

Учебная исследовательская
работа
на тему:

Разделение белков методом
электрофореза

Выполнила: Зырянова Татьяна Владиславовна
ОМП-306

Проверила: Петухова Мария Анатольевна

- Название набора - CORMAY GEL PROTEIN 100
- Состав набора -100 разделений



Введение

Набор CORMAY GEL PROTEIN 100 предназначен для

- электрофоретического разделения белков сыворотки на агарозе.

Это позволяет получить шесть фракций сывороточного белка:

- альбумин,
- альфа-1 глобулины,
- альфа-2 глобулины,
- бета-1 глобулины,
- бета-2 глобулины,
- гамма глобулины.

Альбумин



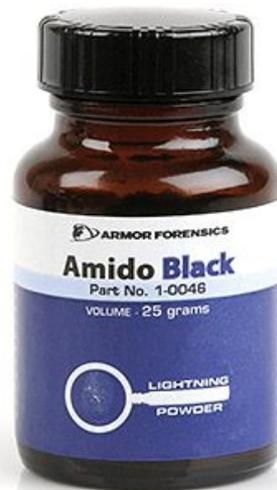
CORMAY GEL PROTEIN 100

- Агарозный гель (пластины с агарозой)
- Буфер Трис-Барбитал (концентрированный)
- Красящий раствор AMIDO чёрный (концентрированный)
- Обесцвечивающий раствор (концентрированный)
- Промокательная бумага
- Шаблон для внесения образца



Подготовка реагентов

- Буфер: 1 флакон концентрированного буфера (Трис-Барбитал) необходимо разбавить до 1000 мл дистиллированной водой.
- Красящий раствор: 1 флакон концентрированного раствора (AMIDO черный) необходимо разбавить до 300 мл дистиллированной водой.
- Обесцвечивающий раствор: 1 флакон концентрированного обесцвечивающего раствора необходимо разбавить до 10 литров дистиллированной водой (или 10 мл до 1000 мл).



- Фиксирующий раствор:
Смешать 135 мл этанола 96 %
30 мл ледяной уксусной кислоты
135 мл дистиллированной воды
135 мл этанола 96 %
37.5 мл уксусной кислоты 80 %
127.5 мл дистиллированной воды
Фиксирующий раствор должен быть подготовлен в течение 15 мин. перед использованием.
Агарозные гели: готовы к использованию



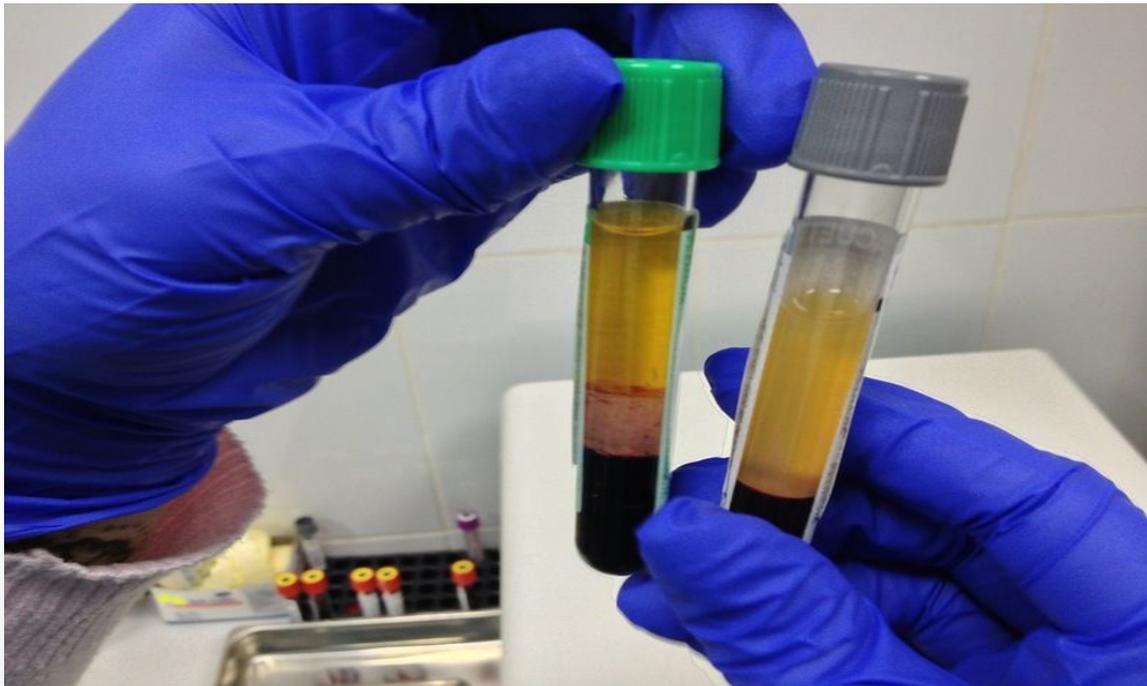
ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Источник питания и камера для электрофореза производства фирмы Cormay или система для электрофореза фирмы Beckman;
- Ледяная уксусная кислота, 96% этанол для приготовления фиксирующего раствора;
- Общее лабораторное оборудование



БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

- Сыворотка крови, разбавленная рабочим раствором буфера в соотношении: 1 часть сыворотки + 6 частей буфера. Не разбавленную сыворотку можно хранить при температуре 2-8 °С до 3 дней. Сыворотку необходимо развести непосредственно перед использованием.



ПРОВЕДЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

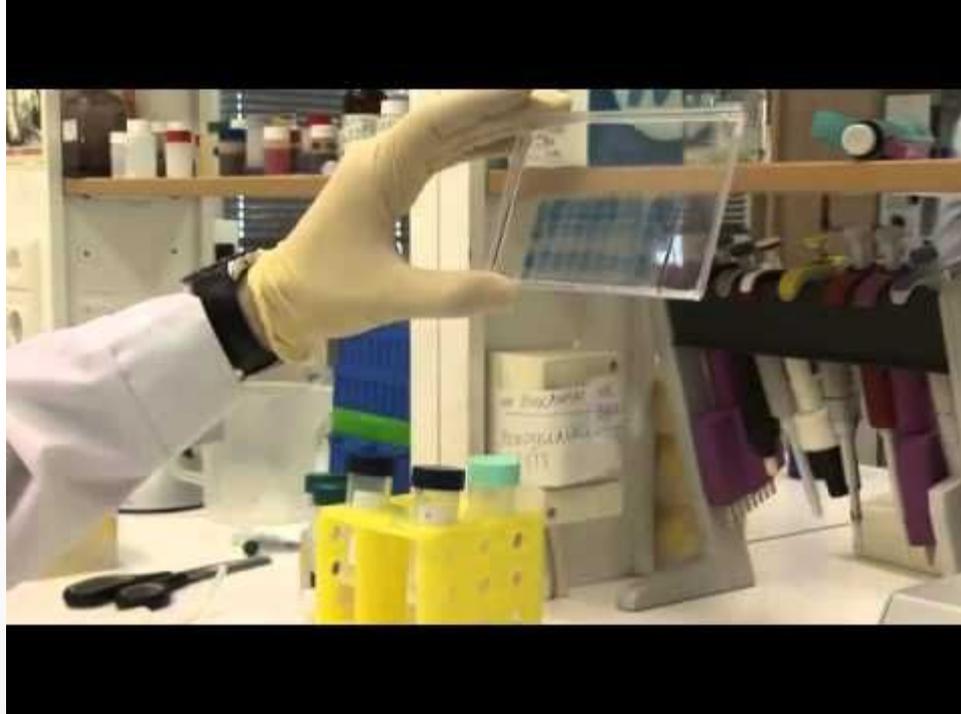
1. Влить по 150 мл (Cormay CU-1, Cormay S20) или по 45 мл (Beckman) разбавленного буфера в каждую часть камеры.
2. Осторожно вынуть гель из пакета, не касаясь его поверхности, и поместить его на листе бумаги или пресс-папье.
 - Во избежание высыхания геля и связанных с этим аналитических проблем рекомендуется вскрывать упаковку из фольги непосредственно перед употреблением, когда все оборудование готово к использованию и сыворотки разбавлены соответствующим образом.
3. Осушить место нанесения проб путем быстрого приложения бумажной полоски. Влажную бумагу тут же осторожно удалить.
4. На осушенном месте расположить фольгу для нанесения проб (размещая две ее крайние щели к соответствующим двум отметкам на пластинке), легко прижимая её к основанию и разглаживая пальцем. Фольга должна плотно прилегать к гелю!
5. Отпипетировать 5 мкл разбавленной сыворотки в каждый вырез фольги и оставить на 5 мин, считая с момента нанесения последней пробы
6. Удалить избыток сыворотки полоской бумаги.
7. Осторожно снять фольгу

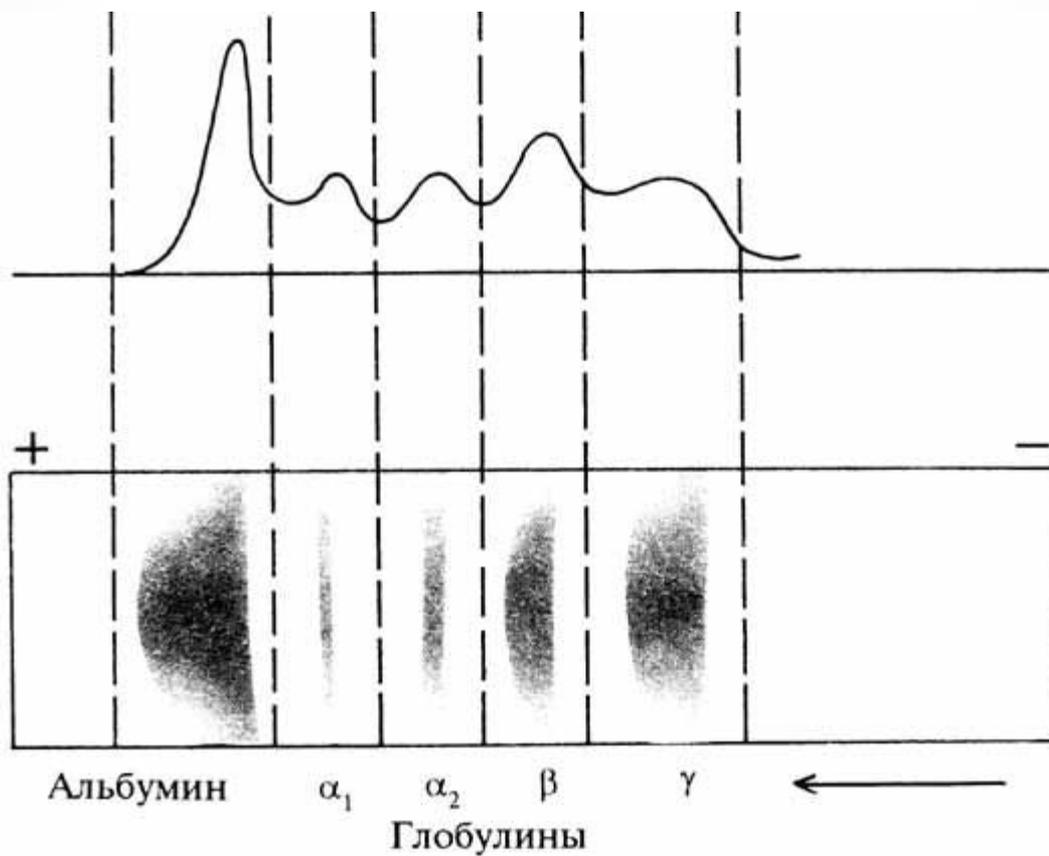


8. Согнуть пластинку с агарозой и поместить её в камеру гелем вниз, чтобы места нанесения сывороток находились от стороны катода.
9. Закрыть камеру крышкой.
10. Проводить электрофорез в течение 20 мин. при напряжении 100 В (Cormay CU-1, Cormay S20) или в течение 15 мин. При напряжении 100 В (Beckman).
11. После окончания электрофореза вынуть пластинку и погрузить её в раствор фиксатора на 15 мин. в вертикальном положении.
12. Сушить пластинку в сушилке при температуре до 80 °С или в струе жаркого воздуха.
13. Погрузить пластинку в краситель на 10 минут, затем обесцвечивать её в 2 - 3 последовательных ваннах обесцвечивающим раствором.
14. Обесцвеченную пластинку полоскать дистиллированной водой и высушить в сушилке или с помощью горячего воздуха при температуре до 80 °С.
15. Интерпретация может быть сделано визуально или с помощью денситометра.
16. При необходимости очистите обратную сторону пластины с мокрой бумагой.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- CORMAY GEL PROTEIN 100 позволяет отчетливо разделить белки сыворотки крови на 6 фракций. Благодаря высокой разрешающей способности пластинок CORMAY GEL PROTEIN 100 можно выявить присутствие моноклональных белков, главным образом в зоне гамма, а также бета. Для подтверждения присутствия моноклональных белков и их идентификации следует применять метод иммунофиксации.

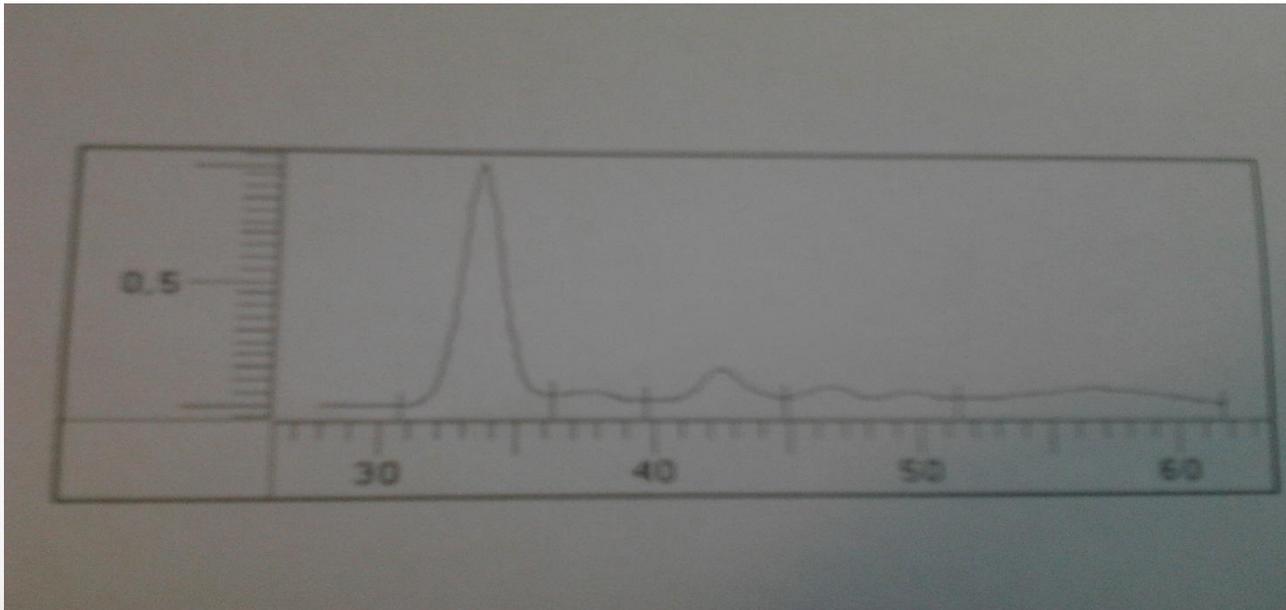




Оценка результатов исследования

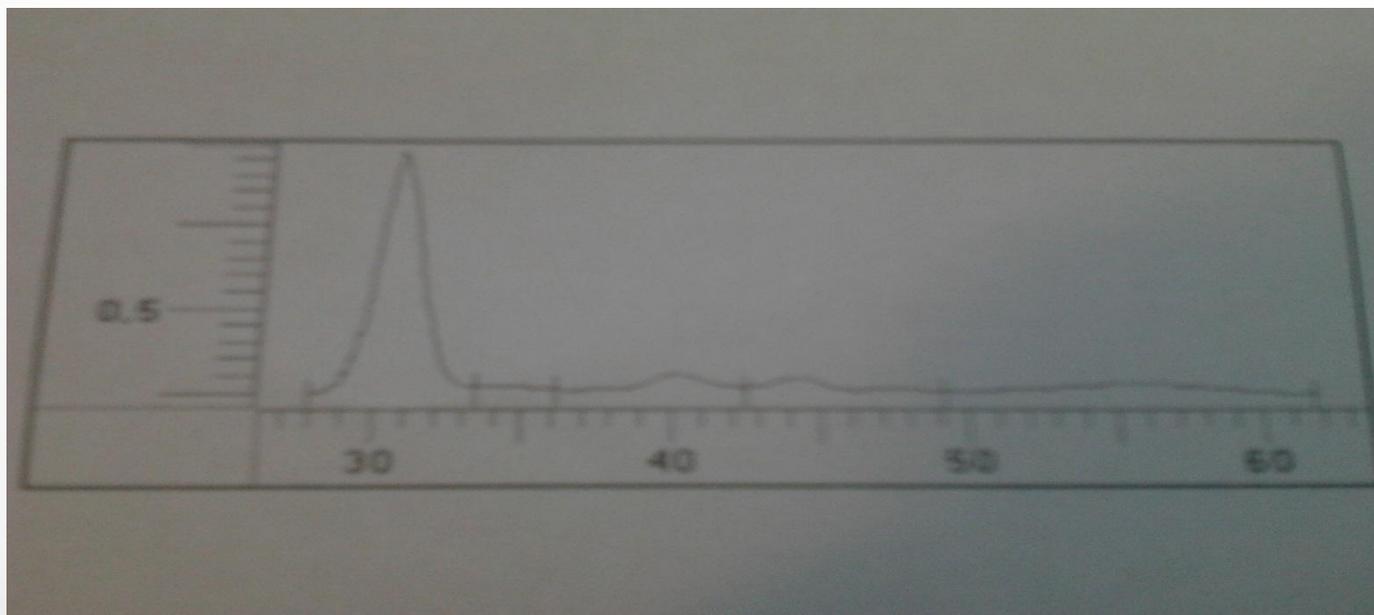
- Информация о пациенте: Миронов Д.
- Год рождения: 17.07.2012
- Общий белок 72 г/л
- Альбумины 58.64 % (Норма 54.00-66.00)
- **Альфа-1-глобулины 4.47%** (Норма 2.00-4.00)
- Альфа-2-глобулины 11.26% (Норма 6.00-12.00)
- Бета-глобулины 10.20% (Норма 8.00-14.00)
- Гамма-глобулины 15.43% (Норма 13.00-22.00)

Денситограмма белков сыворотки:



- У пациента повышен процентный состав альфа-1-глобулинов: 4.47%.
- Повышенные альфа-1-глобулины наблюдаются при острых воспалительных процессах, патологии печени, диффузных заболеваниях соединительной ткани (ревматизм, ревматоидный артрит и др.), опухолях, после хирургической операции. Также альфа-1-глобулины повышены при травмах и в третьем триместре беременности.
- В данном случае у пациента диагноз: Хронический гепатит В

- Информация о пациенте: Метальникова А.
- Год рождения: 15.03.2013
- Общий белок 68 г/л
- **Альбумины 68.82%**(Норма 54.00-66.00)
- Альфа-1-глобулины 2.75%(Норма 2.00-4.00)
- Альфа-2-глобулины 9.24%(Норма 6.00-12.00)
- Бета-глобулины 8.09%(Норма 8.00-14.00)
- **Гамма-глобулины 11.10%**(Норма 13.00-22.00)



- У пациента повышен процентный состав альбуминов: 68.82% и снижен процентный состав гамма-глобулинов: 11.10%.
- Чаще всего повышенное содержание альбумина свидетельствует об обезвоживании организма при чрезмерной потере жидкости. В свою очередь пониженное содержание показателя является признаком следующих заболеваний: хронические заболевания печени, такие как цирроз, гепатит или опухоли; ревматизм; наличие сепсиса, нагноенного процесса или же инфекционного заболевания; после сильной травмы или ожога; при наличии злокачественной опухоли; сердечная недостаточность; передозировка лекарственными препаратами.
- Гипогаммаглобулинемии развиваются на фоне заболеваний, которые истощают иммунную систему. Снижается гамма-глобулин в следующих случаях:
 - при нефротическом синдроме (нефрозе);
 - при нарушении синтеза иммуноглобулинов;
 - при проведении терапии цитостатическими препаратами;
 - при продолжительных болезнях инфекционного характера;
 - у детей после удаления селезенки;
 - в результате воздействия радиации.
- В данном случае у пациента диагноз: Хронический гепатит С