

# STANOVENÍ KATALYTICKÉ KONCENTRACE LAKTÁT DEHYDROGENASY

## ÚLOHA A: Stanovení katalytické koncentrace LDH kinetickou metodou

### MATERIÁL

#### Vzorky

Studenti se seznámí s principem analýzy v kyvetě na spektrofotometru Agilent/HP/Helios. Provedou přípravu roztoků reagensů a vzorků kalibrátoru Lyonorm U a biochemickém kalibrátoru (lyofilizované bovinní sérum). Vlastní analýza katalytické koncentrace proběhne za předem definovaných podmínek (inkubace při RT nebo 37°C v časovém intervalu dle tabulky) v kyvetě, případně mikrotitrační destičce. Použitá metoda - kinetické měření v čase, studenti budou měřit změnu A při 340nm v čase na spektrofotometru, případně ELISA readeru, využijí aplikace kinetické měření. Po uplynutí analýzy si studenti vyvolají uložené výsledky analýzy a uvedou je do protokolu z měření.

### PŘÍPRAVA A PROVEDENÍ

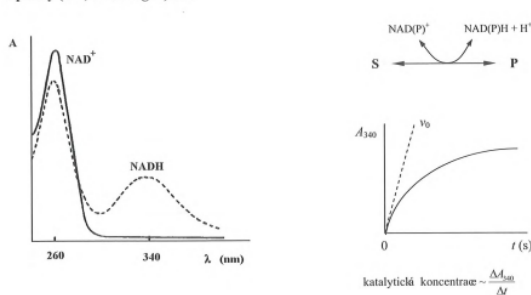
#### Příprava pracovního reagentu (R) :

Kvantitativně přelejte obsah lahvičky B do lahvičky A. Důkladně promíchejte. Menší objemy lze připravit smícháním: 4 ml Reagentu A + 1 ml Reagentu B. Stabilita pracovního reagentu je 3 dny při 2-8°C. **Připravte jen takové množství pracovního reagentu, které je potřeba na konkrétní počet vašich vzorků pro celou skupinu.** Odeberte 1 ml připraveného reagentu a smíchejte s 25 µl vzorku a zahájíte měření v čase.

#### Naměřené hodnoty

čas (min)	A <sub>340</sub> (vzorek 1)
0.5	
1	
1.5	
2	

Optický (UV, Warburgův) test



### KALKULACE

Do protokolu uveďte výsledky analýzy. Proved'te porovnání výsledků stanovení katalytické koncentrace laktátdehydrogenasy v kalibrátoru s atestovanou hodnotou. Do závěru vyhodno'te přínos analýzy v kyvetě na spektrofotometru pro laboratoř. Vysvětlete, co vyjadřuje jednotka **µkat/l**.

Koncentrace LDH ve vzorku je stanovena pomocí následujícího vzorce:

$$\frac{\Delta A_{340}/\text{min} \times V_t \times 10^6}{\epsilon \times l \times V_s} = U/L$$

Molární koeficient ( $\epsilon$ ) NADH při 340 nm je 6300 a optická dráha je 1cm, celkový reakční objem ( $V_t$ ) je 1.025ml, objem vzorku ( $V_s$ ) je 25 $\mu$ l. Jednotkou katalytické koncentrace U/l další jednotkou je  $\mu$ kat/l.

Vzájemný přepočít 1U/L je 0.01667  $\mu$ kat/L.

Toto je výsledky vzorec pro výpočet katalytické koncentrace:

$$\Delta A_{340}/\text{min} \times 6508 = \text{U/L}$$

$$\Delta A_{340}/\text{min} \times 108 = \mu\text{kat/L}$$

## **VYHODNOCENÍ**

Do protokolu uveďte výsledky analýzy. Proveďte porovnání výsledků stanovení katalytické koncentrace laktátdehydrogenasy v kalibrátoru s atestovanou hodnotou. Do závěru vyhodnoťte přínos analýzy v kyvetě na spektrofotometru pro laboratoř. Vysvětlete, co vyjadřuje jednotka  $\mu$ kat/l.

## **ÚLOHA B: Stanovení katalytické koncentrace LDH kinetickou metodou na automatickém analyzátoru**

### **TEORETICKÁ PŘÍPRAVA NA CVIČENÍ**

Laktátdehydrogenasa – její výskyt, biochemická funkce v organismu, diagnostický význam. Izoenzymy LDH. Princip kinetického měření enzymu LDH a jeho význam.

### **PRINCIP METODY**

Laktátdehydrogenasa (LD nebo LDH) katalyzuje oxidaci laktátu pomocí  $\text{NAD}^+$  za vzniku pyruvátu a NADH. Katalytická koncentrace se určuje jako míra zvýšení NADH, který se měří spektrofotometricky.

### **REAGENCIE – složení:**

**Reagent (A) :** N-Metyl-D-glukamin 0,406 mol/l, laktát 62,5 mmol/l, pH 9,4

**Reagent (B) :**  $\text{NAD}^+$  50 mmol/l

### **MATERIÁL**

#### **Vzorky**

Studenti se seznámí s principem analýzy na automatickém analyzátoru. Provedou přípravu roztoků reagensů a vzorků kalibrátoru LYO-KAL (BIO-LA-TEST).

Vlastní analýza katalytické koncentrace proběhne za předem definovaných podmínek (inkubace při 37°C v časovém intervalu 3 minuty) na automatickém analyzátoru BS-200 (MEDESA). Aplikaci reagensů a vzorků do kyvet na zásobní roztoky a reagentie provede obsluhující personál analyzátoru. Vlastní analýza proběhne po naprogramování přístroje automaticky. Použitá metoda - kinetické měření v čase. Po uplynutí analýzy si studenti vyvolají uložené výsledky analýzy a uvedou je do protokolu z měření. Využijí přitom kalibraci provedenou ředěním automaticky po nastavení na automatickém analyzátoru.

### **PŘÍPRAVA A PROVEDENÍ**

#### **Příprava pracovního reagentu (R) :**

Kvantitativně přelejte obsah lahvičky B do lahvičky A. Důkladně promíchejte. Menší objemy lze připravit smícháním: 4 ml Reagentu A + 1 ml Reagentu B. Stabilita pracovního reagentu je 3 dny při 2-8°C.

**Připravte jen takové množství pracovního reagentu, které je potřeba na konkrétní počet vašich vzorků pro celou skupinu.**

#### **Referenční hodnoty - člověk:**

**LDH : 132-228 IU/l = 2,20-3,80  $\mu$ kat/l**

**Zvýšení:** u pacientů s jaterním onemocněním, renálními poruchami, infarktem myokardu, s mnoha maligními chorobami, progresivní muskulární dystrofií.