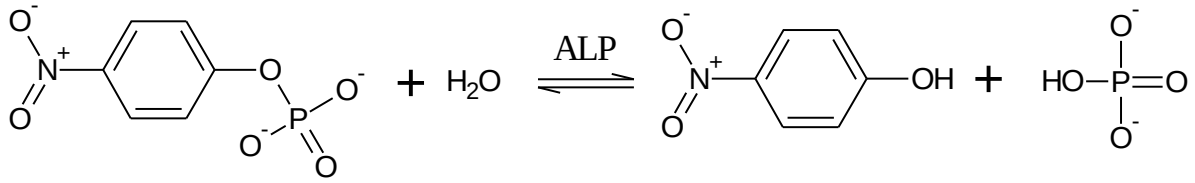
ALKALICKÁ FOSFATÁZA

Princip:

Alkalická fosfatáza (E.C. 3.1.3.1. – ALP) štěpí 4-nitrofenylfosfát v prostředí N-metyl-1-D-glukaminového pufru na 4-nitrofenol a fosfát. Enzymová aktivita je úměrná zvýšení koncentrace 4-nitrofenolu, která může být změřená metodou konstantního času s využitím inhibitoru blokujícího aktivní centrum enzymu.



Reagencie:

- substrát: 92 mM 4-nitrofenylfosfát
- pufr: 0.43 M N-metyl-D-glukamin
- inhibitor: chelaton III, NaOH

Postup:

Zkumavka	**vzorek**	**blank**
Pufr (ml)	2.00	2.00
Sérum (µl)	40	–
Smíchejte a inkubujte 5 minut při teplotě 37 ˚C. Pak přidejte:		
Substrát (ml)	0.4	0.4
Smíchejte a inkubujte přesně 10 minut při teplotě 37˚C. Pak přidejte:		
Inhibitor (ml)	1.0	1.0
sérum (µl)	–	40

Obě analyzované vzorky dobře promíchejte a měřte absorbance roztoků při vlnové délce 405 nm.

Výpočet:

Aktivita (µkat/l) = 7.96 x (A_{vzorek} – A_{blank})

Referenční hodnoty:

- Muži: 0.9–2.3 μkat/l
- Ženy: 0.74–2.1 μkat/l
- Děti (do 14 let): 1.2–6.3 μkat/l

γ-GLUTAMYLTRANSFERÁZA

Princip:

Enzym katalyzuje přenos γ-glutamylové skupiny z L-glutamyl-3-karboxy-p-nitroanilidu na glycylglycin. V průběhu reakce se uvolní ekvivalentní množství 5-amino-2-nitrobenzoátu, které je úměrné aktivitě enzymu. Spektrofotometrické stanovení provádíme při konstantní vlnové délce 410 nm.

Reagencie:

- Činidlo: 6.5 mM γ-glutamyl-3-karboxy-p-nitroanilid
- 165 mM glycylglycin

Postup:
Do kyvety pipetujte:

Činidlo (37°C)	1 ml
Nastavte spektrofotometr, připravte si stopky a pak přidejte:	
Sérum	100 µl

IHNED smíchejte, vložte kyvetu do spektrofotometru (λ = 410 nm) a zaznamenejte:

- Počáteční absorbanci vzorku
- Absorbance v minutových intervalech po dobu 3 minut (použijte stopky)

Výpočet:
Vypočítejte změny (diference) naměřených absorbancí a průměrnou diferenci za minutu (∆A/min). Aktivitu enzymu počítejte podle vztahu:

Aktivita (µkat/l) = 23.19 x (∆A/min)

Referenční hodnoty:

- Muži: 0.25–1.77 µkat/l
- Ženy: 0.17–1.1 µkat/l