

ZAGADNIENIA DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z ENZYMOLOGII I CHEMII BIAŁEK DLA STUDENTÓW III ROKU BIOTECHNOLOGII MEDYCZNEJ I st.

Ćwiczenie 3. TEST WARBURGA (NAD⁺/NADH+H⁺) W PRAKTYCE KLINICZNEJ. PRZYKŁADY KONKRETNÝCH TESTÓW DIAGNOSTYCZNYCH WYKORZYSTUJĄCYCH TEST WARBURGA

Zagadnienia do ćwiczenia:

1. Klasyfikacja i nomenklatura enzymów wg Międzynarodowej Unii Biochemicznej.
2. Holoenzym, apoenzym, koenzym, grupa prostetyczna, kofaktor – definicje pojęć, funkcje w katalizie, centrum aktywne.
3. Jednostki aktywności enzymatycznej
4. Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznej
5. Spektrofotometryczny pomiar aktywności enzymów
6. Koenzymy nikotynamidoadeninowe – budowa chemiczna, funkcja, przykłady reakcji.
7. Flawinowe grupy prostetyczne – budowa chemiczna, funkcja, przykłady reakcji.
8. Fosforan pirydoksalu – budowa chemiczna, funkcja, przykłady reakcji.

1. Charakterystyka spektralna NAD⁺ i NADH+H⁺

Aktywność dehydrogenaz zależnych od NAD⁺, które odbierają elektrony substratom, można obserwować spektrofotometrycznie. Podczas redukcji pojawia się dodatkowe pasmo absorpcji NADH przy 340 nm, będące następstwem redukcji aromatycznego pierścienia pirydynowego.

Wykonanie

Wykonać widmo absorpcyjne roztworów NAD⁺ i NADH+H⁺ w zakresie 240–400 nm.

Sprawozdanie

Na widmie wyznaczyć długości fal, przy których występują maksima absorpcji (λ_{\max}) dla obydwu form powyższego koenzymu.

2. Zastosowanie testu optycznego prostego Warburga do oznaczania aktywności dehydrogenazy mleczanowej

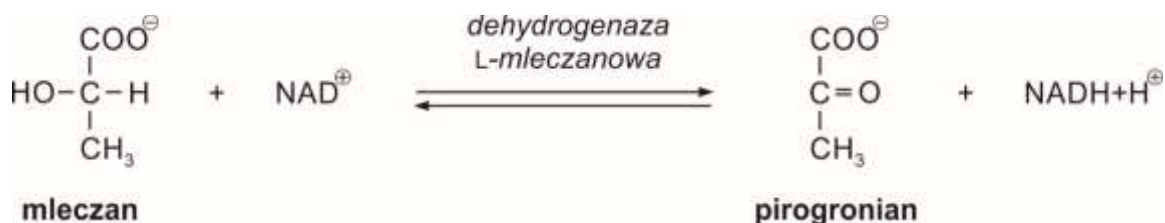
Dehydrogenaza mleczanowa (ang. lactate dehydrogenase, LDH, EC 1.1.1.27) jest enzymem cytozolowym katalizującym odwracalną reakcję utleniania mleczanu do pirogronianu z udziałem koenzymu NAD⁺ w procesie glikolizy beztlenowej.

Enzym ten występuje w różnych organizmach (bakterie, pierwotniaki, rośliny i zwierzętach). W organizmie człowieka jest obecny we wszystkich tkankach, dlatego jego aktywność może być podwyższona w przebiegu różnych chorób. LDH występuje w postaci 5 izoenzymów różniących się składem podjednostkowym, spośród których LDH1 jest zlokalizowana głównie w mięśniu sercowym, a LDH5 w mięśniach szkieletowych i wątrobie. Formy pośrednie są związane z innymi narządami takimi jak mózg i nerki. W diagnostyce laboratoryjnej ma znaczenie zarówno pomiar całkowitej aktywności dehydrogenazy mleczanowej, jak i jej poszczególnych izoenzymów (np. w diagnostyce zawału mięśnia

sercowego czy zawału płuca). Pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (tzw. test LDH) jest również wykorzystywany w badaniach cytotoksycznego działania związków w warunkach *in vitro*.

Zasada oznaczenia

Zasada oznaczenia aktywności dehydrogenazy mleczanowej metodą **testu optycznego Warburga prostego** oparta jest na reakcji utleniania L-mleczanu do pirogronianu, czemu towarzyszy redukcja koenzymu NAD⁺ do NADH+H⁺. Powstaniu NADH towarzyszy wzrost absorbancji przy długości fali 340 nm, który jest proporcjonalny do aktywności LDH.



Wykonanie

1. Odmierzyć do próbówki 1 ml odczynnika* i ogrzać do temperatury 37°C przez 5 minut w temperaturze 37°C.
2. Wyzerować spektrofotometr wobec wody przy długości fali 340 nm.
3. Do odczynnika dodać 50 µl surowicy, zamieszać i inkubować 30 sekund.
4. Próbę badaną przenieść do kuwety i zmierzyć absorbancję.
5. Ponownych pomiarów absorbancji dokonać w odstępach jednoninutowych przez 2 minuty.
6. Obliczyć średnią różnicę absorbancji na 1 minutę ($\Delta\text{abs}/\text{min}$).
7. Obliczyć aktywność dehydrogenazy mleczanowej w surowicy wykorzystując wzór umieszczony poniżej

$$\text{IU/l} = \frac{\Delta\text{abs}/\text{min} \times 1,050 \times 1000}{1 \times 6,22 \times 0,05} = \Delta\text{abs}/\text{min} \times 3376$$

1,050 – objętość całkowita

1000 – zamiana IU/ml na IU/l

6,22 – współczynnik absorbancji milimolowej NADH

0,05 – objętość próbki

1 – długość drogi optycznej

8. Określić czy aktywność enzymu w badanych próbkach mieści się w zakresie wartości prawidłowych

* Odczynnik zawiera NAD⁺, L-mleczan, bufor

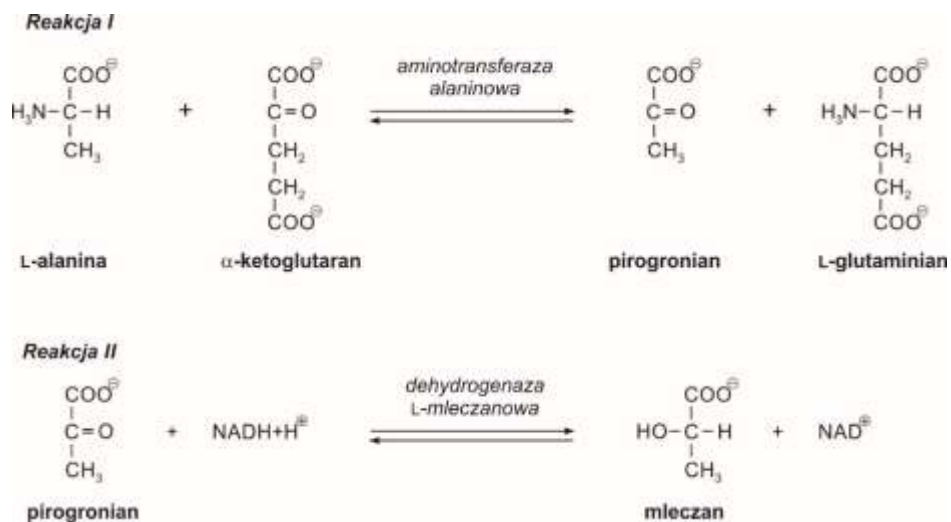
3. Zastosowanie testu optycznego prostego z reakcją wskaźnikową do oznaczenia aktywności aminotransferazy alaninowej

Aminotransferaza alaninowa (ALT, EC 2.6.1.2.) i aminotransferaza asparaginianowa (AST, EC 2.6.1.1.) są enzymami uczestniczącymi w metabolizmie aminokwasów. Katalizują odwracalne reakcje, w wyniku których następuje przeniesienie grupy aminowej z aminokwasu na α -ketokwas, a produktami tej reakcji są nowy ketokwas i nowy aminokwas. Kofaktorem tych aminotransferaz jest

fosforan pirydoksalu. Aminotransferazy występują przede wszystkim w wątrobie, mięśniach i mózgu. Nie są one wydzielane do krwi, dlatego też u zdrowego człowieka ich aktywność w osoczu jest znikoma. Do wzrostu aktywności aminotransferaz we krwi dochodzi w wyniku uszkodzenia komórek wątroby lub innego narządu i jest on proporcjonalny do stopnia i rozległości uszkodzenia. Wysoką aktywność aminotransferaz stwierdza się m. in. u chorych z zawałem serca, marskością wątroby, dystrofią mięśniową czy wirusowym zapaleniem wątroby. Pomiar aktywności aminotransferaz jest rutynowo wykorzystywany w diagnostyce medycznej.

Zasada oznaczenia

Oznaczenie aktywności aminotransferazy alaninowej opiera się na wykorzystaniu **testu optycznego Warburga z reakcją wskaźnikową**, co pozwala na pomiar aktywności enzymów, których substraty i produkty nie absorbują światła. Aktywność tą oznacza się przez sprzężenie katalizowanej przez ALT reakcji (reakcja I) z reakcją wskaźnikową katalizowaną przez dehydrogenazę mleczanową, w której uczestniczy koenzym NAD^+ (reakcja II). Szybkość obniżania się wartości absorbancji przy $\lambda = 340 \text{ nm}$ spowodowana utlenieniem $\text{NADH} + \text{H}^+$ do NAD^+ jest proporcjonalna do szybkości powstawania pirogronianu w reakcji katalizowanej przez aminotransferazę alaninową, a tym samym do aktywności tego enzymu.



Wykonanie

1. Odmierzyć do próbówki 1 ml odczynnika i ogrzać do temperatury 37°C przez 5 minut.
2. Wyzerować spektrofotometr wobec wody przy długości fali 340 nm.
3. Do odczynnika dodać 100 μl surowicy, zamieszać i inkubować 30 sekund w temperaturze 37°C .
4. Próbę badaną przenieść do kuwety i zmierzyć absorbancję.
5. Ponownych pomiarów absorbancji dokonać w odstępach jednonumitowych przez 2 minuty.
6. Obliczyć średnią różnicę absorbancji na 1 minutę ($\Delta\text{abs}/\text{min}$).
7. Obliczyć aktywność dehydrogenazy mleczanowej w surowicy wykorzystując wzór umieszczony poniżej

$$\text{IU/l} = \frac{\Delta\text{abs}/\text{min} \times 1,1 \times 1000}{1 \times 6,22 \times 0,15} = \Delta\text{abs}/\text{min} \times 1768$$

1,1 – objętość całkowita

1000 – zamiana IU/ml na IU/l

6,22 – współczynnik absorbancji milimolowej NADH

- 0,1 – objętość próbki
1 – długość drogi optycznej

8. Określić czy aktywność enzymu w badanych próbkach mieści się w zakresie wartości prawidłowych

* Odczynnik zawiera NADH+H⁺, L-alaninę, α-ketoglutaran, LDH, bufor

4. Zastosowanie testu optycznego prostego z reakcją wskaźnikową do ilościowego oznaczenia glukozy metodą heksokinazową

Zasada oznaczenia

Oznaczenie stężenia glukozy metodą heksokinazową opiera się na wykorzystaniu **testu optycznego Warburga z reakcją wskaźnikową**. Glukoza w obecności heksokinazy ulega fosforylacji przy udziale ATP do glukozy-6-fosforanu, który w kolejnej reakcji jest utleniany do 6-fosfoglukonianu przy jednoczesnej redukcji NADP⁺ do NADPH+H⁺. Powstaniu NADPH towarzyszy wzrost absorbancji przy długości fali 340 nm, który jest proporcjonalny do stężenia glukozy w badanym materiale. Metoda ta pozwala oznaczyć jej stężenie w surowicy krwi, osoczu i moczu.



Wykonanie

1. Do trzech próbek wprowadzić 1 ml odczynnika i ogrzać do temperatury 37°C przez 5 minut.
2. Wyzerować spektrofotometr wobec wody przy długości fali 340 nm.
3. Do trzech opisanych próbek dodać składniki mieszanin reakcyjnych zgodnie z informacją podaną w tabeli poniżej i inkubować 3 min w temp. 37°C.

Komponenty układów reakcyjnych	Próba badana [ml]	Próba wzorcowa [ml]	Próba ślepa odczynnikowa [ml]
Odczynnik*	1	1	1
Surowica	0,01	-	-
Wzorzec	-	0,01	-
Woda destylowana	-	-	0,01

*odczynnik zawiera ATP, NAD⁺, heksokinazę drożdżową, dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową mikrobiologiczną

4. Zmierzyć absorbancję próby badanej oraz wzorca względem próby odniesienia przy długości fali 340 nm. Absorbancja jest stabilna przez 15 min.
5. Obliczyć stężenie glukozy (C_{glukozy}) w materiale biologicznym wykorzystując wzór umieszczony poniżej

$$C_{\text{glukozy}} [\text{mg/dl}] = \frac{A_{\text{próbki}} - A_{\text{ślepa}}}{A_{\text{wzorca}} - A_{\text{ślepa}}} \cdot C_{\text{wzorca}}$$

6. Określić czy aktywność enzymu w badanych próbkach mieści się w zakresie wartości prawidłowych.