстрат-pNA + плазмин (остаток)  $\Rightarrow$  Пептид + pNA.

### Состав набора

Буфер (5 мл) – 3фл.

Плазмин, лиофильно высушенный (1 мл) – 2 фл.

Плазма-калибратор, лиофильно высушенная (1 мл) – 1 фл.

Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный (2мл) – 2фл

### Приготовление реагентов:

1. **Буферный раствор.** Готов для использования. Буферный раствор должен иметь pH=7,5 $\pm$ 0,05.

2. **Плазмин.** Во флакон с лиофильно высушенным плазмином внести 5 мл буферного раствора и растворить содержимое осторожным покачиванием, не встряхивать! Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения

3. **Раствор хромогенного субстрата.** Во флакон с хромогенным субстратом внести 2 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

4. **Раствор плазмы-калибратора.** Во флакон с плазмой-калибратором внести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

### Стабильность реагентов.

Реагенты	+2-8 <sup>o</sup> C	+18-22 <sup>o</sup> C	-18-20 <sup>o</sup> C
Плазмин	5 дней	1 день	2 мес.
Раствор хромогенного субстрата	14 дней	2 дня	2 мес.
Раствор плазмы – калибратора	8 часов	4 часа	2 мес.

### Дополнительные реагенты.

1. Цитрат натрия 0.11М (3.8%) раствор.
2. Уксусная кислота 20%-ая.

### Получение исследуемой плазмы для анализа.

Венозную кровь взять в пластиковую или стеклянную силиконизированную пробирку на 3,8% (0.11моль/л) цитрате натрия (9:1), центрифугировать 7 мин при 1000 об/мин (240g), плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин (1200g). Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в пластиковую пробирку. Для анализов достаточно 0,2 мл бедной тромбоцитами плазмы. Хранение при комнатной температуре - не более 2 часов, при 2 - 8<sup>o</sup>C не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20<sup>o</sup>C.

### Построение и использование калибровочного графика.

Для проведения анализа необходимо использовать пластиковые пробирки. Приготовить серию разведений плазмы-калибратора в следующей последовательности:

Пробирка №	1	2	3
Активность антиплазмина в %	1.0A*	0.5A	0.25A
Буферный раствор, мл	0.4	0.2	0.2
Плазма-калибратор, мл	0.2	-	-
Перемешать и перенести в пробирку, мл	0.2 ↑		0.2 ↑

\*А - активность антиплазмина в плазме-калибраторе, указана в паспорте на набор.

Для построения калибровочного графика используют плазму-калибратор с известной активностью антиплазмина (А). На оси Y отложить величины оптической плотности, полученных для каждого разведения плазмы-калибратора, а на оси X по линейной шкале отложить активность антиплазмина в %. Калибровочный график линейен в интервале активности антиплазмина от 25 до 100%. Используя калибровочный график и значение оптической плотности исследуемого образца определить активность антиплазмина.

### Проведение анализа.

Непосредственно перед проведением анализа развести исследуемую плазму рабочим буферным раствором в 3 раза по следующей схеме: 0.1мл плазмы + 0.2мл буфера.

Анализ проводится в пластиковых кюветках, термостатируемых при 37<sup>o</sup>C.

Внести в кювету:	Образец	Кювета сравнения
Плазмин	500 мкл	-
Исследуемая разведенная плазма (или плазма-калибратор)	100 мкл	-
Буферный раствор	-	600 мкл
Перемешать и инкубировать при 37 <sup>o</sup> C точно 3 мин.	-	-
Раствор хромогенного субстрата	100 мкл	-
Перемешать и инкубировать при 37 <sup>o</sup> C точно 2 мин.	-	-
Уксусная к-та 20%-ая	1000 мкл	-

Измерить оптическую плотность образца против кюветы сравнения на спектрофотометре (ФЭКе) при длине волны 405 нм.

### Интерпретация результатов.

Образцы с высоким уровнем активности антиплазмина могут выйти за пределы линейности, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности антиплазмина для таких образцов могут быть получены при разведении исходной плазмы в 6 раза. При этом результат, считанный из калибровочного графика, должен быть умножен на 2.

Завышенные результаты могут быть получены при анализе образцов плазм больных:

- с повышенным содержанием липидов;
- с повышенным содержанием билирубина.

**В нормальной плазме здоровых лиц активность антиплазмина составляет 80 - 120%.**

### Меры предосторожности.

Все компоненты данного набора предназначены только для диагностики in vitro. Компоненты набора следует рассматривать, как потенциально биологически опасные вещества, при работе с которыми необходимо соблюдать все меры предосторожности.

При работе с исследуемыми образцами следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать вирусы иммунодефицита ВИЧ1 и ВИЧ2, гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 4, стр. 2.

тел/факс (499)707-76-30, (495) 225-12-61,

e-mail: [info@renam.ru](mailto:info@renam.ru)



