

Návod k praktickému cvičení z biochemie

Téma: Vyšetření jater a pankreatu

1. Stanovení katalytické koncentrace aspartátaminotransferázy (AST)

Reagencie:

Pro stanovení se použije komerční souprava BIOLATEST® AST/GOT 500 (Erba Lachema).

- Pracovní roztok** [(malátdehydrogenáza $\geq 12,5 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$, laktátdehydrogenáza $\geq 66,6 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$, tris-pufr (pH 7,8) $110,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, L-aspartát $340,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pyridoxal-5'-fosfát $120,0 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)]
- Startér** (2-oxoglutarát $85,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, NADH $1,05 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pufr CAPSO $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)
- Sérum** – neznámý vzorek

Pracovní postup:

Startér před analýzou předejdeme alespoň 5 minut na teplotu 37°C .

Kyvety, ve které budeme provádět měření, necháme rovněž alespoň 5 minut vyhřát na 37°C .

Odměřit v ml do kyvety:	Vzorek
Pracovní roztok	0,800
Sérum	0,100
Promícháme a inkubujeme 5–10 minut při 37°C a pak přidáme	
Startér	0,200
Promícháme a inkubujeme 1 minutu při 37°C	

Během jednodominutové inkubace připravíme spektrofotometr k měření nastavením vlnové délky 340 nm a nulové absorbance proti destilované vodě. Po jednodominutové inkubaci změříme absorbanci. Pak pokračujeme v měření absorbancí v jednodominutových intervalech (přesně) po dobu 3 minut v 1 cm kyvetě při vlnové délce 340 nm proti destilované vodě.

Vypočteme průměrný pokles absorbance při 340 nm za minutu (ΔA_{340}).

Katalytickou koncentraci AST vypočítáme

$$S\text{-AST} (\mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}) = \Delta A_{340} \cdot 35,7$$

2. Stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferázy (ALT)

Reagencie:

Pro stanovení je použita komerční souprava BIOLATEST® ALT-UV Liquid (Erba Lachema).

1. **Pracovní roztok** [[laktátdehydrogenáza](#) $\geq 26,6 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$, tris-pufir (pH 7,5) $110,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, [L-alanin](#) $567 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, [pyridoxal-5'-fosfát](#) $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, [2-oxoglutarát](#) $17,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, [NADH](#) $0,21 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$]
3. **Sérum** – neznámý vzorek

Pracovní postup:

Pracovní roztok před analýzou alespoň 5 minut přehřejeme na teplotu 37°C .

Kyvetu, ve které budeme provádět měření, necháme rovněž alespoň 5 minut vyhřát na 37°C .

Odměřit v ml do kyvety:	Vzorek
Pracovní roztok	1,00
Sérum	0,10
Promícháme a inkubujeme 1 minutu při 37°C	

Během jednodominutové inkubace připravíme spektrofotometr k měření nastavením vlnové délky 340 nm a nulové absorbance proti destilované vodě. Po jednodominutové inkubaci změříme absorbanci. Pak pokračujeme v měření absorbancí v jednodominutových intervalech (přesně) po dobu 5 minut v 1 cm kyvetě při vlnové délce 340 nm proti destilované vodě.

Výpočet:

Vypočteme průměrný pokles absorbance při 340 nm za minutu (ΔA_{340}).

Katalytickou koncentraci ALT vypočítáme

$$\text{S-AST } (\mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}) = \Delta A_{340} \cdot 29,08$$

3. Stanovení katalytické koncentrace γ -glutamyltransferázy (GGT)

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava BioSystems Gamma-Glutamyltransferase

1. **Pracovní roztok** ([L- \$\gamma\$ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid](#) 6,5 mmol \cdot l⁻¹ v pufru složeném z [glycylglycinu](#) 165 mmol \cdot l⁻¹ a hydroxidu sodného 104 mmol \cdot l⁻¹, pH 7,9) \diamond

2. **Sérum** – neznámý vzorek

Pracovní postup:

Pracovní roztok a kyvetu předejdeme 5 minut na 37° C. Dále postupujeme podle tabulky.

Do kyvety odměříme v ml	Vzorek
Pracovní roztok \diamond	1,0
Sérum	0,1

Promícháme, inkubujeme přibližně 30 s při 37 °C a pak změříme v 1cm kyvetě proti roztoku dvojchromanu draselného počáteční absorbanci (A_0) při 405 nm. Dále pokračujeme v jednominutových intervalech po dobu 3 minut v odečítání dalších absorbancí (A_1 – A_3).

Výpočet:

Vypočteme průměrný vzestup absorbance při 405 nm za minutu (ΔA_{405}).

Koncentraci katalytické aktivity GGT v séru vypočítáme podler vzorce:

$$\text{GGT } (\mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}) = \Delta A_{405} \cdot 18,52$$

4. Stanovení katalytické koncentrace amylázy v séru (S-AMS)

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava α -amylase-direct (BioSystems)

1. **Pracovní činidlo** (MES 50 mmol · l⁻¹, chlorid vápenatý 5 mmol · l⁻¹, chlorid sodný 300 mmol · l⁻¹, thiokyanát sodný 450 mmol · l⁻¹, 2-chloro-4-nitrofenylmaltotriosid 2,25 mmol · l⁻¹, pH 6,1)
2. **Sérum – neznámý vzorek**
3. **Standard – standardní sérum s aktivitou AMS 3 μ kat · l⁻¹**

Pracovní postup:

Pracovní roztok a kyvetu předejdeme 5 minut na 37 °C. Dále postupujeme podle tabulky.

Odměříme v ml:	Vzorek	Standard	Blank
Pracovní činidlo	0,80	0,80	0,80
Vzorek	0,02	–	–
Standard	–	0,02	–
Destilovaná voda	–	–	0,02

Promícháme, inkubujeme přesně 2 minuty při 37 °C a pak změříme v 1 cm kyvetě proti blanku absorbanci při 405 nm

Výpočet:

$$S\text{-pAMS} = a_{\text{standard}} \cdot A_{\text{vzorek}} / A_{\text{standard}}$$

$$S\text{-pAMS} = 3 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1} \cdot A_{\text{vzorek}} / A_{\text{standard}}$$