

Univerzita Komenského Bratislava, Lekárska fakulta
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie

LABORATÓRNY PROTOKOL BMF-LS - 03. seminár
Stanovenie aktivity enzýmu laktátdehydrogenázy

Meno, krúžok:	Dátum:
---------------	--------

Roztoky:

1. reakčná zmes: fenantrolín + FeCl₃ v tlmivom roztoku pH=7,0
2. substrát: 5 mmol.l⁻¹ laktát sodný
3. séra: (riedené 10x)
4. deproteinizačné činidlo: 10% kyselina trichlóroctová (TCA)

Princíp:

Laktát sa oxiduje na pyruvát a vodíky sa prenášajú na NAD⁺ a vzniká NADH+H⁺. Umelým akceptorom elektrónov z NADH+H⁺ je ferifenantrolínový komplex (Fe³⁺), ktorý sa redukuje na ferofenantrolín (Fe²⁺). Vzniknutý ferofenantrolín je červený a intenzita červeného sfarbenia je úmerná aktivite LD.

Postup stanovenia:

vzorka	A	B	C	slepá vzorka
reakčná zmes	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
substrát (laktát)	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
sérum A (riedené 1:10)	0,5 ml	---	---	---
sérum B (riedené 1:10)	---	0,5 ml	---	---
sérum C (riedené 1:10)	---	---	0,5 ml	---
voda	---	---	---	0,5 ml
Necháme stáť 10 minút pri laboratórnej teplote.				
TCA (na zastavenie reakcie)	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Absorbanciu vzoriek zmeriame pri 510 nm voči slepej vzorke.				

Výpočet:

vzorka	A	B	C
absorbancia			
μmol z kalibračnej krivky			
μmol/l			
μkat/l			
zohľadnenie riedenia			

Referenčné hodnoty LD v sére: 4,2 – 6,0 μkat/l

Záver: