

Praktické cvičení datum _____ jméno _____

Téma praktika:

Stanovení katalytické aktivity enzymů, kinetické měření II.

Okruhy k nastudování a dotazy:

- 1) Seznamte se s postupem uvedeným v protokolu
- 2) Co je to Warburgův optický test?
- 3) Jakou funkci v reakční směsi plní pyridoxalfosfát?
- 4) Vyhledejte v příbalovém letáku reagenčního setu údaj o měřicím rozsahu metody

Přístroje a pomůcky:

Fotometr Lambda 20

Automatický biochemický analyzátor Cobas Integra 400 Plus (Roche)

Termoblok Evaterm, stopky

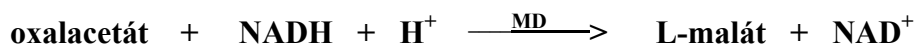
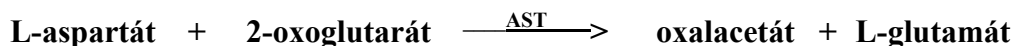
Automatické pipety, spotřební materiál

Reagenční set ASTPL (Roche)

Úkoly:

Proveďte manuální stanovení AST dle následujícího návodu

Princip:



Katalytická aktivita AST je úměrná poklesu absorbance při 340 nm.

Složení setu (roztoky připraveny k přímému použití):

R1: Tris pufr, enzymy (LD, MD), L-aspartát

SR: NADH, 2-oxoglutarát

Aktivátor - Pyridoxal-5-fosfát

Pracovní postup:

odměřit v ml	vzorek	kalibrátor
Pracovní roztok	2.00	2.00
sérum	0.200	-
kalibrátor	-	0.200
promíchat, inkubace 5 minut při 37°C		
činidlo 2	0.200	0.200
promíchat, inkubace 2 minuty při 37°C nalít do kyvety, měřit absorbance ve stanovených časových intervalech		

- a) Změřte katalytickou aktivitu AST pro kalibrátor a vzorek: Proved'te časové měření po 2 minutách v časovém intervalu 8 minut.

	Kal. A	ΔA	Vz. A	ΔA
2 minuty po smíchání				
4 minuty po smíchání				
6 minut po smíchání				
8 minut po smíchání				

- b) Zhodno'te průběh reakce, dle potřeby opakujte měření s nařaděným vzorkem. Z naměřených dat vypoč'tete katalytickou aktivitu AST ve vzorku
- c) Hodnoty absorbancí zpracujte graficky jako závislost na čase
- d) Změřte vzorek i na automatickém biochemickém analyzátoru Cobas Integra 400 Plus, naměřené výsledky porovnejte

Závěr: _____
