

datum _____ jméno _____

Téma praktika:

Stanovení katalytické aktivity enzymů, kinetické měření.

Okruhy k nastudování a dotazy:

- 1) Seznamte se s postupem uvedeným v protokolu.
- 2) Při jakých teplotách se v současnosti v klinické biochemii enzymatické měření provádí?
- 3) Do protokolu načrtněte graf závislosti absorbance na koncentraci pro laktát dehydrogenázu (LD) stanovovanou uvedeným principem (malý obrázek).
- 4) Na automatickém analyzátoru budete stanovovat také alaninaminotransferázu (ALT) – seznamte se s běžně užívaným principem stanovení a dle toho načrtněte graf závislosti absorbance na koncentraci (při vlnové délce 340 nm).

Přístroje a pomůcky:

Manuální fotometr

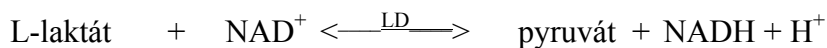
Automatický biochemický analyzátor

Reagenční set LDH - IFCC (Roche)

Úkoly:

1) Provést manuální stanovení LD dle následujícího návodu

Princip:



Katalytická aktivita LD je úměrná nárůstu absorbance při 340 nm.

Složení setu :

Činidlo1: N-metylglukamin, laktát litný, stabilizátory

Činidlo 2: NAD^+

Referenční interval: 2,25 — 3,75 ukat/l M
2,25 — 3,55 ukat/l Ž

Příprava pracovního roztoku :

Používá se přímo

Pracovní postup:

| odměřit v ml | vzorek | kalibrátor |
|---|--------|------------|
| čínidlo 1 | 1.00 | 1.00 |
| sérum | 0.030 | - |
| kalibrátor | - | 0.030 |
| promíchat, inkubace 5 minut při 37°C, na tento roztok spektrofotometr vynulovat | | |
| čínidlo 2 (vytemperované na 37°C) | 0.200 | 0.200 |
| promíchat, nalít do kyvety, měřit absorbance ve stanovených časových intervalech | | |

- a) Změřte katalytickou aktivitu LD pro kalibrátor, a dva vzorky. Provedte časové měření po 60s v časovém intervalu 4 minut (horní rozsah A nastavte 3,0, čas 270s, interval měření A 10s)

| | Kal. A | ΔA | Vz.1 A | ΔA | Vz.2 A | ΔA |
|--------------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|
| měření po smíchání | | | | | | |
| měření za 1 minutu | | | | | | |
| měření za 2 minutu | | | | | | |
| měření za 3 minutu | | | | | | |
| měření za 4 minuty | | | | | | |

- b) Z naměřených dat vypočtete katalytickou aktivitu LD v neznámých vzorcích
- c) Hodnoty pro kalibrátor zpracujte graficky na milimetrový papír jako závislost absorbance na čase
- 2) **Na automatickém biochemickém analyzátoru změřit katalytickou aktivitu ALT, AST, CK a LD u tří připravených vzorků (jedná se o vzorky s vysokými hodnotami):**
- a) Důkladně se seznámte s grafickým zpracováním průběhu reakce (vyčerpání substrátu) a vyznačením rozmezí bodů, ve kterých probíhá měření
- b) Dle potřeby proveďte rerun vzorků – různé možnosti automatického ředění (snížení pipetovaného objemu vzorku), které provádí analyzátor a také ruční ředění. Výsledky včetně násobku ředění a chybových hlášení zapište do tabulky:

| Č.vzorku/ukat/l | AST | ALT | CK | LD |
|-----------------|-----|-----|----|----|
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |

Závěr: _____
