

2.1. Приготовление раствора прекалликреина из плазмы крови доноров.

Приготовление буфера А.

6,055 г трис(гидроксиметил) аминметана, 1,17 г натрия хлорида, 50 мг гексадиметрин бромида и 10 мг натрия азида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде очищенной, доводят рН до 7,95-8,05 2 М раствором кислоты хлористоводородной, перемешивают, доводят объем раствора водой до метки и вновь перемешивают. Раствор хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес.

Аликвоту плазмы крови доноров диализуют против 10 объемов буфера А в течение 20 час. Отдиализованную плазму наносят на колонку ДЭАЭ-агарозы, уравновешенную буфером А, объем которой в 2 раза превышает объем плазмы. Проводят элюцию буфером А со скоростью 20 мл/см²/час. Собирают фракции первого пика, поглощающие при 280 нм. Полученный пул контролируют на отсутствие активности калликреина: аликвоту пула смешивают с предварительно подогретым рабочим раствором хромогенного субстрата в соотношении 1:20, инкубируют при 37 °С в течение 2 мин и определяют изменение оптической плотности в минуту ($\Delta A/\text{мин}$) при длине волны 405 нм. Полученный пул прекалликреина пригоден, если $\Delta A/\text{мин}$ не превышает 0,001. К собранной фракции добавляют натрия хлорид из расчета 7 г/л, фильтруют через мембранный фильтр с порами 0,45 мкм, разделяют на аликвоты и хранят при температуре ниже минус 25 °С в течение 12 мес. Аликвоту после размораживания используют в течение рабочего дня.

2.2. Приготовление раствора прекалликреина из готового реагента прекалликреина проводят в соответствии с указаниями в инструкции по применению реагента, если иное не указано в нормативной документации.

3. Приготовление рабочего раствора синтетического хромогенного субстрата. 25 мг хромогенного субстрата (например, S-2302, Н-D-пролил-L-фенилаланил-L-аргинина- ρ -нитроанилин дигидрохлорид) растворяют в буферном растворе до получения раствора с необходимой концентрацией в соответствии с указаниями в нормативной документации.

4. Подготовка испытуемого образца. Испытуемый препарат иммуноглобулина человека разводят буферным раствором до содержания белка 30 г/л. Необходимость разведения испытуемого препарата альбумина человека указывают в нормативной документации с учетом данных по валидации методики на основании предполагаемого содержания АПК и выбранного диапазона значений калибровочной кривой.

5. Подготовка СО. Подготовку СО осуществляют в соответствии с прилагаемой инструкцией по применению к СО. Готовят ряд разведений СО с использованием буферного раствора. Разведения и кратность их приготовления выбирают таким образом, чтобы зависимость регистрируемой скорости реакции (или оптической плотности) от концентрации АПК имела линейный характер.