



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ
ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΕΑΒΑΑ-30, έκδοση 1η

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης σε πλάσμα ή ορό με εργαστηριακή μέθοδο

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Οι πρωτεΐνες αποτελούν μακρομόρια ευρέως διαδεδομένα στους ζωντανούς οργανισμούς, όπου χρησιμεύουν ως δομικά συστατικά των κυττάρων και ως ρυθμιστές όλων σχεδόν των βιολογικών λειτουργιών. Ο προσδιορισμός τους στο πλάσμα ή στον ορό είναι χρήσιμος για την αξιολόγηση της διατροφικής κατάστασης και για την διάγνωση ασθενειών που σχετίζονται με διαταραχές του μεταβολισμού τους.

Η μέτρηση ολικής πρωτεΐνης στο πλάσμα ή στον ορό στηρίζεται στην αντίδραση του αζώτου των πεπτιδικών δεσμών των πρωτεϊνών με Cu^{2+} σε αλκαλικό περιβάλλον, αντίδραση που παράγει σύμπλοκο με έντονο ιώδες χρώμα. Η ένταση του χρώματος και συγκεκριμένα η απορρόφηση του διαλύματος στα 540 nm είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΑ ΠΡΟΣΩΠΑ

Αναλυτής/-ρια

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

A/α	Είδος	Λεπτομέρειες
1	Πιπέτα	Των 10-100 μL
2	Πιπέτα	Των 100-1000 μL
3	Φασματοφωτόμετρο	Unico 4802 UV/VIS Double Beam
4	Κυκλομείκτης	Vortex-Genie 2
5	Γυάλινες κυψελίδες	Semi-micro
6	Στατώ για φιαλίδια erpendorf	
7	Στατώ για σωληνάρια RIA	
8	Γενικά εργαστηριακά σκεύη	Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας
9	Φόρμες καταγραφής αποτελεσμάτων	Ντοσιέ, τετράδιο κλπ.

ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

A/α	Είδος	Λεπτομέρειες
1	Αποσταγμένο νερό	
2	Σωληνάρια RIA	Των 3 mL
3	Φιαλίδια erpendorf	Του 1,5 mL
4	Ρύγχη πιπέτας	Κίτρινα, των 10-200 μL
5	Ρύγχη πιπέτας	Μπλε, των 100-1000 μL
6	Γάντια	Εξεταστικά, μιας χρήσης (μέγεθος ανάλογα με τον/την χειριστή/-ρια)
7	Κιτ ολικής πρωτεΐνης	Sprinreact. Αποθήκευση στο ψυγείο (4 °C).
8	Δοχείο απόρριψης βιολογικών υλικών	

ΒΗΜΑΤΑ

Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται από τον/την αναλυτή/-ρια.

A/α	Τίτλος	Ενέργειες
1	Προετοιμασία εξοπλισμού	Οργανώνει τον χώρο εργασίας και τοποθετεί αριθμημένα σωληνάρια RIA (δύο για κάθε δείγμα, δύο για το πρότυπο κι ένα για το τυφλό) σε στατώ.
2	Προετοιμασία ανάλυσης	Βγάζει τα δείγματα πλάσματος ή ορού από τον καταψύκτη και το κιτ από το ψυγείο και τα αφήνει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
3	Προετοιμασία φασματοφωτόμετρου	Ενεργοποιεί το φασματοφωτόμετρο πατώντας το κουπί ON, που βρίσκεται πίσω κάτω δεξιά. Αφήνει το όργανο να προθερμανθεί και, στο άκουσμα του ήχου ειδοποίησης, πατάει Yes για βαθμονόμηση.
3	Παρασκευή τυφλού διαλύματος	Τοποθετεί σε μια κυψελίδα 1 mL από το διάλυμα R (το αντιδραστήριο που βρίσκεται μέσα στο κιτ).
4	Παρασκευή πρότυπων δειγμάτων	Τοποθετεί σε καθένα από 2 σωληνάρια RIA 1 mL R και 25 μL διαλύματος T PROTEIN (συγκέντρωσης 7 g/dL) με διαφορετικά ρύγχη και πολλαπλές αναρροφήσεις μέσα στο διάλυμα.
5	Παρασκευή βιολογικών δειγμάτων	Για κάθε δείγμα προς ανάλυση τοποθετεί σε καθένα από 2 σωληνάρια RIA 1 mL R και 25 μL δείγματος με τον ίδιο όπως παραπάνω τρόπο.
6	Ανάδευση	Αναδεύει όλα τα σωληνάρια RIA στον κυκλομεικτη.
7	Ολοκλήρωση αντίδρασης	Αφήνει τα σωληνάρια σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση.
8	Ρύθμιση παραμέτρων φασματοφωτόμετρου	Στο φασματοφωτόμετρο επιλέγει 1 (Basic mode) και enter, στη συνέχεια set λ 540 nm και enter.
9	Τοποθέτηση δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο	Με τη χρήση πιπέτας 100-1000 μL, μεταφέρει το τυφλό σε μια κυψελίδα, την οποία και τοποθετεί στη θέση αναφοράς. Στη συνέχεια μεταφέρει ομοίως τα πρότυπα και τα δείγματα σε κυψελίδες, τις οποίες τοποθετεί κατά σειρά στο καρουζέλ. Κλείνει καλά το καπάκι του διαμερίσματος δειγμάτων.
10	Ορισμός συντελεστή μετατροπής της απορρόφησης σε συγκέντρωση	Μετρά την απορρόφηση των δύο προτύπων και υπολογίζει την μέση τιμή τους. Διαιρεί το 7 (συγκέντρωση προτύπου) με τη μέση τιμή απορρόφησης και ορίζει το πηλίκο ως factor, πιέζοντας το F3. Τέλος, πιέζει F2.
11	Μέτρηση βιολογικών δειγμάτων	Πιέζοντας τα πλήκτρα CELL, [αριθμός], enter, φέρνει διαδοχικά τα βιολογικά δείγματα στη θέση ανάγνωσης και σημειώνει τη συγκέντρωσή τους. Αν τα δείγματα είναι πολλά, αδειάζει τις κυψελίδες σε δοχείο απόρριψης βιολογικών υλικών και τις γεμίζει με νέα δείγματα.
12	Συμμάζεμα	Μετά το τέλος της μέτρησης όλων των δειγμάτων, απορρίπτει όσα υλικά δεν χρειάζονται ή ήταν μιας χρήσης, πλένει τα σκεύη που χρησιμοποίησε και αποθηκεύει τα δείγματα πλάσματος ή ορού στον καταψύκτη και το κιτ στο ψυγείο. Τέλος, τοποθετεί στη θέση του ό,τι μεταχειρίστηκε.

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

A/α	Πρόβλημα	Αντιμετώπιση
1	Απροσδόκητα υψηλές τιμές απορρόφησης ή συγκέντρωσης	Ελέγχουμε αν είναι καθαρή εξωτερικά η κυψελίδα. Αν δεν είναι, τη σκουπίζουμε προσεκτικά με χαρτομάντιλο και ξαναμετράμε.

Δημιουργήθηκε από	Χριστίνα Καρπούζη, Ιωάννη Κοσμίδη
Ελέγχθηκε από	Βασίλη Μούγιο
Ημερομηνία	9 Ιουνίου 2021