Фотометрические методы биохимического анализа

Нефелометрия. Турбодиметрия

Рассеяние света

Мутный раствор в кювете

- - поглощает свет (если окрашен)
- - частично проходит, не изменяя направления (трансмиссия)
- - частично рассеивается, изменяя направление под различными углами (рассеивание)

Рассеяние света

Трансмиссия и рассеивание зависят от

- - длины волны светового потока
- - частоты светового потока
- - интенсивности светового потока
- - свойств рассеивающей среды (размера и формы частиц, количества, способности к поляризации и др)
- Если в процессе измерения размер частиц в растворе меняется, будет меняться поток проходящего и рассеивающего света

Определение светорассеивания

Зависит от

- длины волны (λ)
- Диаметра частиц, на которых происходит рассеивание

Если размер частиц значительно меньше длины волны светового потока (<λ/10) – упругое рассеяние

Интенсивность потока, рассеиваемого небольшими частицами, подчиняется уравнению Релея

$$I_r = I_0 \cdot \frac{n_1^2 - n^2}{(n_1^2 + 2n^2)} \cdot \frac{NV^2}{\lambda^4 d^2} \cdot (1 + \cos^2 \beta),$$

I_r и I_0 – интенсивность рассеянного и падающего света, n_1 и n – коэффициенты преломления частиц и среды, N – общее число частиц, V – объем частиц, λ – длина волны падающего света, d – расстояние до наблюдателя, β – угол, образованный падающим и рассеянным светом

При лабораторных исследованиях величины V, n_1, n, λ, d и β – известны и постоянны для исследуемого вещества, N = C*b. C – концентрация вещества, b – толщина раствора.

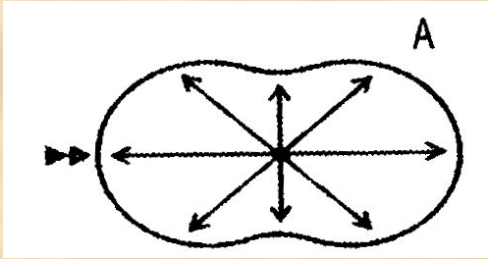
Для определенного угла формула принимает вид

$$\frac{I_r}{I_0} = k \cdot C$$

Известные параметры объединены в коэффициент k

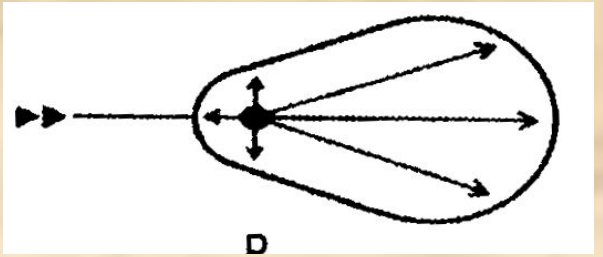
В основе рассеяния малых частиц лежит явление дифракции

- Рассеяние света каждой частицей не зависит друг от друга.
- Рассеянный свет распространяется во всех направлениях
- Максимальное количество света рассеивается под углом 0 и 180º



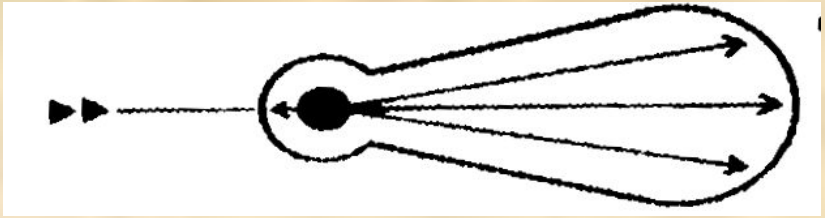
- При λ 400нм – такой тип рассеивания характерен для частиц диаметром < 40 нм (иммуноглобулины,β-липопротеины, альбумин)

При увеличении размеров частиц (40-400 нм) рассеивание становится несимметричным



- Максимальное количество света рассеивается в направлении падающего луча
- При λ 400нм (Ig M, хиломикроны, формирующиеся комплексы антигенов с иммуноглобулинами)

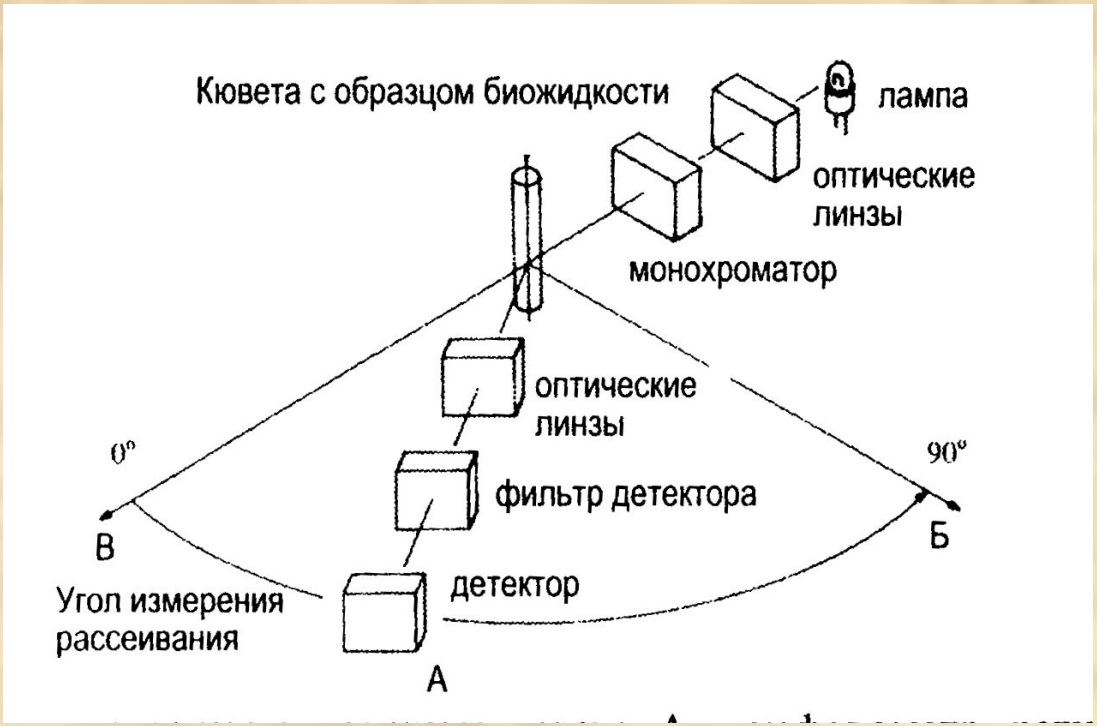
При превышении длины света (диаметр > 400 нм) несимметричность светорассеяния увеличивается



- Характерен для взвеси бактерий, клеток крови (тромбоциты, эритроциты)

Нефелометрия

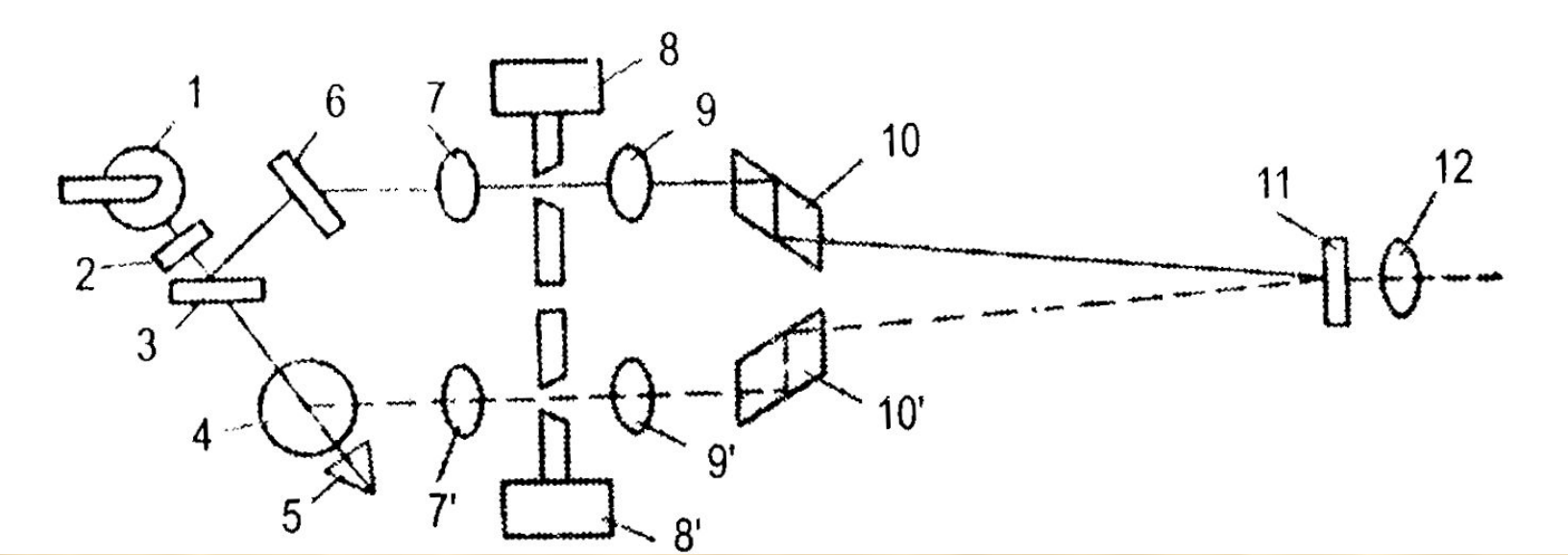
- Измерение рассеянного света
- Сравнивая величины рассеянного и падающего света можно определять концентрацию вещества в растворе



А – нефелометр, регистрирующий малоугловое рассеяние

Б- нефелометр, регистрирующий рассеяние под углом 90º

Оптическая схема нефелометра



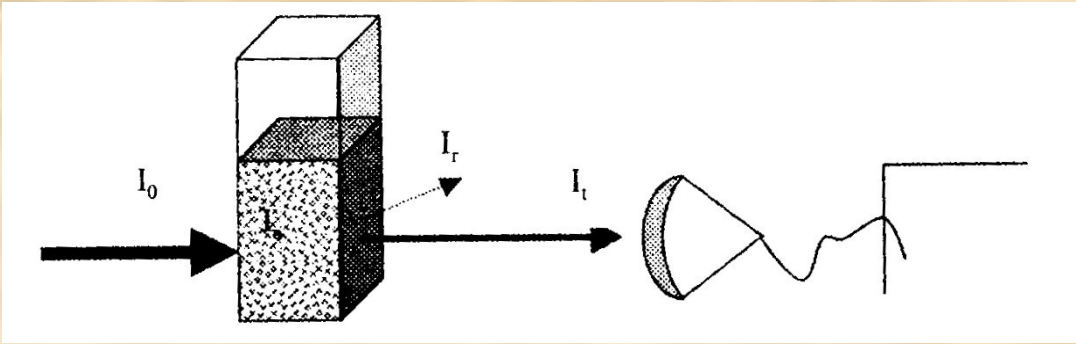
1 – лампа, 2,11 – светофильтры; 3 – стеклянная пластинка, разделяющая свет на 2 пучка; 4 – кювета с исследуемым раствором; 5 – ловушка света; 7, 8, 9 – линзы; 8 – уравнительные диафрагмы; 10 – ромбические призмы; 12 - окуляр

Свет разделяется на 2 пучка – один проходит черезраствор исследуемого вещества, другой – через канал сравнения

Источник света – лампы или лазерные источники излучения (высокая интенсивность излучения, строгая направленность, строгая фиксированная длина волны – идеален для нефелометрии)

Турбидиметрия

- Измерение прошедшего света
- Турбидиметры построены по типу фотометров



Интенсивность прошедшего светового потока определяется уравнением

$$\lg\frac{I_t}{I_0} = k\frac{Cbd^3}{d^4 + \alpha\lambda^4},$$

I_0 – интенсивность падающего света
I_t – интенсивность потока, прошедшего через раствор
C – концентрация рассеивающих частиц
B – толщина поглощающего слоя
d – средний диаметр рассеивающих частиц
k и α – константы, зависящие от природы вещества и метода измерения
λ- длина волны

Турбидиметрия

При постоянных b, d, k, α и λ получим $\lg \frac{I_t}{I_0} = tC$ или $I_t = I_0 \cdot 10^{-tC}$

Выражение, подобное закону Бугера-Ламберта для окрашенных растворов

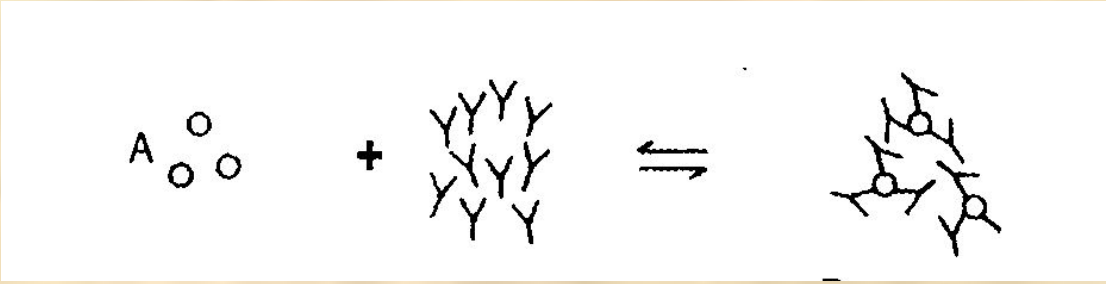
- t – молярный коэффициент мутности раствора (турбидность)
- В качестве турбидиметров можно использовать большинство фотометров и биохимических анализаторов
- Обычно используются короткие волны (340 нм), т.к. доля рассеянного света увеличивается обратно пропорционально четвертой степени длины волны – т.е. при меньшей длине волны прошедший свет будет составлять большую часть от падающего, для более короткого ультрафиолета нужна специальная оптика

Турбидиметрия и нефелометрия

- Используются для определения индивидуальных белков
- Особенность – построение калибровочного графика с использованием не менее пяти концентраций (калибровочный график имеет нелинейный характер)

Кривая доза-эффект

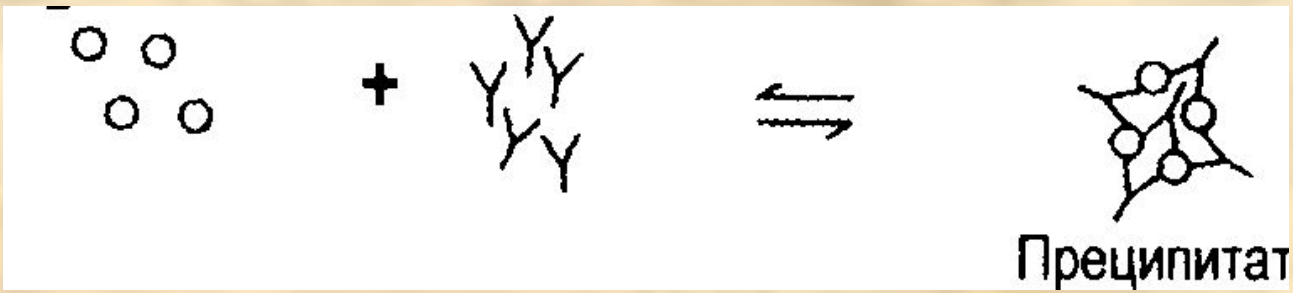
- При взаимодействии антиген-антитело образуют агрегаты



При постоянной концентрации антител при невысокой концентрации антигена все антигена связываются с антителами. При осаждении комплексов центрифугированием – в супернатанте – несвязанные антитела – ***избыток антител. Преципитат не образуется***

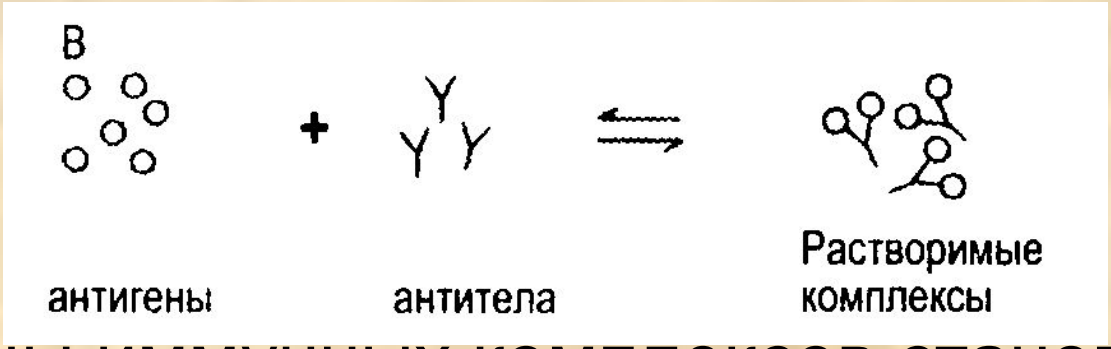
Кривая доза-эффект

- При пропорциональной концентрации антигенов и антител комплекс выпадает в осадок – ***преципитат***. В супернатанте не определяются антитела и антигены – ***эквивалентное состояние***



Кривая доза-эффект

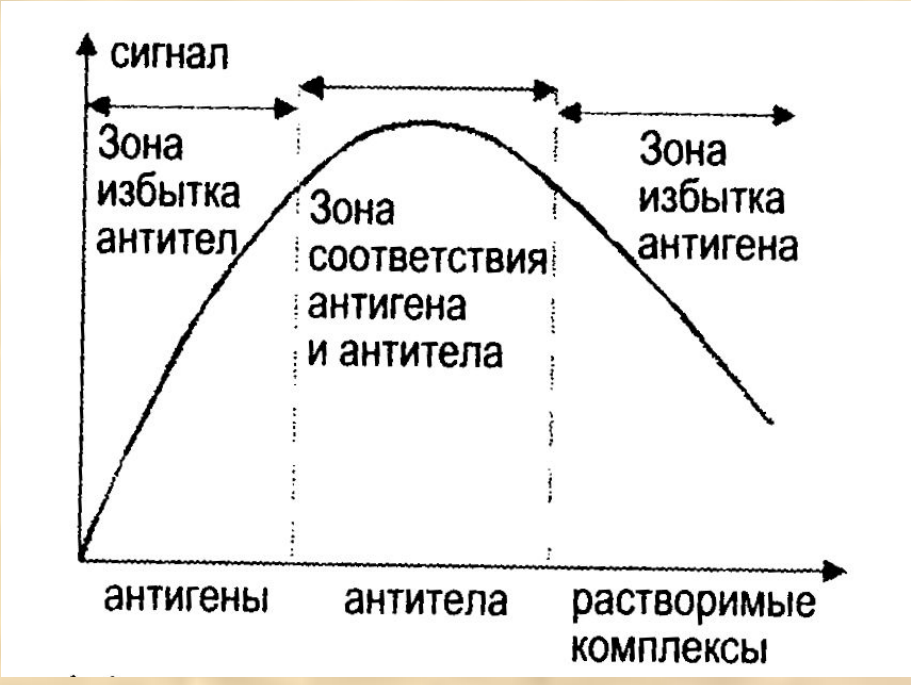
- При увеличении концентрации антигенов количество антител недостаточно для полного связывания белка.



- Частицы иммунных комплексов становятся мелкими, ***преципитат не формируется***. В супернатанте – свободные антигены – ***антиген-эксцесс***

Кривая доза-эффект

- Классическая преципитационная кривая Хайдельберга-Кендаля



1) ***Зона избытка антител*** – величина преципитатов увеличивается по мере добавления антигенов. В супернатанте свободные антитела
2) ***Зона соответствия антигена и антитела –*** максимальная препитация. В супернатанте нет свободных антител и антигенов
3) ***Зона избытка антигенов***. Формирование небольших иммунных комплексов, а не преципитат. В супернатанте – свободные антигены

Калибровочный график

- **Строится для**

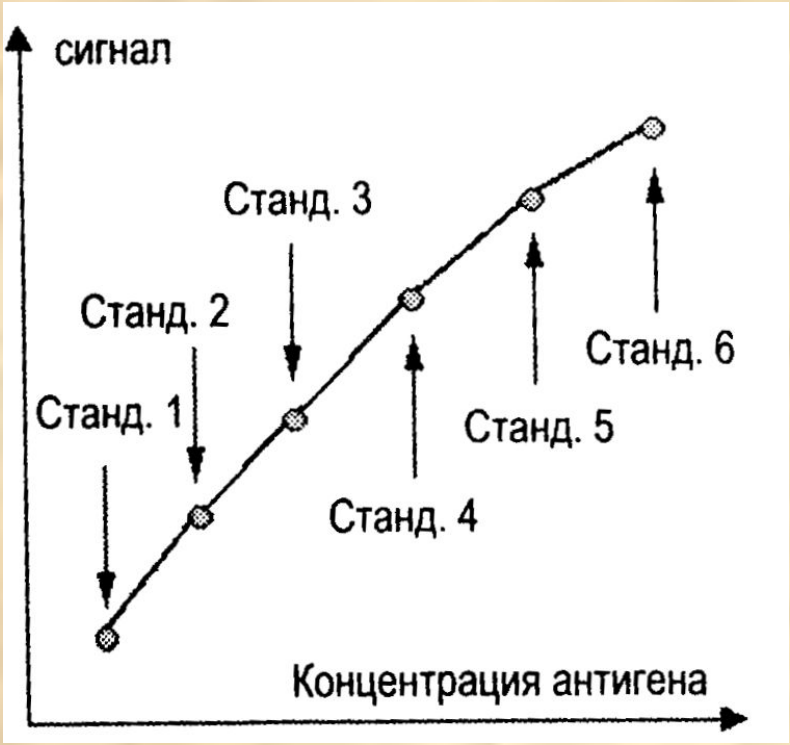
-каждого индивидуального белка

-каждого прибора

-при любом условий регистрации

-периодически при проведении исследований

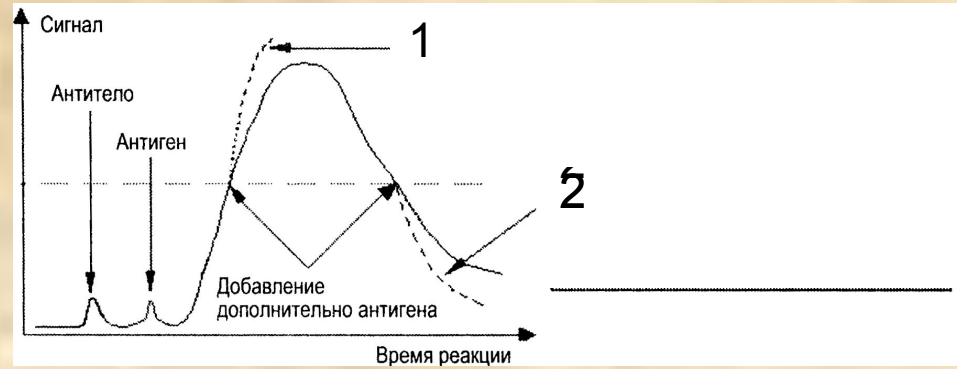
При серийных исследованиях в стандартных условиях допускается корректировка графика на основании измерения одного из стандартов. (вид стандартной кривой не меняется из-за влияния систематических факторов, происходит параллельный сдвиг всего графика)



Для построения графика требуется по крайней мере 5 стандартных растворов

1- если после добавления антигена реакция ускоряется, имеет место избыток антител (измерение проводится правильно)

- Состав реакционной смеси подбирается так, чтобы измерение производилось в зоне избытка антител.
- При очень высокой концентрации белка антител недостаточно, частицы преципитата становятся мелкими (нисходящая часть кривой) – с увеличением концентрации белка сигнал прибора уменьшается. Может быть выдан неправильный результат.
- Проводят разведение биологической жидкости
- Если сигнал увеличивается – определение проводилось в нисходящей части кривой
- Разведение проводят до степени избытка антител



1- если после добавления антигена реакция ускоряется, имеет место избыток антител (измерение проводится правильно)

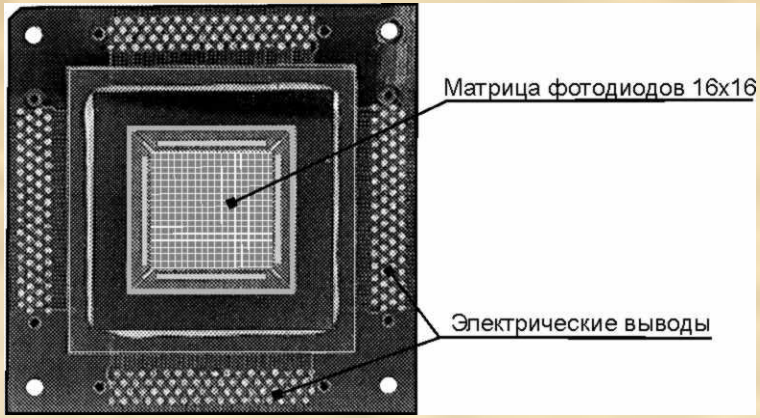
2- если после добавления антигена реакция не ускоряется, имеет место избыток антигена (измерение проводится неверно)

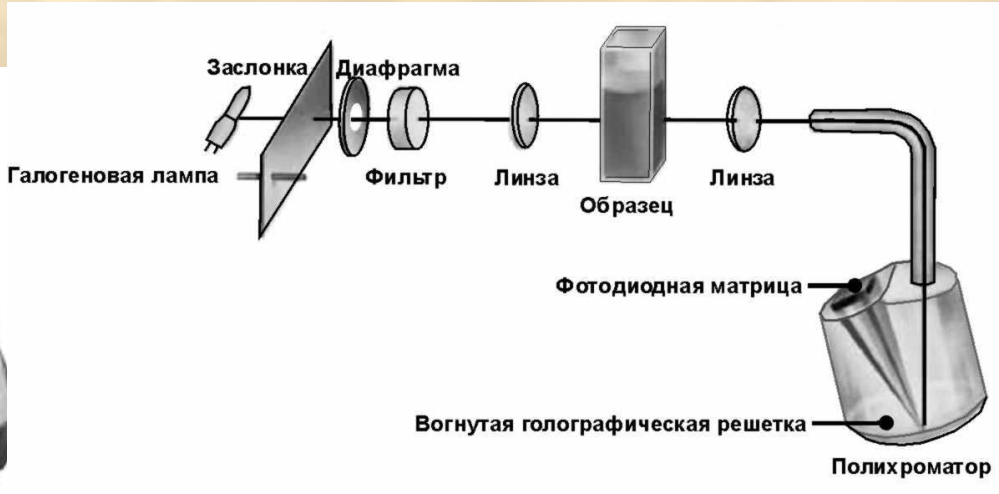
- Современные приборы способны определять и отслеживать избыток антигенов автоматически (регистрация ускорения реакции после добавления дополнительного количества антигена –малые дозы калибратора)
- При постановке на обычном фотометре необходимо знать диагноз. Избыток антигена наблюдается в чрезвычайной ситуации. При миеломной болезни концентрация IgG может быть очень высокой, и исследование попадает в зону избытка антигена. Необходимо электрофоретическое исследование
- В качестве стандартов и контрольных материалов необходимо использовать стандарты и сыворотки, содержащие индивидуальные белки, концентрация которых измерена с использованием иммунохимической реакции

Спасибо за внимание

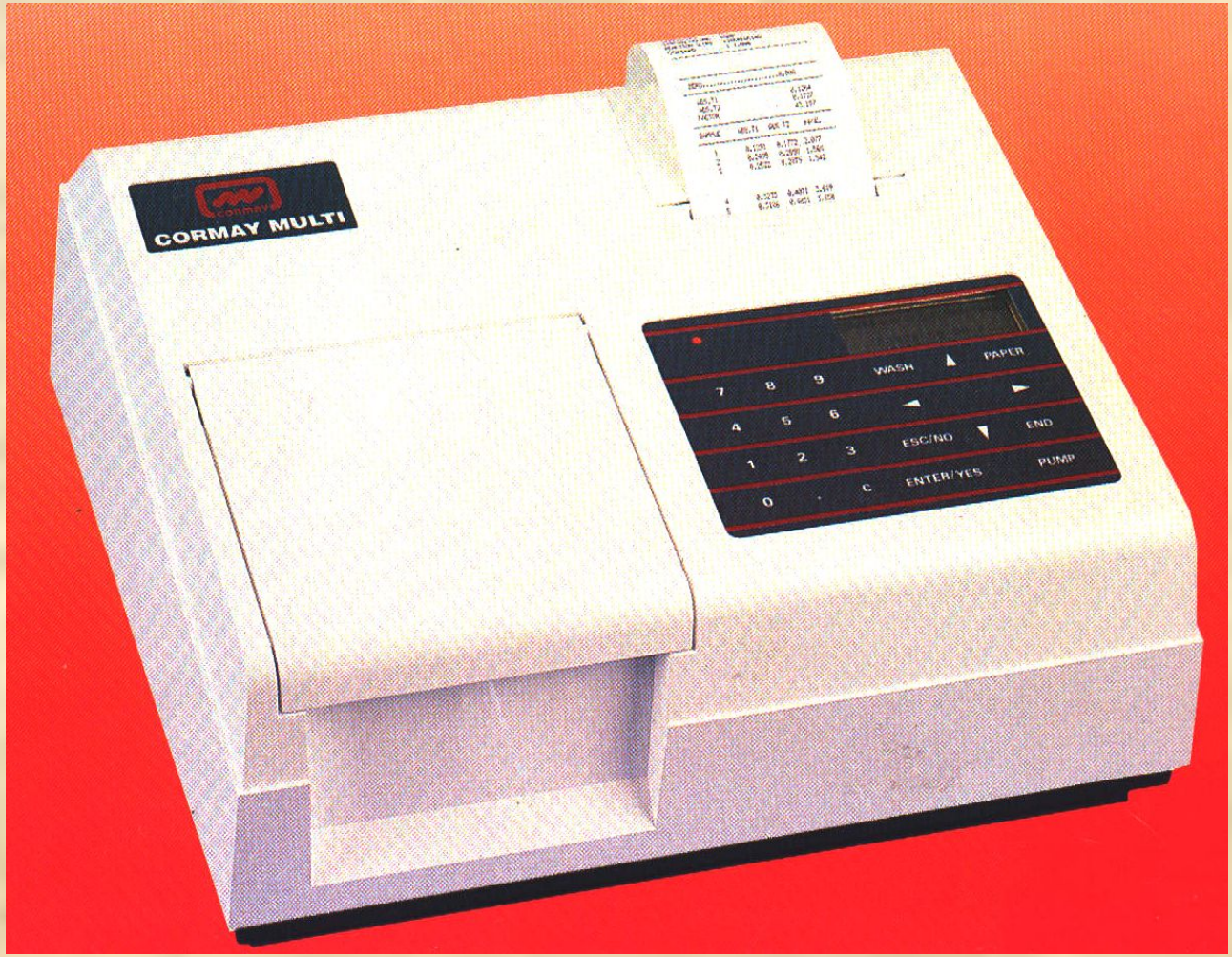
КЛИНИЧЕСКИЙ СПЕКТРОФОТОМЕТР

Спектрофотометр без монохроматора





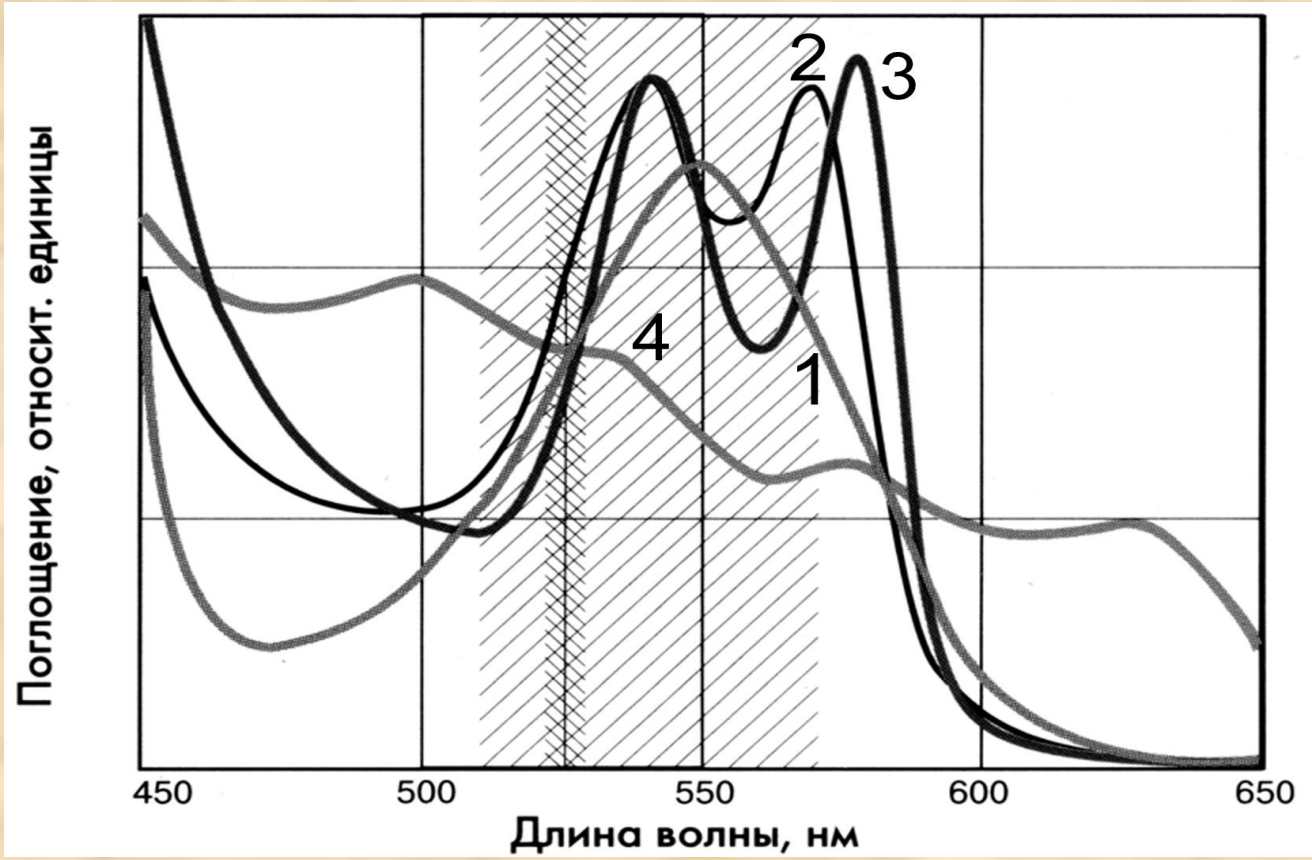
Кормей-мульти –
программируемый фотометр с проточной кюветой



$$I_r = I_0 \cdot \frac{n_1^2 - n^2}{(n_1^2 + 2n^2)} \cdot \frac{NV^2}{\lambda^4 d^2} \cdot (1 + \cos^2 \beta),$$

$$\frac{I_r}{I_0} = k \cdot C$$

Спектр поглощения производных гемоглобина



спектры поглощения производных гемоглобина: 1 – дезоксигемоглобина (HbH); 2 – карбоксигемоглобина (HbCO) 3 – оксигемоглобина (HbO_2); 4 – метгемоглобина (MetHb).

КДЛ амбулаторно-поликлинического звена

Состоявшееся решение - укрепить оснащенность ЛПУ оборудованием, в т.ч. лабораторным

А) создан табель оснащения КДЛ

Б) из Федерального Фонда выделены средства на закупку оборудования

В) проведен тендер на закупку 4 комплектов (ЛОТов) лабораторного оборудования

Г) на основании заявок с территорий составлен реестр распределения оборудования