	ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫМ ПРОИЗВОДСТВОМ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР		
СОП №:	Номер версии:	Число страниц:	
III/3П-1-027-2022/3	3	8	
	Дата начала действия версии СОП:	Дата окончания действия версии СОП:	
	29.06.2022	29.06.2024	
Наименование СОП:	**Определение концентрации общего белка**		
Составлено/ Пересмотрено	_____ подпись	30.06.2020 / __16.06.2022_ дата	А.С. Таран
Проверено: Руководитель СОК	_____ подпись	__21.06.2022_ дата	В.Н. Перфилова
Утверждено: Руководитель лаборатории	_____ подпись	__28.06.2022_ дата	Л.И. Бугаева
Форма обучения:	чтение ✓	практические занятия	

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ЦЕЛЬ: Цель данной стандартной операционной процедуры (СОП) – описать метод определения общего белка в биологических жидкостях при исследовании токсичности новых химических соединений.

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ:

СОП предназначена всем сотрудникам, проводящим *in vitro* изучение биохимических показателей биологических жидкостей.

Сотрудники, работающие с данным методом, должны проводить измерения согласно данной СОП, вести соответствующую документацию и поддерживать чистоту оборудования.

2. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1) Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. № 1700-ст межгосударственный

стандарт ГОСТ 33044—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г. Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Guide 1:1998 OECD Principles of good laboratory practice). – М.: Стандартинформ, 2015. – 16 с.

2) Национальный стандарт РФ ГОСТ 31883-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики. Обеспечение качества в соответствии с Принципами GLP» (Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2012 г. N 2151-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 31883—2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2013 г. Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring - No 4 - Consensus document - Quality assurance and GLP: 1999* (Консенсусный документ по GLP. Обеспечение качества и надлежащая лабораторная практика:1999, N 4 из серии документов Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) о принципах GLP и мониторинге соответствия).

3. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

За выполнение данной процедуры должен отвечать квалифицированный сотрудник лаборатории, имеющий подготовку, специальные знания и опыт на уровне, необходимом для реализации своих обязанностей, знакомый с процедурами испытаний, стандартами и системами, используемыми в самом испытательном центре или при проведении работ в интересах испытательного центра

4.ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая СОП предназначена для использования персоналом испытательного центра.

5. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Принципы надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice (GLP): Система обеспечения качества, имеющая отношение к процессам организации, планирования, порядку проведения и контролю испытаний в области охраны здоровья человека и безопасности окружающей среды, а также оформления, архивирования и представления результатов этих испытаний.

Стандартные операционные процедуры; СОП (standard operating procedures; SOPs): Подробные письменные инструкции, содержащие описание процессов проведения испытаний или другой деятельности, как правило, не представленных детально в планах исследования или руководствах по проведению испытаний, и предназначенные для достижения единообразия при осуществлении определенной деятельности.

6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

GLP - Good Laboratory Practice (надлежащая лабораторная практика);
СОП–стандартная операционная процедура;
СОК – служба обеспечения качества

7.ПРИМЕНЯЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ / ИНСТРУМЕНТЫ

1. Биуретовый реактив

2. Калибратор – раствор БСА 70 г/л
3. Вода бидистиллированная
4. Вода дистиллированная
5. Стаканы лабораторные
6. Пробирки центрифужные 10 мл
7. Дозатор поршневой
8. Спектрофотометр СФ-56 APEL PD-303UV (Япония)

9.Кюветы фотометрические объёмом 2 мл

10.Наконечники к дозатору одноразовые

11.Средства индивидуальной защиты (шапка, маска, перчатки, халат).

8. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ

8.1 Принцип метода:

Белок образует окрашенный комплекс с ионами меди в щелочной среде. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка в пробе. Условия проведения реакции 37°С.

8.2 Подготовка реагентов к процедуре анализа.

Рабочий реагент:

Развести необходимое количество биуретового реактива бидистиллированной водой в соотношении 1:4.

Процедура анализа

Подготовка образцов к анализу

Подготовить пробы следующего состава:	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Рабочий реагент, мл	1,0	1,0	1,0
Сыворотка (плазма), мкл	20	-	-
Калибратор, мкл	-	20	-
Вода дистиллированная, мкл	-	-	20

**Объемы опытных проб могут быть пропорционально изменены*

Пробы тщательно перемешать и инкубировать при 18-25°С в течение 30 мин. или 15 мин. при 37°С.

Измерить оптические плотности опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны λ=540 нм. Интенсивность окраски стабильна не менее часа.

8.3 Обработка результатов

Расчет концентрации (С) белка в исследуемом материале:

1. Общий белок сыворотки/плазмы крови:

$$C = \frac{E\ \text{пробы}}{E\ \text{калибр.}} \times 70\ \text{г/л}$$

где:

Е пробы – оптическая плотность исследуемой пробы

Е калибр. – оптическая плотность калибровочной пробы,

70 г/л – концентрация белка в калибраторе,

Обработку результатов выполнять в программе Microsoft Excel (Microsoft, США) или GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc., USA) с расчетом базовых статистических показателей:

среднего арифметического *M*, стандартной ошибки среднего арифметического *m*. Статистическая обработка с применением парного *t*-критерия Стьюдента в программе Statistika 10.0 (StatSoft, США).

8.4 Требования к исследуемым образцам и реагентам.

Липимичная или гемолизированная сыворотка и плазма крови для анализа непригодна. Возможно хранение образцов при 2-8°С в течение суток.

Рабочий реагент стабилен при 18-25°С в течение 12 месяцев при хранении в защищенном от света месте, реагент №1 необходимо хранить в полиэтиленовой таре и защищенном от света месте.

Калибратор готов к применению, после вскрытия флакона он стабилен не менее 6 мес. при хранении в защизенном от света месте при 2-8 °С.

Невскрытые реагенты и калибратор стабильны не менее 12 месяцев при хранении в защищенном от света месте при 18-25°С.

9. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1.Национальный стандарт РФ ГОСТ 31883-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики. Обеспечение качества в соответствии с Принципами GLP» введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2013 г.

2.Weichselbaum T.E. Am.J.Clin.Pathol.,1946, vol.7, p.40

10. ПРИЛОЖЕНИЕ

Протокол регистрации первичных данных
при определении концентрации общего белка

Код исследования: _____
Дата выполнения эксперимента: _____
Группа _____Изучаемое вещество_____ Доза_____
Вид животных _____ Линия_____ Пол животных_____
Путь введения _____

№ животного	Оптическая плотность, D	Примечание

Исполнитель:
_____/_____
(подпись) *(расшифровка подписи – Ф.И.О.)*
Руководитель
исследования:_____/_____
(подпись) *(расшифровка подписи – Ф.И.О.)*

Лист регистрации изменений СОП № III/3П-1-027-2022/3 от 16.06.2022

№ изм.	№ страницы	№ пункта	Внесенные изменения
1	1	Титульный лист	В номер СОП добавлен номер версии СОП……/3 В заглавной части титульного листа удалено: «Дата утверждения» и строка «Составление, утверждение и пересмотр СОП». В заглавной части титульного листа «Дата начала действия» заменено на «Дата начала действия версии СОП»; «Дата пересмотра» заменено на «Дата окончания действия версии СОП»; «Составлено» заменено на «Составлено/пересмотрено»; «Утверждено: Руководитель лаборатории» заменено на «Утверждено: Руководитель испытательного центра»
2	1	1	Удалено «И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ»
3	1	1	Удалено: СОП описывает метод определения концентрации общего белка у экспериментальных животных (крыс, кроликов…) при проведении доклинических токсикологических исследований биуретовым методом.
4	1	1	Добавлено в Цель Цель данной стандартной операционной процедуры (СОП) – описать метод определения общего белка в биологических жидкостях при исследовании токсичности новых химических соединений.
5	1-2	2	Добавлено 1) Национальный стандарт РФ ГОСТ 31883-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики. Обеспечение качества в соответствии с Принципами GLP» Удалено 1) Приказ Минздрава России от 01.04.2016 N 199н "Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики". 2) Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с. 3) Европейская Конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей CETS 123 (Страсбург, 1986). 4) Директива 2010/63/eu Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г по охране животных, используемых в научных целях.

6	2	3	Удалено «ЗА ВЫПОЛНЕНИЕ РАБОТ ПО ПРОЦЕДУРЕ» За выполнение данной процедуры должен отвечать квалифицированный сотрудник лаборатории, знающий правила и имеющий опыт её выполнения. Добавлено За выполнение данной процедуры должен отвечать квалифицированный сотрудник лаборатории, имеющий подготовку, специальные знания и опыт на уровне, необходимом для реализации своих обязанностей, знакомый с процедурами испытаний, стандартами и системами, используемыми в самом испытательном центре или при проведении работ в интересах испытательного центра.
7	2	4	Добавлено: ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ Настоящая СОП предназначена для использования персоналом испытательного центра.
8	2	5	Удалено: ПРИНЦИП МЕТОДА Белок образует окрашенный комплекс с ионами меди в щелочной среде. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка в пробе. Условия проведения реакции 37°С.
9	2	5	Добавлено «ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ» Принципы надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice (GLP): Стандартные операционные процедуры;
10	2-3	6	Добавлено: СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ GLP - Good Laboratory Practice (надлежащая лабораторная практика); СОП–стандартная операционная процедура; СОК – служба обеспечения качества
11	3	7	Нумеровано 7. ПРИМЕНЯЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ / ИНСТРУМЕНТЫ
12	4	8	Нумеровано 8. «ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ»
13	4	9	Добавлено 1.Национальный стандарт РФ ГОСТ 31883-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики. Обеспечение качества в соответствии с Принципами GLP» введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2013 г.
14	5	10	Нумеровано ПРИЛОЖЕНИЕ
15	Каждая страница	колонтитул	Удалено: Начало действия Добавлено: В код СОП добавлен номер версии

Руководитель лаборатории:

«____»_____ _____ г. _____ /_____/

дата подпись расшифровка