

Stanovení aktivity enzymů

Stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy (ALT)

Alaninaminotransferasa (L-alanin:2-oxoglutarát-aminotransferasa) katalyzuje reakci



Doplňte vzorce všech reaktantů a produktů :

Po této enzymové reakci následuje reakce další, na jejímž základě je umožněno měření enzymové aktivity ALT. Doplňte rovnici této reakce.

Popište, jak budete dále postupovat při použití kinetické metody k zjištění aktivity ALT:

Materiál: : pracovní roztok obsahující Tris pufr 110 mmol/l, pH 7,3; pyridoxal-5-fosfát 0,1 mmol/l, L-alanin 550 mmol/l; LDH $\geq 21,7$ $\mu\text{kat/l}$; NADH 0,198 mmol/l; 2-oxoglutarát 16,5 mmol/l (připraví se z činidel soupravy dle návodu). Vzorek krevního séra.

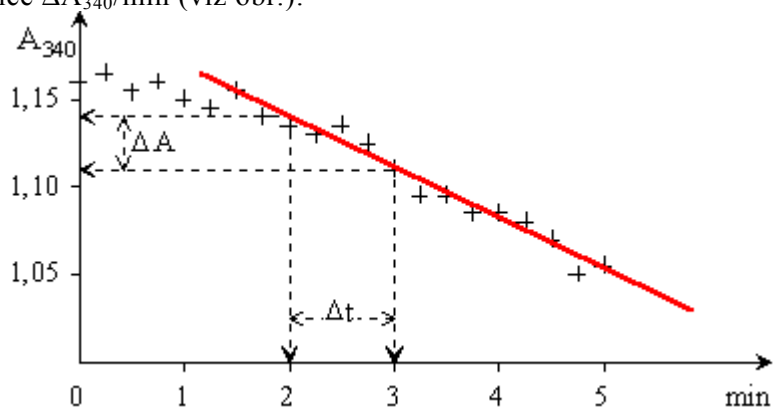
Vysvětlete význam všech reagensů.

Provedení (manuelní): Kyvetu fotometru naplňte destilovanou vodou a při vlnové délce 340 nm fotometr vynulujte. Vodu z kyvety vylejte.

Do kyvety předehtáte na 37 °C odměřte 1 ml pracovního roztoku. Kyvetu vložte do kyvetového prostoru fotometru a nechte 5 min předehtát (tuto dobu je nutné dodržet!).

Přidejte do kyvety mikrodávkačem 0,1 ml vzorku séra a tyčinkou opatrně promíchejte. Tím je zahájena první enzymová reakce, v návaznosti na ni probíhá ihned reakce druhá. Zaznamenejte čas v okamžiku smíchání a v intervalech po 15 s zapisujte absorbance vzorku v kyvetě po dobu 5 minut.

Naměřené hodnoty vyneste do grafu. Z přímkové části grafu vypočítejte průměrnou rychlost poklesu absorbance $\Delta A_{340}/\text{min}$ (viz obr.):



Výpočet: Katalytická koncentrace ALT v séru:

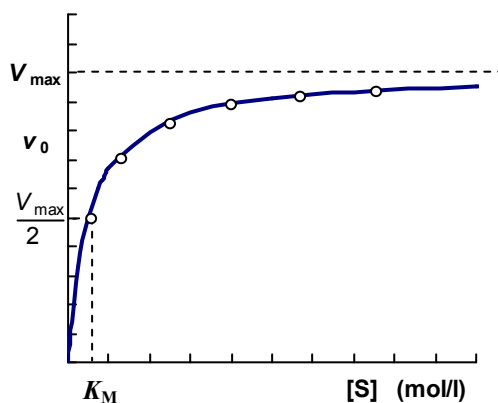
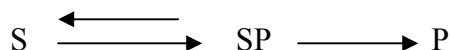
$$\text{katalytická koncentrace ALT} = \frac{\Delta A_{340} / \text{min}}{\epsilon_{\text{NADH}}} \cdot \frac{V_{\text{CELK}}}{V_{\text{VZ}}} \cdot \frac{1}{60} \cdot 10^6 = \Delta A_{340} / \text{min} \cdot 29,10 \quad \mu\text{kat} / \text{l}$$

Vysvětlete význam všech složek vztahu pro výpočet katalytické koncentrace.

Proč počáteční část grafu není přímková?

Využití enzymů jako analytických činidel.

Enzymy mohou být rovněž využity k měření koncentrace substrátu. Při stanovení musí být zachovány stejné obecné požadavky pro optimální průběh enzymové reakce. Jediný rozdíl je v tom, že rychlost reakce je limitována koncentrací substrátu (reakce prvního řádu vůči substrátu), zatímco koncentrace enzymu musí být taková, aby nelimitovala rychlost reakce. Na rozdíl od reakcí, při nichž se měří enzymová aktivita, reakce využívající enzymy ke stanovení koncentrace substrátu jsou obvykle kalibrovány paralelní analýzou substrátu o známé koncentraci. Podobně jako u enzymových esejí mohou být využívány spřažené reakce.



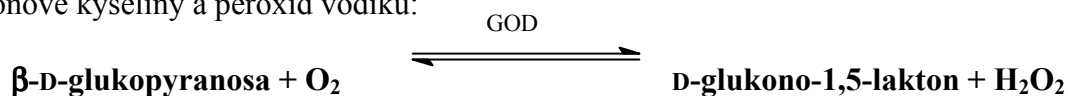
$$v_0 = V_{\text{max}} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

- Metoda end-point (stanovení se provádí z celého průběhu reakce – do koncového bodu, všechnen substrát musí zreagovat) – reakce musí být rychlá a kvantitativní. Koncentrace substrátu jsou často nízké, $[S] \ll K_M$, koncentrace enzymu musí být dostatečně vysoká. Měří se výsledné množství produktu po proběhnutí reakce do konce (<99%)

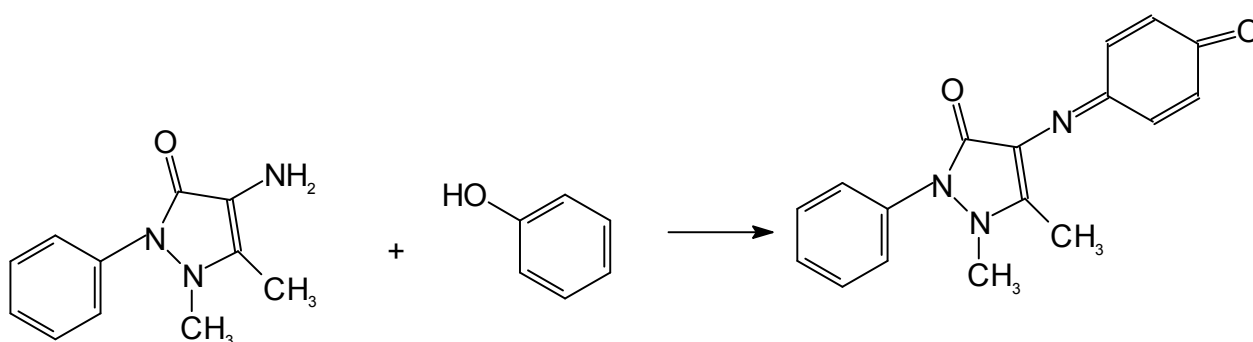
Příklad:

Enzymové stanovení glukosy v séru

Glukosa se oxiduje vzdušným kyslíkem za katalýzy glukosaoxidázou (GOD) na δ -lakton glukonové kyseliny a peroxid vodíku:



Vzniklý peroxid vodíku za katalýzy peroxidázou (POD) oxiduje chromogenní substrát na červeně zbarvený produkt:



Při dodržení předepsaných podmínek je množství produktu úměrné koncentraci glukosy v analyzovaném vzorku.

Vzorky séra nebo plazmy oddělené ihned po odběru se ke stanovení nijak neupravují. Pokud se krev hned nezpracuje, musí se stabilizovat: nejjednodušší způsob je zchlazení krve, nebo přidavek mannosy (alternativní substrát pro hexokinázu, působí okamžitě), případně přidavek NaF (inhibice glykolýzy v erythrocytech, ale až se difúzí dostane do buněk, tj. asi po 2 h).

Materiál: Set Glu firmy Roche Diagnostics*: Činidlo-glukosa (obsahující fenol 11 mol/l; 4-aminofenazon 0,77 mol/l; glukosaoxidázu 300 μ kat/l; peroxidázu 18,3 μ kat/l), kalibrátor-glukosa (koncentrace je uvedena na štítku), vzorek krevního séra a moči. Mikropipetor 20 μ l, 2 ml, vodní lázeň 37 °C, Spektrofotometr Spekol 1300 a software WinAspect, nebo Helios Delta a software VisionLite Fixed. *Alternativně lze použít např. testy fy Pliva-Lachema, Human nebo BioVendor, pak složení činidla je odlišné.

Vysvětlete význam všech složek reakční směsi:

Provedení

☞ Ke stanovení v nehemolytickém krevním séru nebo plazmě není nutná deproteinace. Do čistých, označených zkumavek se odměřuje podle schématu:

Reagencie (μ l)	Slepý pokus	Vzorek	Standard
Činidlo-glukosa	2 000	2 000	2 000

Demi-voda	20	-	-
Sérum	-	20	-
Kalibrátor-glukosa	-	-	20

Obsah všech zkumavek dobře protřepejte (**vysvětlete proč**).

Inkubujte 30 min při laboratorní teplotě (nebo 15 min ve vodní lázni při 37 °C).

Inkubační směs musí být chráněná před přímým světlem!

Změřte absorbance* vzorků A_x a standardu A_{STD} při 495 nm proti slepému pokusu během 40 minut.

:Odvoďte vztah pro výpočet koncentrace glukosy:

- Kinetická metoda

$$[S] \ll K_M \quad v_0 = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$v_0 = k[S] \quad \text{reakce probíhá kinetikou prvního řádu}$$

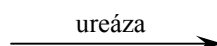
Pro koncentraci produktu platí $c_0 = \text{konst.} \times \Delta c$

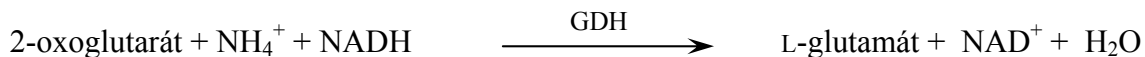
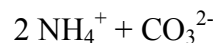
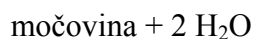
Hledaná koncentrace analytu je přímo úměrná odečtu analytického signálu ve dvou časech. Využívá se v automatických analyzátoch.

Příklad:

Stanovení močoviny v séru a moči

Princip: Při kinetickém enzymovém stanovení koncentrace močoviny se využívá dvou spřažených reakcí. V první reakci se močovina enzymově rozkládá na CO_2 a amoniak. V následné enzymové reakci katalyzované glutamadehydrogenázou (GDH) se amoniak využije pro syntézu glutamátu. Jako druhý substrát se reakce účastní NADH. Měří se úbytek koncentrace NADH v určitém časovém úseku.





Materiál: Set Urea (Roche Diagnostics): *Činidlo-urea* (obsahující Tris-pufř 125 mmol/l, pH 7,35; 2-oxoglutarát $\geq 3,3$ mmol/l; GDH $\geq 11,69$ $\mu\text{kat/l}$; ureáza $\geq 41,75$ $\mu\text{kat/l}$. NADH $\geq 0,13$ mmol/l; ADP $\geq 0,8$ mmol/l). *Kalibrátor-urea* (koncentrace uvedena na štítku). Spektrofotometr Spekol 1300 a software WinAspect, nebo Helios Delta a software VisionLite Fixed. Mikropipetory 10 μl a 1 ml, plastová nebo skleněná tyčinka. Vzorky séra a moči (s diurézou na štítku).

Vysvětlete význam všech složek reakční směsi:

Provedení

- ☞ Vzorky séra a standardního roztoku zpracujte postupně podle následující tabulky.
- ☞ Činidlo musí být temperováno na teplotu laboratoře.
- ☞ Všechny kroky provádějte přímo v kyvetě umístěné ve spektrofotometru postupně pro standard, sérum a moč.

Reagencie (μl)	Vzorek 1	Vzorek 2	Standard
Činidlo-urea	1 000	1 000	1 000
Sérum	10	10	-
Kalibrátor-urea	-	-	10

Promíchejte a po uplynutí 30 s změřte při vlnové délce 340 nm absorbanci A_1 vzorků a standardu proti demi-vodě.

Přesně za 2,5 minuty od prvního měření změřte absorbanci A_2 .

Vypočítejte hodnoty ΔA pro standard i vzorek

Navrhněte vztah pro výpočet koncentrace močoviny: