

Praktické cvičení datum _____ jméno _____

Téma praktika:

Stanovení katalytické aktivity enzymů, kinetické měření – na fotometru

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) Seznamte se s běžně užívaným principem stanovení laktát dehydrogenázy (LD) a dle toho do protokolu načrtněte graf závislosti absorpance na koncentraci (při vlnové délce 340 nm).

Přístroje a pomůcky:

Fotometr Beckman DU-65

Vodní lázeň Vitatron

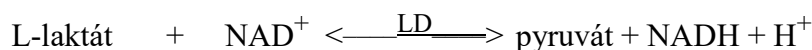
Automatické pipety + spotřební materiál

Reagenční set LDH12 – Lactate dehydrogenase acc. to IFCC ver. 2 (Roche)

Úkoly:

1) Provést manuální stanovení LD dle následujícího návodu

Princip:



Katalytická aktivita LD je úměrná nárůstu absorpance 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 μ kat/l
	Děti 20 dní – 15 let	2,00 - 5,00 μ kat/l
	Muži	2,25 - 3,75 ukat/l
	Ženy	2,25 - 3,55 ukat/l

Pracovní postup:

odměřit v ml	Vzorek [ml]	Kalibrátor [ml]
činidlo 1 - laktát litný sérum	1.0 0.05	1.0 -
kalibrátor	-	0.05
promíchat, inkubace 5 minut při 37°C, na tento roztok spektrofotometr vynulovat		
činidlo 2 – NAD ⁺ vytemperované na 37°C	0.2	0.2
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.