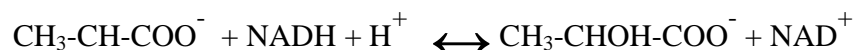


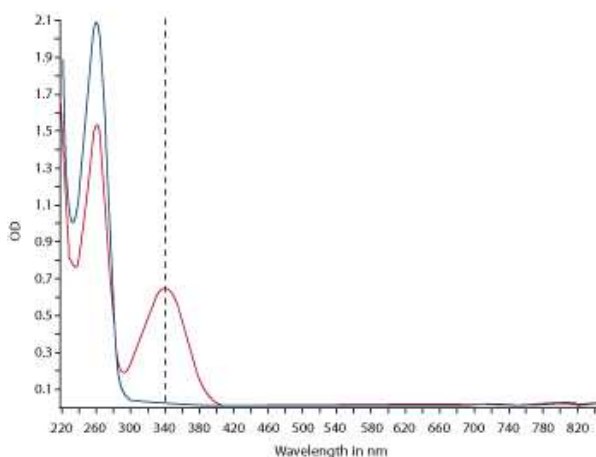
Oznaczenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej

Wprowadzenie

Do klasy oksydoreduktaz należą enzymy katalizujące procesy utleniania i redukcji. Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) katalizuje odwracalną reakcję redukcji pirogronianu do mleczanu, podczas której NADH utlenia się do NAD⁺.



Proces ten można śledzić spektrofotometrycznie z uwagi na to, że forma zredukowana NADH posiada dodatkowe pasmo absorpcji przy 340 nm (Rys 1).



Rys. 1 Widma absorpcyjne NAD⁺ (linia niebieska) i NADH (linia czerwona)

<http://www.bmglabtech.com/application-notes/absorbance/spectrometer-nadh-nadph-170.cfm>

Szybkość reakcji tworzenia się NAD⁺ i mleczanu można śledzić, mierząc zanik pasma absorpcji przy 340 nm tzw. metodą Wróblewskiego. Aktywność dehydrogenazy podaje się w jednostkach Wróblewskiego. Jednostka Wróblewskiego to taka aktywność enzymu w 1 cm³ surowicy, która w temp. 25° C, objętości 3 cm³, przy 340 nm i l=1cm, daje w czasie 1 min zmianę absorbancji NADH o 0,001. W praktyce poprzez porównanie aktywności standardowej LDH z aktywnością uwolnionej do osocza dehydrogenazy mleczanowej można określić przeżywalność komórek.

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest wykonanie praktycznego oznaczenia aktywności dehydrogenazy mleczanowej w surowicy oraz zapoznanie się z metodami pomiaru aktywności enzymów.

Sprzęt i materiały:

- Surowica krwi ludzkiej,
- Zestaw diagnostyczny do oznaczania aktywności dehydrogenazy mleczanowej *Lquick Cor-LDH* - skład:
 - bufor fosforanowy (pH 7.5) 50 mmol/l
 - pirogronian 0,6 mmol/l
 - NADH 0,25 mmol/l
- 6 Probówek typu eppendorf,
- Pipety automatyczne, końcówki do pipet,
- 1 Kuweta polistyrenowa (poj. 800 µl) do pomiarów spektrofotometrycznych (d = 10 mm),
- Wyrząsarka typu Vortex,
- Spektrofotometr UV-Vis SP-830 *PLUS* lub Spectroquant® Pharo 100/300.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Umieścić 1 ml odczynnika do oznaczeń w probówce typu eppendorf.
2. Dodać 20 µl surowicy krwi.
3. Całość dokładnie wymieszać i inkubować 1 min. w temperaturze 25° C.
4. Przenieść 800 µl roztworu do kuwetki.
5. Wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 340 nm wobec wody jako odnośnika (zgodnie z instrukcją obsługi aparatu).
6. Nie wyjmując kuwetki, pomiar powtórzyć co 1 min. w ciągu 10 minut. Wyniki zapisać w tabeli (wzór poniżej).
7. Oznaczenie wykonać 6-krotnie (pkt. od 1-6). UWAGA każdy student wykonuje **3** oznaczenia **SAMODZIELNIE**.

Opracowanie wyników:

1. Obliczyć średnią zmianę absorbancji na minutę ($\Delta A/\text{min.}$) osobno dla każdego oznaczenia.
2. Obliczyć aktywność fosfatazy alkalicznej osobno dla każdego oznaczenia:
aktywność LDH [U/l]= $\Delta A/\text{min.} \times F$,
gdzie przyjmujemy $F = 8095$.
3. Wynik uśrednić oraz obliczyć odchylenie standardowe.
4. Wykreślić krzywą obrazującą aktywność dehydrogenazy w czasie, odkładając na osi Y absorbancję (średnią) a na osi X, czas pomiaru (min).

WARTOŚCI PRAWIŁOWE

dorośli	120 – 240 U/l (25 °C)
	225 – 450 U/l (37 °C)

Zalecane jest opracowanie przez każde laboratorium własnych zakresów wartości prawidłowych charakterystycznych dla lokalnej populacji.

Literatura uzupełniająca:

1. L. Stryer *Biochemia*
2. W. Szczepaniak *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*
3. pod red. T. Bililńskiego i G. Bartosza *Ćwiczenia – Podstawy biofizyki, chemia fizyczna, biochemia, enzymologia, biologia komórki*

Zagadnienia:

1. Spektrofotometria UV-Vis (prawa absorpcji, odchylenia od tych praw, aparatura, analiza ilościowa).
2. Enzymy - energia aktywacji, oksyreduktazy, hydroliza, metody pomiaru aktywności enzymów, standardowe jednostki aktywności enzymów, jednostka Wróblewskiego.
3. Opracowanie wyników i ich ocena statystyczna.

Tabela

	Pomiar 1		Pomiar 2		Pomiar 3		Pomiar 4		Pomiar 5		Pomiar 6	
CZAS [min]	A	ΔA / min.	A	ΔA / min.	A	ΔA / min.	A	ΔA / min.	A	ΔA / min.	A	ΔA / min.
start		-----		-----		-----		-----		-----		-----
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
$\Delta A_{\text{sr}}/\text{min.}$												
Aktywność [U/l]												