

Elektroforetické stanovení isoenzymů laktátdehydrogenasy

Roman Kand'ár



- Prvně, co jsou to **isoenzymy**
 - Nejjednodušeji řečeno: katalyzují stejnou reakci, ale mají odlišnou strukturu
 - Protože mají jinou strukturu, dají se jednotlivé isoenzymy rozlišit separačními metodami, například elektroforesou
 - Často bývají orgánově specifické, a to je pro diagnostiku velmi významné
 - Takže něco k isoenzymům laktátdehydrogenasy
 - Tetramer složený z podjednotek H a M
 - LD1 (H₄): myokard, erytrocyty
 - LD2 (H₃M): RES
 - LD3 (H₂M₂): plíce
 - LD4 (HM₃): ledviny, placenta, pankreas
 - LD5 (M₄): játra, kosterní sval
- » Jestliže naměříme zvýšenou katalytickou koncentraci celkové LD a poté zjistíme, že procentuálně toto zvýšení odpovídá hlavně LD1, pak je pravděpodobně problém se srdcem

- **Nyní k vlastnímu elektroforetickému stanovení isoenzymů LD**
- **Pro stanovení použijeme komerční set od firmy SEBIA**

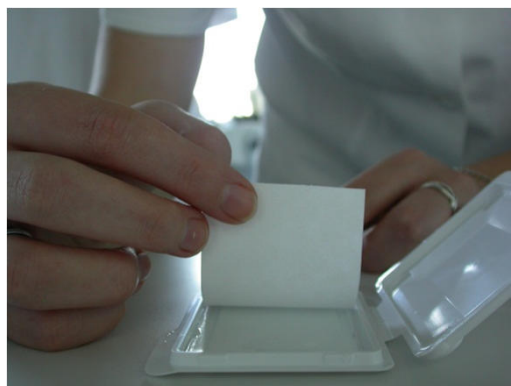


- **Tak vypadá set**
 - **Krabice s gely a lahvíčkami s chemikáliemi**
- **K dispozici budete mít návod, zde vám nabízíme jednoduchý postup doprovázený ilustračními fotografiemi**

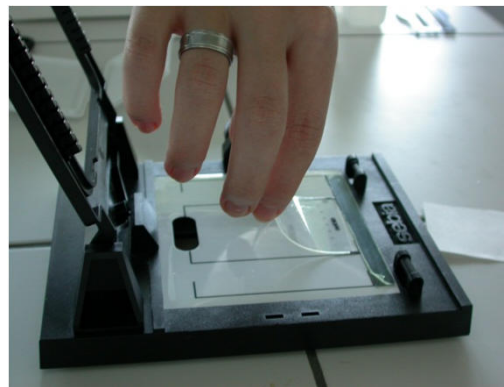
- **Vyjměte gel**



- Gel musíte vyjmout opatrně tak, aniž se vrstvy gelu (ta popsaná část) dotknete
- Nyní odsajete přebytečný uchovávací roztok (filtračním papírem, tzv. „kolébkovým“ způsobem). Filtrační papír přiložte na gel jen na krátkou dobu (několik sekund, až „zmokvá“)



- Do spodní třetiny nosiče aplikátoru vzorků naneste 120 μ l deionizované vody (bez bublin, formou čáry) a umístěte gel tak, aby pod ním nebyly bubliny



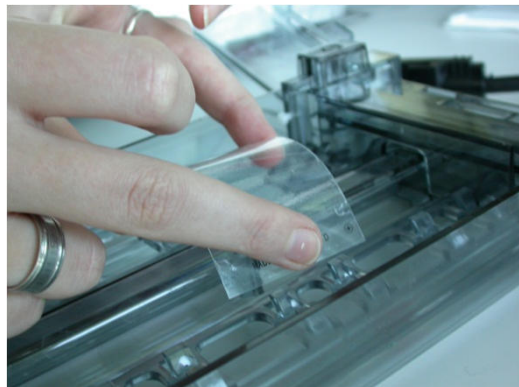
- Aplikujte 10 μ l jednotlivých vzorků sér do jamek aplikátoru vzorků během 2 minut (použijte tzv. „reverzní“ způsob pipetování)



- **Odlomte spodní rámeček aplikátoru vzorků a vložte aplikátor do nosiče aplikátoru vzorků (pozice 6, čísla musejí směřovat k vám)**



- **Opatrně spusťte aplikátor vzorků na gel tak, aby se „hřebínek“ pouze opatrně dotkl gelu (nesmíte gel „prorazit“ !) a nechte sérum difundovat do gelu přesně 5 minut**
- **Poté umístěte gel do elektroforetické vany**
- **Polarity musí souhlasit a gelem dolů (ta část, kde jsou naneseny vzorky)**



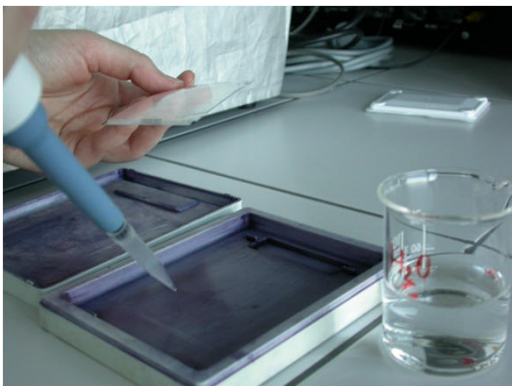
- **Propojte elektroforetickou vanu se zdrojem**
 - **Podmínky migrace: $t = 25$ minut; $U = 80$ mV; $I \approx 10$ mA**
 - **Příprava pufru: 30 ml koncentrátu + 270 ml deionizované vody**
 - **Do každé komory elektroforetické vany po 150-ti ml pufru**



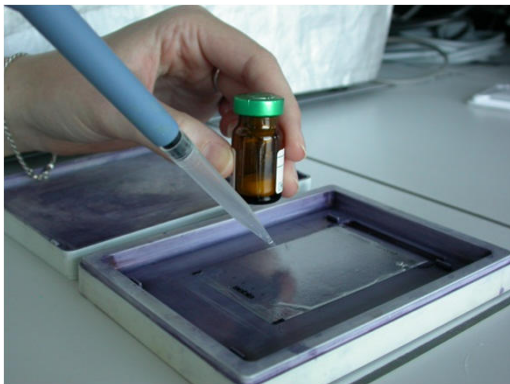
- **Asi 5 minut před ukončením migrace si připravte roztok substrátu (do lahvičky s lyofilizovaným substrátem přidejte 2 ml roztoku pro substrát). Opatrně promíchejte několikerým otočením lahvičky (roztok nesmí zpěnit !)**



- **Po ukončení migrace umístěte gel do inkubační misky**
 - **Do spodní třetiny naneste 120 μ l deionizované vody (bez bublin, formou čáry) a umístěte gel tak, aby pod ním nebyly bubliny**

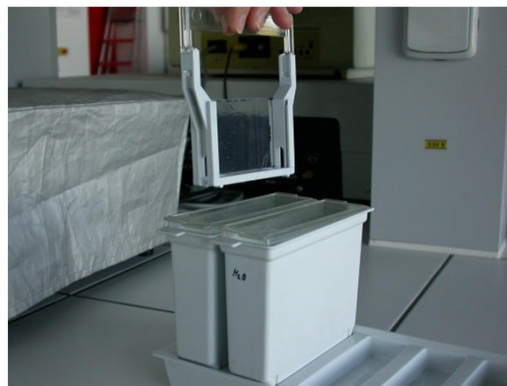
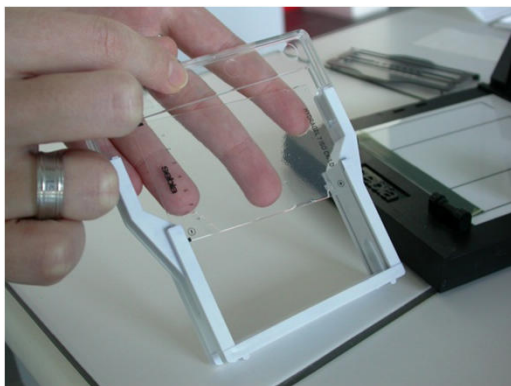


- Na gel opatrně aplikujte roztok substrátu (nejlépe pipetou)

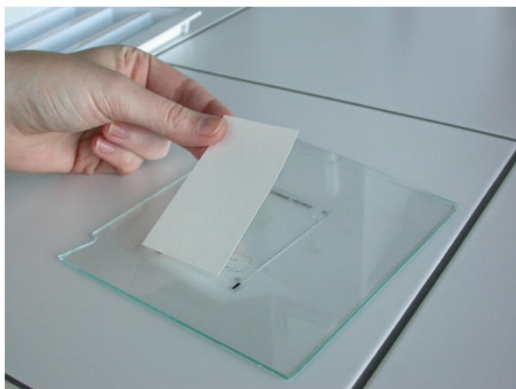


- Přikryjte filtračním papírem, uzavřete misku a nechte inkubovat v termostatu (51 °C, 30 minut)

- Po inkubaci sejměte víko a nechte vytemperovat při pokojové teplotě (asi 5 minut)
- Opatrně stáhněte filtrační papír a vložte na 5 minut do „zastavovacího“ roztoku (tma)
 - Příprava: 3 ml zásobního roztoku + 300 ml deionizované vody
- Pak vložte na 1 minutu do deionizované vody (tma)



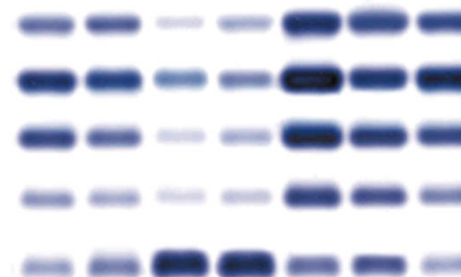
- **Lisování gelu**
 - **Gel položte na skleněnou desku, přikryjte prvně tenkým filtračním papírem, poté silným filtračním papírem a nakonec 1-kg závažím**
 - **Nechte lisovat 10 minut**



- **Gel usušte (80 °C)**
- **Nakonec vyhodnoťte denzitometricky**
 - Jak pracovat s denzitometrem, vám bude sděleno při laboratorním cvičení



HYDRAGEL 7 ISO CK/LD



1 2 3 4 5 6 7

sebia