

[Akceptuje](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal](#) [Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

[zapisz się](#)



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Wybrane metody oznaczania aktywności fosfataz (fosfataza kwasowa i zasadowa)

Fosfatazy są enzymami należącymi do klasy hydrolaz, których funkcja polega na hydrolizowaniu estrów kwasu fosforowego, a dzięki temu na uwalnianiu fosforu nieorganicznego (Pi) ze związków organicznych. Enzymy te są szeroko rozpowszechnione w organizmie, w wysokich stężeniach obecne są w kościach, jelitach, nerkach, wątrobie i łożysku. Stężenie enzymu (normalnie występującego w osoczu) uzależnione jest przede wszystkim od wątroby i jelit oraz w niewielkim stopniu od kości. Wzrost aktywności fosfatazy zasadowej w surowicy jest ważnym wskaźnikiem zaburzeń wątroby i dróg żółciowych lub kości [1], [5].

Fosfataza alkaliczna ALP jest enzymem szeroko rozpowszechnionym w organizmie ludzkim: u dorosłych częściowo pochodzi z wątroby (frakcja termostabilna) i częściowo z kości, RES i układu naczyniowego (frakcja termolabilna). Dzięki temu też wyróżniane są jej różne izoenzymy. Aktywność osoczowa frakcji kostnej fosfatazy alkalicznej w normalnych warunkach osiąga maksymalne wartości u dzieci w trakcie ich wzrostu (do trzykrotnej wartości poziomu organizmu dorosłego), w związku z tym izoenzym ten występuje również w osteoblastach (komórkach związanych z procesem formowania kości i wbudowywania wapnia). Pod koniec pierwszego trymestru ciąży zauważa się wzrost produkcji enzymu, co jest reakcją fizjologiczną związaną ze wzrostem izoenzymu łożyskowego, który osiąga najwyższy poziom w tym okresie (ok. dwukrotnie ponad normę).

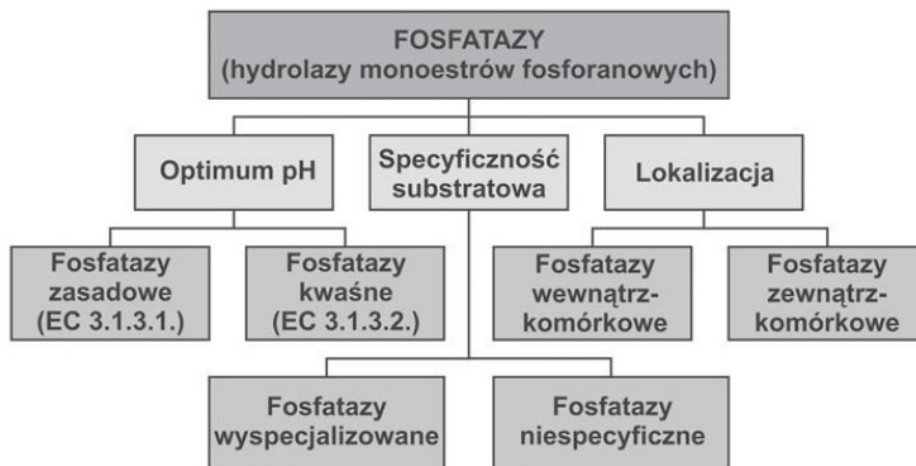
Niestety, oprócz wartości fizjologicznych, rozróżnia się także patologie związane z podniesieniem się aktywności surowiczej fosfatazy alkalicznej, wśród których diagnozuje się m.in.: przerzuty nowotworowe do kości i wątroby (produkujące enzymy), żółtaczkę zewnątrz i wewnątrzwątrobową, zespoły upośledzonego wchłaniania z nadżerkami i wrzodami błony śluzowej czy uszkodzenia w procesach zdrowienia takich jak: ostry zawał mięśnia sercowego, płuc czy nerek [13].

Wszystkie fosfatazy podzielono na 3 główne grupy, wyszczególnione ze względu na ilość wiązań estrowych danego substratu:

- fosfomonoesterazy (określane również jako hydrolazy monoestrów fosforanowych)
- fosfodiesterazy (hydrolazy diestrów fosforanowych)
- fosfotriesterazy (hydrolazy triestrów fosforanowych) [1].

Ponadto, w zależności od pH działania, enzymy podzielono na kwaśne fosfomonoesterazy (kwaśne fosfatazy) oraz alkaliczne fosfomonoesterazy (alkaliczne fosfatazy). Fosfatazy kwaśne wykazują maksimum działania przy pH=4 - 6, zaś zasadowe mają optimum pH w granicach 8-10 [1].

Ze względu na lokalizację wyróżnia się fosfatazy wewnątrzkomórkowe oraz zewnątrzkomórkowe (tzw. fosfatazy sekrecyjne). Fosfatazy wewnątrzkomórkowe uczestniczą w remobilizacji Pi ze źródeł wewnętrznych. Występują one zarówno w wegetatywnych, jak i generatywnych organach roślin (głównie w wakuolach). Fosfatazy sekrecyjne uczestniczą w pozyskiwaniu fosforu z podłoża [1].



Zdjęcie: Podział fosfataz [1].

Oznaczanie aktywności fosfataz

Do określania aktywności tych enzymów wykorzystuje się zazwyczaj syntetycznie otrzymane substraty, a wśród nich najczęściej są to: α i β -glicerofosforan, fenylofosforan, p-nitrofenylofosforan czy ester fosforowy fenoloftaleiny. Aktywność mierzy się na podstawie obserwacji dwóch typów, tj.:

1) ilością uwolnionego nieorganicznego fosforu lub

2) ilością uwolnionej reszty organicznej estru fosforanowego po inkubacji enzymu z substratem, a cała reakcja przeprowadzana jest w ściśle określonych warunkach. Zastosowanie tej metody uzależnione jest od budowy chemicznej związku. Fenol oznaczany jest z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteu, z kolei fenoloftaleinę i p-nitrofenol - po zalkalizowaniu próbki, zaś np. naftol oznaczany jest kolorymetrycznie po sprzęgnięciu z solą diazoniową na barwnik diazowy [3].

Sole diazoniowe powstają w reakcji amin aromatycznych z kwasem azotowym. Stałe sole diazoniowe są bardzo niebezpieczne, wybuchowe, a niektóre z nich są również kancerogenne. Reakcja diazowania przebiega w środowisku kwaśnym, tak więc amina, która bierze udział w takiej reakcji ulega rozpuszczeniu w roztworze kwasu solnego lub kwasu siarkowego, a następnie tworzy chlorowodorek lub siarczan. Reakcja taka przebiega według wzoru: $C_6H_5N_2^+ + H_2O \rightarrow C_6H_5OH + N_{2(g)} + H^+$ [2], [3].

Otrzymywanie soli diazoniowych

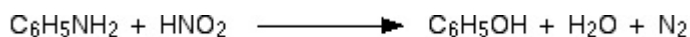
Sole diazoniowe powstają w reakcji fenyloaminy (znannej również jako anilina lub aminobenzen) z kwasem azotowym - zwłaszcza w reakcji w temperaturze poniżej 5°C.



Kwas azotowy ulega bardzo szybko rozkładowi. W przypadku reakcji z fenyloaminą, fenyloamina najpierw ulega rozpuszczeniu w kwasie solnym, a następnie dodaje się roztwór azotynu sodu lub azotyn potasu. W reakcji między kwasem solnym i jonami azotowymi powstaje kwas azotowy. Fenyloaminy reagują z kwasem azotowym w różny sposób, w zależności od temperatury reakcji [4].

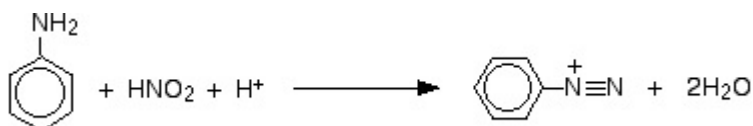
Reakcja z ogrzewaniem mieszaniny

Jeżeli mieszaninę ogrzewa się, można uzyskać czarny oleisty produkt zawierający między innymi fenol i wydzielając się (w postaci gazu) azot:



Reakcja w niskich temperaturach

Wszystkie roztwory należy ochłodzić w zlewkach z lodem tj.: roztwór fenyloaminy z kwasem solnym (chlorek fenyloaminy) oraz roztwór azotynu sodu lub potasu (przechowywany w tych samych warunkach). Następnie, ochłodzony roztwór azotynu dodaje się do roztworu chlorku fenyloaminy, w taki sposób by temperatura roztworów nie wzrosła powyżej 5°C. W wyniku reakcji powstaje chlorek benzenodiazoniowy.



Jon dodatni zawierający grupę $-N_2^+$ znany jest jako jon diazoniowy. Część nazwy „azo” odnosi się do azotu [4].

Mechanizm działania fosfataz

Proces działania enzymów jest dobrze poznany, dzięki czemu wiadomo, że polega on na sekwencyjnym uwalnianiu produktów hydrolizy monoestrów fosforanowych. W trakcie reakcji pierwszy uwalniany jest produkt alkoholowy, który albo nie wykazuje hamowania aktywności enzymów, albo jest to hamowanie niekompetycyjne. Jako końcowy produkt reakcji uwalniany jest fosfor (P_i), który hamuje enzym kompetycyjnie. Aktywność kwaśnych fosfataz może być stymulowana dwuwartościowymi kationami metali, takimi jak: Ni^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Hamowanie aktywności enzymów zachodzi w obecności jonów metali ciężkich czy związków takich jak: arsenian, molibdenian, winian bądź szczawian [1].

Zestaw do pomiaru aktywności fosfatazy kwasowej (King & King's Method (King, P.R.M & King, E.J. Clin Path 7.322.), M/s Excel Diagnostics, procedura pochodząca ze strony: <http://exceldiag.com/catalogs/10003.pdf>)).

Do określania aktywności fosfatazy kwasowej można wykorzystać kilka różnych substratów np.: p-nitrofenylofosforan. W metodzie King'a wykorzystuje się fenylfosforan disodowy, który jest hydrolizowany przez fosfatazę kwaśną z wydzieleniem fenolu, a metoda ta jest szeroko stosowana. Fenol uwalniany jest proporcjonalnie do aktywności fosfatazy, która mierzona jest kolorymetrycznie. Ponadto, fenol jest związkiem reaktywnym, dzięki czemu może być określany wrażliwymi metodami kolorymetrycznymi, umożliwiając w ten sposób skrócenie czasu inkubacji [7], [8].

Firma M/s Excel Diagnostics Pvt.Ltd wprowadziła zestaw do pomiaru aktywności kwaśnej fosfatazy oparty na zmodyfikowanej metodzie Kinga (King & King's Method), w której buforowany substrat jest specjalnie stabilizowany i przedstawiony jest jako fiolkowy monotest. Ponadto, kolor reagent jest zmodyfikowany, w celu zmniejszenia dodawanej ilości, tak więc dodatki odczynników minimalizują błędy podczas wykonywania testu [7].

Zasada metody:

fosfataza kwaśna z surowicy ulega hydrolizie do fenolu i wodorofosforanu disodowego, przy $pH=10$. Tak wytworzony fenol poddaje się reakcji z 4-aminoantypiryną w środowisku zasadowym, w obecności środka utleniającego, którym jest żelazocyjanek potasu z utworzeniem czerwonego kompleksu, którego absorbancja jest wprost proporcjonalna do aktywności enzymu [7]. Oznaczenie próbek wykonuje się długości fali równej 510 nm (zielony filte), po wcześniejszej inkubacji próbek w $37^\circ C$ w czasie od 3-15 minut [7].

Wykonanie oznaczenia z zastosowaniem zestawu M/s Excel Diagnostics (King & King's Methods; King, P.R.M & King, E.J. Clin Path 7.322.)

- Do czystych i suchych próbek oznaczonych: blank (B), standard (S), kontrola (C) oraz test (T), odpipetować za pomocą pipety odczynniki (w następujący sposób):

	B	S	C	T
Working	1.0ml	1.0ml	1.0ml	1.0ml
Buffered Substrate				
Deionized water	3.1ml	3.0ml	3.0ml	3.0ml
Incubate for 3 minutes at 37°C				
Serum	—	—	—	0.1ml
Phenol Standard (3)	—	0.1ml	—	—
Incubate for 15 minutes at 37°C				
Color Reagent (2)	2.0ml	2.0ml	2.0ml	2.0ml
Serum	—	—	0.1ml	—
—				

Zdjęcie: <http://exceldiag.com/catalogs/10003.pdf>

- Wszystkie odczynniki dokładnie wymieszać, po czym zmierzyć absorbancję względem wody dejonizowanej na fotokolorymetrze stosując filtr zielony lub spektrofotometrze przy $\lambda=510$ nm [7].
- Obliczenia:

ALP w jednostkach KA unit/dl = $A(\text{Test}) - A(\text{Control}) / A(\text{Standard}) - A(\text{Blank}) \times 10$ (Std. Conc.)

1KA unit/dl = 7.1 U/l [7].

Oznaczanie aktywności fosfatazy zasadowej i kwasowej

W doświadczeniu wykorzystuje się metodę Kinga-Armstronga (1965). Zasada metody opiera się na hydrolizie fenylofosforanu disodowego przez fosfatazę, a ilość wytworzonego w reakcji fenolu jest miarą aktywności enzymu. Do oznaczenia fenolu wykorzystuje się odczynnik Folina-Ciocalteu w metodzie kolorymetrycznej. Otrzymany wynik podawany jest w jednostkach Kinga-Armstronga [3].

Jednostka Kinga-Armstronga oznacza mg fenolu uwolnionego z fenylofosforanu disodowego przez enzym w 100 ml surowicy, w temperaturze 37°C, w ciągu 15 minut przy pH=10 dla fosfatazy zasadowej, oraz w ciągu 60 minut przy pH=4,9 dla fosfatazy kwasowej [3].

Wykonanie:

Do probówek wirówkowych należy odmierzyć po 2 ml buforu węglanowo-wodorowęglanowego o pH=10 dla fosfatazy zasadowej (tj.: rozpuścić 6,36 g Na_2CO_3 oraz 3,36 g NaHCO_3 w wodzie i uzupełnić wodą do objętości równej 100 ml) lub buforu cytrynianowego o pH=4,9 dla fosfatazy kwasowej (tj.: rozpuścić 21 g kwasu cytrynowego w wodzie, dodać 188 ml 1M roztworu NaOH, uzupełnić wodą do obj. 500 ml. Sprawdzić pH- w razie potrzeby doprowadzić do odpowiedniego pH za pomocą 1M roztworu HCl lub NaOH. Na koniec do roztworu dodać kilka kropli chloroformu i przechowywać w lodówce) oraz 2 ml substratu. Probówki ogrzewać kilka minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C, po czym dodać po 0,2 ml surowicy. Dobrze wymieszać i inkubować w temp. 37°C przez 15 minut (oznaczenie aktywności fosfatazy zasadowej) lub przez 60 minut (oznaczenie

aktywności fosfatazy kwasowej). Po inkubacji do próbek dodać 1,8 ml rozcieńczonego (1:2) odczynnika Folina-Ciocalteu, całość wymieszać, a po kilku minutach inkubacji próbki odwirować. Po wirowaniu z próbek pobrać po 4 ml supernatantu (do wywołania barwy) [3].

Jednocześnie wykonać próbę kontrolną: do 2 ml buforu oraz 2 ml substratu należy dodać 0,2 ml surowicy i od razu 1,8 ml rozcieńczonego odczynnika Folina-Ciocalteu, próbkę wymieszać i odwirować, po czym pobrać 4 ml supernatantu [3].

Do próbek z supernatantami dodać po 2 ml 15% Na_2CO_3 , inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 10 minut. Po inkubacji należy oznaczyć absorbancję dla próbek wobec wody przy długości fali równej $\lambda=680\text{ nm}$ [3].

Przygotowanie krzywej kalibracyjnej:

Jako pierwszy etap należy przygotować szereg rozcieńczeń wzorcowych roztworu fenolu (tj.: macierzysty roztwór wzorcowy fenolu zawierający 1mg fenolu w 1 ml (0,1% fenolu w 0,1M HCl)). Rozcieńczenia przygotowuje się tak, by uzyskać stężenia od 0,002 mg do 0,02 mg w 1 ml.

Do 2 ml przygotowanych rozcieńczeń dodać 1,2 ml odczynnika Folina-Ciocalteu, 0,8 ml wody oraz 2 ml 15% roztworu Na_2CO_3 . Próbki wymieszać i inkubować w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 10 minut. Po upływie czasu inkubacji, odczytać absorbancję wobec próby kontrolnej na odczynnik i wykresić krzywą kalibracyjną dla mg fenolu [3].

Obliczenia do doświadczenia:

Wartość absorbancji próby kontrolnej odejmuje się od wartości próby badanej, a następnie z krzywej kalibracyjnej należy odczytać ilość uwolnionego fenolu (w mg). Otrzymany wynik mnoży się wartością 750 (do wywołania barwy w doświadczeniu pobrano po 4 ml z 6 ml inkubatu, który zawiera 0,2 ml surowicy, uwzględniając te dane, otrzymuje się powyższą wartość tj.: $(100/0,2) \times (6/4)=750$). Wartość wyniku odczytuje się w jednostkach Kinga-Armstronga (K-A) [3].

Jednostka Kinga-Armstronga w układzie SI

Rozwój gałęzi medycyny laboratoryjnej jest ściśle związany z rozwojem metod badawczych, a także technik pomiarowych, które wykorzystywane są do wykonywania badań. Wraz z rozwojem wiedzy z dziedzin takich jak: chemia, fizyka oraz nauki przyrodnicze i medyczne, ewoluowały także jednostki, w których wyrażano wyniki pomiarów badań laboratoryjnych. I tak, przełomem była zamiana związana z wyrażaniem stężenia elektrolitów we krwi. Używana „od zawsze” jednostka miligramów na decylitr (mg/dl) została zastąpiona jednostką miliekwiwalenty na litr (mEq/l). Zamiana ta dotyczyła oznaczania stężenia sodu, potasu oraz chlorków. Co więcej, w istotny sposób wpłynęła ona na sposób interpretacji wyników oznaczeń elektrolitów. Sam fakt wprowadzenia nowej jednostki był ściśle związany z możliwością oceny stanu gospodarki wodno-elektrolitowej ustroju, z jednoczesnym uwzględnieniem zasady tzw. elektroobojętności płynów ustrojowych. Aktualnie, większość laboratoriów medycznych dla wyrażania stężenia elektrolitów czyli np. sól czy potas, stosuje jednostkę mmol/l, która jest jednostką układu SI [6].

W toku „ewolucji jednostek”, zmieniono również sposób wyrażania aktywności katalitycznej białek enzymatycznych. Początkowo aktywność enzymu wyrażana była w bardzo różnych jednostkach, co w głównej mierze związane było z wykorzystywaniem różnych metod badawczych oznaczania aktywności katalitycznej enzymu. Najczęściej stosowana nazwa jednostki pochodziła od nazwiska badacza, który opracował daną metodę. I tak, aktywność katalityczną amylazy, fosfatazy kwasowej i zasadowej wyrażano w jednostkach umownych. Aktywność amylazy wyrażana była w jednostkach

bez nazwy, jednakże za każdym razem obok wyniku podawano nazwę metody, którą wykonano dane oznaczenie, np.:

1. jednostka wyrażająca taką ilość enzymu, która w ciągu jednej minuty i w temperaturze równej 30°C uwalnia grupy redukujące w ilości równoważnej 1 μ molowi glukozy (metoda Bernfelda)
2. jednostka (metoda Winslowa)
3. jednostka (metoda Somogyi)
4. jednostka (metoda Heinkela)
5. jednostka (metoda Carawaya).
6. jednostka (metoda Phadebas) [6].

Do wyrażania aktywności fosfatazy zasadowej i kwaśnej stosowano kilka różnych jednostek, m.in.:

1. jednostkę Bodansky'ego (od stosowanej metody Bodansky'ego)
2. jednostkę Kinga-Armstronga (metoda Kinga-Armstronga)
3. jednostkę Besseya (metoda Besseya) [6].

W niektórych przypadkach istniały wzajemne przeliczniki jednostek umownych, dzięki czemu dany wynik można było podać w dwóch jednostkach, np.: 1 jednostka Besseya odpowiadała ok. 1,8 jednostek Bodansky'ego. Stosowanie wielu jednostek umownych, było niestety nie do końca dobrym rozwiązaniem, gdyż uniemożliwiało to lub utrudniało porównywanie wyników badań, które zostały uzyskane w różnych jednostkach badawczych - laboratoriach. W konsekwencji ciągłego dążenia do doskonalenia metod oznaczania aktywności enzymów było przyjęcie ujednoczonej jednostki służącej do wyrażania aktywności enzymów. W 1961 roku Międzynarodowa Unia Biochemii i Biologii Molekularnej wprowadziła standardową jednostkę aktywności enzymów, którą nazwano jednostką międzynarodową (ang. international unit, IU). Przyjętą jednostkę zdefiniowano jako „aktywność katalityczną zdolną do przekształcenia 1 mikromola substratu w czasie 1 minuty”. Ponadto, zalecono, by aktywność enzymów wyrażana była w jednostkach na litr (IU/l) lub w milijednostkach na mililitr (mIU/ml) [6].

E. J. King i wsp. w 1951 roku, w oparciu o pierwotną metodę King'a i Armstrong'a (1934), która wykorzystywała fenylofosforan disodowy hydrolizowany przez fosfatazę kwaśną z uwolnieniem fenolu, opracowali dwie podobne metody oznaczania aktywności fosfatazy. Głównym powodem opracowania poniższych metod, w których niezwykle ważny jest końcowy pomiar ilości uwolnionego nieorganicznego fosforanu był fakt, że oszacowanie fosforanu w osoczu było często wymagane w badaniu chorób u dzieci. Uważano, że pożądane jest łączenie oszacowania ilości uwolnionego fosforanu z określeniem ilości fosfatazy, co może być łatwo wykonane poprzez pomiar nieorganicznego fosforanu z identyczną kontrolą dla fosfatazy. Pomiar taki przeprowadzane były z wykorzystaniem niektórych procedur np. Jenner i Kay (1932) i Bodansky (1933). Jednakże, zastosowanie fenylofosforanu do oznaczania fosfatazy było bardziej preferowane, z powodu większej wygody procedury- przebiegała w znacznie krótszym czasie, co było niezbędne do wykonania oznaczenia w momencie dysponowania małymi ilościami osocza lub surowicy [9].

Metoda I (wg]. King E.J i wsp. (1951), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1023361/?page=1>)

Odczynniki wykorzystane w procedurze:

1)Substrat: W poniższej metodzie jako substrat wykorzystuje się 0,01 M fenylofosforan disodowy, otrzymany przez rozpuszczenie 2,18 g w 1 litrze wody destylowanej, która jest szybko ogrzewana do wrzenia (w celu zniszczenia drobnoustrojów). Roztwór należy przechowywać na lodzie. Dodatek kilku kropli chloroformu działa jak środek antyseptyczny.

2)Bufor (pH = 10): 0,1 M roztwór $6\text{Na}_2\text{CO}_3 : 4\text{NaHCO}_3$ przygotowany przez rozpuszczenie 6.36 g. Na_2CO_3 (bezwodny) i 3,36 g. NaHCO_3 w wodzie destylowanej i rozcieńczony do objętości 1 litra [9].

3)Bufor (pH 4,9).- 0,2 M octan sodowy (6,5 NaOAc : 3,5 HOAc) przygotowany przez dodanie 65 ml 0,2 M octanu sodu (27,2 g. $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ na litr) do 35 ml. 0,2 M kwasu octowego (11,3 ml czystego lodowatego kwasu octowego na litr).

4)Kwas trichlorooctowy: 7% i 20%

5)Molibdenian- 5g molibdenianu amonu rozpuścić w ok. 5M roztworze H_2SO_4 przygotowanym przez dodanie 14 ml stężonego roztworu kwasu siarkowego do 86ml wody destylowanej (kwas dodawać powoli, ciągle mieszając)

6)Kwas aminonaftolosulfonowy (odczynnik redukujący): 1:2:4-kwas aminonaftolosulfonowy (0,2 g) 12 g pirosiarczynu sodu oraz 2,4g krystaliczny siarczan sodowy ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) należy rozpuścić w 100 ml wody destylowanej.

7)Chlorek cyny (odczynnik redukujący): 10g chlorku cyny (SnCl_2) rozpuścić w 100 ml ok. 5M HCl (w stosunku 1:1)- roztwór ten jest zdatny do użytku przez miesiąc (należy go przechowywać na lodzie). Odczynnik redukujący należy przygotować w rozcieńczeniu 1 do 20 (w 5M H_2SO_4)- tak przygotowana odczynnik jest stabilny 1 dzień.

8)Stock - fosforan (standard): 2,194 g diwodorofosforanu potasu należy rozpuścić w 500 ml wody destylowanej, całość dokładnie wymieszać. Do roztworu dodać kilka kropli chloroformu w celu zabezpieczenia przed wzrostem mikroorganizmów. Roztwór ten zawiera 1mg fosforu na mililitr [9].

9)Przygotowanie standardu fosforu ze stocku (0,004 mg P w 1 ml): 2 ml fosforanu (ze stocku) odmierzyć do kolby o poj. 500 ml i uzupełnić do kreski za pomocą wody destylowanej, całość dokładnie wymieszać. Zakonserwować roztwór dodając kilka kropli chloroformu [9].

Wykonanie:

Do próbki odpipetowano po 3 ml buforu i substratu, próbkę ogrzewano w łaźni wodnej w 37°C przez 3-4 minut. Do próbki dodano 0,3 ml osocza lub surowicy, całość łagodnie wytrząsnęto i pozostawiono w inkubacji przez kolejne 15 minut. Po upływie inkubacji, do próbki dodano 1,2 ml 20% kwasu trichlorooctowego- zatrzymanie hydrolizy. Całość wymieszano i zwirowano w celu usunięcia białek (próbka może być również przefiltrowana) [9].

Kontrola: 0,3 ml osocza dodano do 6 ml wody, wymieszano, po czym próbkę zmieszano z 1,2 ml 20% kwasu trichlorooctowego, całość przefiltrowano.

Blank (próba zerowa)- do 3 ml buforu dodano 3 ml substratu, 0,3 ml wody oraz 1,2 ml 20% kwasu trichlorooctowego **[9]**.

Oznaczanie fosforu:

Do 5 ml każdej z próbek (testowej, kontrolnej i blanka oraz próbki ze standardowym roztworem fosforu (0,02 mg P) , dodano 0,8 ml molibdenianu oraz 0,2 ml kwasu aminonaftolosulfonowego. Próbki wymieszano i pozostawiono na 10 minut w celu pojawienia się niebieskiego koloru. Następnie, w próbkach zmierzono absorbancję (ekstynkcję) za pomocą foto-elektrycznego kolorymetru, wyposażonego w filtr czerwonego światła.

Równomolowe ilości fenolu i fosforanu są uwalniane w trakcie hydrolizy fenylofosforanu. Dla każdej cząsteczki fenolu o masie molowej równej 94, 11 g/mol, przypada cząsteczka fosforanu zawierająca jeden atom fosforu (P) o masie molowej równej 31 g/mol. Tak więc, około trzy razy więcej fenolu (wagowo) uwalniane jest w określonym czasie jako fosforan wyrażony jako P.

Jednostka Kinga-Armstronga zdefiniowana jest jako ilość enzymu, która uwalnia 1 mg fenolu z fenylofosforanu. Jednostka ta może być również zdefiniowana jako ta, która uwalnia 1/3 mg P, w związku z czym konieczne jest aby pomnożyć liczbę P (mg) uwolnionego w trakcie 15 minut przez 3, aby uzyskać wartość równą jednostce Kinga-Armstronga [9].

Metoda II :

Próba testowa:

1 ml każdego buforu i substratu odpipetowano do probówki i ogrzewano w łaźni wodnej w temperaturze 37 ° C przez 3 do 4 minut. Następnie dodano 0,1 ml osocza lub surowicy, wymieszano, po czym próbkę utrzymywano w temperaturze 37°C przez 15 minut. Dalej, dodano 2,9 ml 7% kwasu trichlorooctowego, całość dokładnie wymieszano i odwirowano.

Kontrola: kontrolę przygotowano przez potraktowanie 2 ml wody i 0,1 ml osocza 2,9 ml 7% kwasu trichlorooctowego. Całość wymieszano, po czym poddano filtracji

Blank: na blank składa się bufor i substrat w objętości po 1 ml oraz 0,1 ml wody i 2,9 ml 7% kwasu trichlorooctowego.

Oznaczanie fosforu:

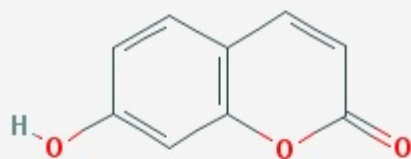
Standard, oraz po 2 ml każdej próbki testowej, kontrolę oraz blank rozcieńczono w 3 ml wody, po czym próbki potraktowano 0,8 ml molibdenianu. Próbki dokładnie wymieszano, po czym dodano do nich po 2 ml chlorku cyny - całość ponownie dokładnie wymieszano. Próbki inkubowano 15 minut, a dalej odczytano otrzymane wyniki za pomocą kolorymetru, który jako wartość zero wskazuje po pomiarze próbki „blank” składającej się z 4 ml wody, 1 ml 7% kwasu trichlorooctowego, 0,8 ml molibdenianu oraz 0,2 ml chlorku cyny [9].

Obliczenia:

Otrzymane w trakcie doświadczenia wyniki pokazują, że w 2 ml próbki testowanej i kontrolnej stanowią 0,04 ml osocza, a co za tym idzie tyle samo unitów fosfatazy na 100 ml [9].

Rietz B. oraz Gullbault G.G (1975) opisali enzymatyczną metodę fluorymetryczną wykorzystywaną do określania aktywności fosfatazy alkalicznej w surowicy oraz fosfatazy kwaśnej w roztworze i na silikonowych podkładkach. Jako podłoże w doświadczeniu zastosowano fosforan 4-metylo-umbeliferonu. W roztworze, reakcja meirzona jest w temperaturze 37°C w 3-ml kuwetach [10]. Pomiar na silikonowych podkładkach również odbywa się w temperaturze 37°C, po wcześniejszym otrzymaniu stabilnych warst wszystkich wykorzystywanych odczynników przez liofilizację na powierzchni silikonowych podkładek. W metodzie wykorzystuje się jedynie ok 20 do 30 µl roztworu substratu, 50 µl roztworu buforu oraz 1 do 10 µl krwi, dzięki czemu końcowa objętość odczynników wynosi od 51 do 60 µl dla każdego pomiaru. W doświadczeniu mierzono szybkość pojawienia się fluorescencyjnego 4-metylumbeliferonu uwalnianego z fosforanu-4-metylumbeliferonu na skutek działania enzymów, a następnie z otrzymanymi wartościami obliczano aktywność enzymu [10].

Umbeliferon zaliczany jest do kumaryn (7-hydroksykumaryna). Związek ten występuje w roślinach z rodzin: *Umbelifere Solanaceae, Compositae* i innych. Ponadto, stanowi jeden ze składników olejku eterycznego rumianku pospolitego. Zazwyczaj umbeliferon spotykany jest w wolnej postaci tzw. aglikon. Ważną cechą umbeliferonu jest zdolność do absorpcji ultrafioletowej części widma słonecznego, przez co związek ten należy do tak zwanych substancji fotochronnych. Tak więc, pochodne umbeliferonu (np.: octan umbeliferonu) znalazły zastosowanie przy produkcji kosmetyków przeciwsłonecznych [11].



Zdjęcie: Struktura umbeliferonu,
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5281426#itabs-2d>

Dotychczas opisano wiele procedur, w których dla zwiększenia czułości fluorometrycznej wykorzystywano związki (substraty), które są rozszczepiane enzymatycznie dając w konsekwencji produkty fluorescencyjne. Fosforan 4-metyloumbeliferonu oraz fosforan umbeliferonu wykorzystywane są np. jako substrat do oznaczania aktywności jelitowej (ciężkiej) fosfatazy alkalicznej [10].

Oznaczenie aktywności fosfatazy alkalicznej wg Rietz B. oraz Gullbault G.G (1975) [10].

Odczynniki:

- Bufor Tris 0,1 mol/l , pH=9.8 w 37°C. Do buforu dodano $MgCl^2 \cdot 6H_2O$ do końcowego stężenia jonów Mg^{2+} równego 1 mmol/litr
- Bufor cytrynianowy: cytrynian trisodowy, 0,1mol/litr w 37°C, doprowadzony do pH= 4.9 za pomocą 0,1 mol/litr HCl.
- Enzym kontrolny (o znanej aktywności): w zależności od wskazań producenta (np. enzym Sigma Chemical Co.) fiolkę z enzymem rozpuszcza się w odpowiedniej ilości potrójnie destylowanej wody z dodatkiem 5 ml buforu węglanowego (0,1 mol/litr, o pH=9.8 w temp. 37°C. Przygotowane kontrolne wykorzystane były następnie do ustalenia krzywej wzorcowej. Końcowe badania przeprowadzono na próbkach świeżej surowicy krwi.
- Substrat do oznaczenia fluorometrycznego: roztwór (fosforan 4-metyloumbeliferonu) w formie krystalicznej, przygotowany przez rozpuszczenie w potrójnie destylowanej wodzie w stężeniu 0,1 mmol/litr w przypadku badań z fosfatazą alkaliczną i 1 mmol/litr dla fosfatazy kwasowej.

Wykorzystywany w doświadczeniu fluorometr poddano standaryzacji w roztworze 10^{-6} mol/litr siarczanu chininy w 0,2 mol/litr H_2SO_4 .

Fluorometryczne oznaczanie fosfatazy zasadowej [10]:

Do 0,1 ml roztworu fosforanu 4-metylumbeliferonu dodano 2,9 ml buforu Tris. Roztwór ogrzano do temperatury równej $37^\circ C$ przez 2 minuty w fluorymetrze).

Po 2 minutach do próbki dodano enzym, całość dokładnie wymieszano w ciepłym roztworze. Następnie, mierzono szybkość zmiany fluorescencji po upływie 1 minuty (tj. dokładnie 3 min po rozpoczęciu ogrzewania roztworu), po czym wykreślono zmiany fluorescencji ($\Delta f / \text{min}$) względem aktywności enzymatycznej [10].

Fluorometryczne oznaczanie fosfatazy kwaśnej:

Do 0,5 ml fosforanu 4-metylumbeliferonu dodano 2,5 ml buforu cytrynianowego. Dalej postępowano zgodnie z powyższą procedurą (oznaczanie fosfatazy zasadowej). Wykres kalibracyjny $\Delta f/\text{min}$ względem aktywności enzymatycznej powinien być liniowy od 0,265 do 5,3 jednostek King-Armstrong. Na podstawie otrzymanego wykresu następnie określono aktywność enzymu w surowicy krwi [10].

P-nitrofenol jest bardzo ważnym związkiem chemicznym wykorzystywanym w biologii i medycynie. Zaliczany jest do związków wysoko-chromogennych, stabilnych będących produktem enzymatycznej katalizy wielu syntetycznych substratów. Jeden z tych syntetycznych substratów - fosforan 4-nitrofenylu (4NPP) jest wykorzystywany w chemii klinicznej do pomiaru fosfatazy alkalicznej [13].

Oznaczanie aktywności fosfatazy zasadowej oraz fosfatazy kwasowej z wykorzystaniem metody Besseya i Lowry'ego (E.Szczeklik 1963: Enzymologia kliniczna. PZWL, Warszawa, s.272).

Aktywność fosfataz podawana jest w tzw. jednostkach Besseya. Jednostka Besseya oznacza liczbę milimoli p-nitrofenolu uwolnionego w trakcie reakcji przez enzym w określonych warunkach tj.: w 1000 cm^3 surowicy w trakcie 1 godziny inkubacji w warunkach metody bądź standardowych jednostkach aktywności enzymów (U/l). Jednostka Besseya oznacza taką ilość enzymu, która zdolna jest do katalizowania przemiany $1 \mu\text{mola}$ substratu w trakcie 1 minuty w temperaturze równej $30^\circ C$ w optymalnych warunkach [12]. W metodzie Besseya i Lowry'ego oznaczenie fosfataz opiera się spektrofotometrycznym pomiarze stężenia p-nitrofenolu, który uwalniany jest w trakcie enzymatycznej hydrolizy p-nitrofenylofosforanu. Oznaczenie wykonuje się po zakalizonaniu próbki badanej [12], [3].

Odczynniki wykorzystywane w trakcie oznaczenia:

1)Odczynnik A: rozpuścić 7,5 g glicyny oraz 15 mg $MgCl_2$ w wodzie, dodać 85 ml 1M roztworu wodorotlenku sodu, po czym uzupełnić wodą do końcowej objętości równej 1000 ml (pH= ok. 10,5)

2)Odczynnik B: 0,4% p-nitrofenylofosforan disodowy w 0,001M roztworze kwasu solnego, pH= 6.5 - 8.0.

3)Odczynnik C: w celu przygotowania odczynnika C należy zmieszać równe objętości odczynnika A oraz B. 2 ml otrzymanego substratu po dodaniu 10 ml 0,02 M roztworu NaOH nie powinny wykazywać absorbancji przy 415 nm większej od 0,1 (pomiar przeprowadzony w kuwecie o grubości 1 cm). W razie potrzeby otrzymany substrat można poddać przekryształowaniu z dodatkiem 87% roztworu etanolu [3].

4)100 mM roztwór p-nitrofenolu: 139,1 mg w 10 ml roztworu (należy sporządzić rozcieńczenia: 1,2,4,6 mmol na 1000 ml roztworu, czyli: 1,2,4 oraz 6 mM).

Wykonanie:

Do 0,5 ml surowicu dodać 0,5 ml substratu (odczynnik C). Próbki inkubować w łaźni wodnej o temp. 37°C przez 30 minut. Po upływie czasu inkubacji próbkę należy ochłodzić w łaźni lodowej , po czym dodać do niej 5 ml 0,02 M roztworu NaOH. Zmierzyć absorbancję przy długości fali równej $\lambda = 415$ nm. Oznaczenie przeprowadzić wobec próbki kontrolnej, otrzymanej w identyczny sposób z pominięciem 30-minutowej inkubacji.

Na podstawie otrzymanych wartości, absorbancję (A) należy odczytać z krzywej aktywności w jednostkach Besseya, które oznaczają liczbę milimoli p-nitrofenolu uwolnionego przez enzym w 1000 ml surowicy, w trakcie 1- godzinnej inkubacji w warunkach metody.

Próba wzorcowa oraz kontrolna na odczynniki otrzymywana jest w analogiczny sposób co próba badana (z surowicą) z 0,05 ml roztworów wzorcowych lub H_2O .

Do oznaczenia aktywności fosfatazy kwasowej w powyższej metodzie należy wykorzystać bufor cytrynianowy o pH= 4,8, zawierający p-nitrofenylofosforan. Próbkę składającą się z 0,2 ml surowicy, 0,35 ml H_2O oraz 1 ml substratu, należy inkubować przez 30 minut w temperaturze 37°C, po upływie czasu inkubacji dodać 4 ml 0,05 M roztworu NaOH. Następnie, odczytać wartość absorbancji (A) wobec próby kontrolnej.

Wartości fizjologiczne:

- fosfataza zasadowa: 0,8 - 2,3 j. Besseya

- fosfataza kwasowa: 0,1 - 0,6 j. Besseya [3].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

- [1]. Żebrowaska E., Ciereszko I., 2009. Udział kwaśnych fosfataz w gospodarce fosforanowej komórek roślinnych. Postępy Biologii Komórki, Tom 36 2009 NR 4 (583-599).
- [2]. Al-saadie K., Al-Mousawi I.M., Karime N.A., 2007. Kinetics Decomposition of Some Substituted Benzendiazonium Salts in HCl Solution. National Journal of Chemistry, 2007, Volume 25, 195-205.
- [3]. Kłyszajko-Stefanowicz L., 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s.556-559.
- [4]. Making diazonium salts from phenylamine. <http://www.chemguide.co.uk/organicprops/aniline/makediazo.html>
- [5]. <http://exceldiag.com/catalogs/10003.pdf>
- [6]. Wendt U., Polek A., Łangowski K., Rogulski J., 2009. Jednostki układu SI i ich zastosowanie w medycynie laboratoryjnej. diagnostyka laboratoryjna Journal of Laboratory Diagnostics 2009 • Volume 45 • Number 2 • 155-162. http://diagnostykaboratoryjna.eu/journal/DL-2_2009._str_155-162.pdf
- [7]. M/s Excel Diagnostics Pvt. Ltd. Plot NO. 89, Road No.8, ALEAP I.E., Near Pragathi Nagar, Opp. Kukatpally JNTU, Hyderabad - 500 090 (A.P.) INDIA. <http://exceldiag.com/catalogs/10003.pdf>
- [8]. http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_28255.pdf
- [9]. King E.J., Abul-Fadl M.A.M., Walker P.G., 1951. KING-ARMSTRONG PHOSPHATASE ESTIMATION BY THE DETERMINATION OF LIBERATED PHOSPHATE. J. clin. Path. (1951), 4, 85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1023361/?page=1>
- [10]. Rietz B., Gullbault G.G., (1975). Fluorometric Assay of Serum Acid or Alkaline Phosphatase , Either in Solution or on a Semisolid Surface. CLIN. CHEM.21/12, 1791-1794 (1975). <http://www.clinchem.org/content/21/12/1791.full.pdf>
- [11]. <http://www.farmakognozja.farmacja.pl/fitochem/index.php?grupa=kumaryny&strona=3>
- [12]. <http://analiza.ovh.org/cw/cw3.pdf>
- [13]. http://www.wiener-lab.com.ar/wiener/catalogo/archivos/13498_alp405aa_liquida_pl.pdf
- [14]. Bowers G.N., Mc Comb R.B., Christensen R.G., Schaffer R., 1980. High-Purity 4-Nitrophenol: Purification, Characterization, and Specifications of Use as a Spectrophotometric Reference Material . Clin. Chem. 26/6 , 724-729 (1980). <http://www.clinchem.org/content/26/6/724.full.pdf>

<https://laboratoria.net/artykul/21694.html>

Informacje dnia: [Ruszyła IV edycja konkursu Pomosty Przyszłości Kleszcz to tylko pośrednik Jak rower zmienił świat Polacy opracowują aparaturę dla teleskopów europejskiej misji kosmicznej](#) [Badanie: portale społecznościowe nie chronią przed samotnością](#) [Norowirusy - biegunka brudnych rąk](#) [Ruszyła IV edycja konkursu Pomosty Przyszłości Kleszcz to tylko pośrednik Jak rower zmienił świat Polacy opracowują aparaturę dla teleskopów europejskiej misji kosmicznej](#) [Badanie: portale](#)

[społecznościowe nie chronią przed samotnością](#) [Norowirusy - biegunka brudnych rąk](#) [Ruszyła IV edycja konkursu Pomosty Przyszłości](#) [Kleszcz to tylko pośrednik](#) [Jak rower zmienił świat](#) [Polacy opracowują aparaturę dla teleskopów europejskiej misji kosmicznej](#) [Badanie: portale społecznościowe nie chronią przed samotnością](#) [Norowirusy - biegunka brudnych rąk](#)

Partnerzy