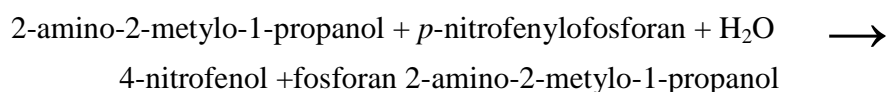


Oznaczenie aktywności fosfatazy alkalicznej w surowicy z udziałem *p*-nitrofenylofosforanu

Wprowadzenie

Hydrolazy to klasa enzymów katalizujących reakcje rozbijania wiązań z udziałem wody. Mogą to być wiązania estrowe, glikozydowe lub peptydowe. Fosfataza alkaliczna jak i kwasowa katalizują reakcje odszczepienia reszty fosforanowej od różnego typu związków. Stąd aktywność fosfataz mierzy się ilością uwolnionego nieorganicznego fosforu lub ilością uwolnionej reszty organicznej estru fosforanowego, po inkubacji enzymu z substratem w określonych warunkach.

W metodzie Besseya i Lowry'ego oznacza się spektrofotometrycznie stężenie *p*-nitrofenolu (po zalkalizowaniu próbki), uwolnionego w wyniku enzymatycznej hydrolizy *p*-nitrofenylofosforanu:



Aktywność fosfataz podaje się w jednostkach Besseya oznaczających liczbę milimoli *p*-nitrofenolu uwolnionego przez enzym w 1000 cm³ surowicy, w ciągu 1 godz. inkubacji w warunkach metody lub standardowych jednostkach aktywności enzymów (U/l) oznaczających taką ilość enzymu, która katalizuje przemianę jednego μmola substratu w ciągu jednej minuty w temperaturze 30°C w optymalnych warunkach.

W praktyce szpitalnej oznaczenie aktywności fosfatazy alkalicznej jest istotne ze względu na fakt, iż enzym ten jest obecny w wątrobie, jak i nerkach oraz prostaty. W szczególności zwiększony poziom aktywności tego enzymu może wskazywać na poważne uszkodzenie wątroby, co może być wynikiem nadużywania alkoholu, jak i długotrwałej terapii farmakologicznej.

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest poznanie jednej z metod analitycznych stosowanych do określenia prawidłowości funkcjonowania wątroby w organizmie, czyli de facto oznaczenie aktywności fosfatazy alkalicznej w surowicy metodą spektrofotometryczną.

Sprzęt i materiały:

- Surowica krwi ludzkiej,
- Odczynnik do oznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej
Liquick Cor-ALP – skład:
 - 2-amino-2-metylo-1-propanol (AMP) 350 mmol/l
 - Mg²⁺ 2,0 mmol/l
 - Zn²⁺ 1,0 mmol/l
 - HEDTA 2,0 mmol/l
 - *p*-nitrofenylofosforan 16,0 mmol/l
- 7 Probówek typu eppendorf
- Pipety automatyczne, końcówki do pipet,
- 1 Kuweta polistyrenowa (poj. 800 µl) do pomiarów spektrofotometrycznych (d = 10 mm),
- Wytrząsarka 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 37° C.
4. Przenieść 800 µl roztworu do kuwetki.
5. Wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 405 nm wobec wody (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:

$$\text{aktywność ALP [U/l]} = \Delta A/\text{min.} \times F,$$

gdzie przyjmujemy $F = 2764$.

3. Wynik uśrednić oraz obliczyć odchylenie standardowe.

WARTOŚCI PRAWDŁOWE

Kobiety	20 – 50 lat	42 – 98 U/l (37 °C)
	60 lat i powyżej	53 – 141 U/l (37 °C)
Mężczyźni	20 – 50 lat	53 – 128 U/l (37 °C)
	60 lat i powyżej	56 – 119 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, fosfatazy, hydroliza, metody pomiaru aktywności enzymów, standardowe jednostki aktywności enzymów, jednostka Besseya.

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												
$\Delta A_{\text{śr}}/\text{min.}$												
Aktywność [U/I]												