

Praktické cvičení datum _____ jméno _____

Téma praktika:

Stanovení katalytické aktivity enzymů, kinetické měření I.

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:

Fotometr Lambda 20

Automatický biochemický analyzátor Cobas Integra 400 Plus

Termoblok Evaterm

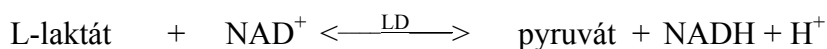
Automatické pipety + spotřební materiál

Reagenční set LDH – Lactate dehydrogenase liquid acc. to 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⁺ (koenzym)

Roztoky jsou připraveny k přímému použití.

| | | |
|-------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Referenční interval LD: | Novorozenci do 20 dní | 3,75 - 10,00 $\mu\text{kat/l}$ |
| | Děti 20 dní – 15 let | 2,00 - 5,00 $\mu\text{kat/l}$ |
| | Muži | 2,25 - 3,75 $\mu\text{kat/l}$ |
| | Ženy | 2,25 - 3,55 $\mu\text{kat/l}$ |

Pracovní postup:

| | | |
|--|--------|------------|
| odměřit v ml | vzorek | kalibrátor |
| činidlo 1 | 2.00 | 2.00 |
| sérum | 0.100 | - |
| kalibrátor | - | 0.100 |
| promíchat, inkubace 5 minut při 37°C, na tento roztok spektrofotometr vynulovat | | |
| činidlo 2 | 0.400 | 0.400 |
| promíchat, inkubace 1 minuta, 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

| | 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 jako závislost absorbance na čase

2) Na automatickém biochemickém analyzátoru změřte 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, 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: _____
