

Praktické cvičení č. _____ 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 :

Činidlo 1: 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. Proved'te 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 seznamte 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	ALT				AST			
	1. měření	Rerun	Ručně řed.	Přepoč.	1. měření	Rerun	Ručně řed.	Přepoč.
1								
2								
3								

Č.vzorku/ukat/l	CK				LD			
	1. měření	Rerun	Ručně řed.	Přepoč.	1. měření	Rerun	Ručně řed.	Přepoč.
1								
2								
3								

Závěr: _____
