



SEMMELWEIS EGYETEM

Orvosi Biokémiai Intézet
1094 Budapest, Tűzoltó u. 37-47.

SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

Piruvát kináz izoenzimek vizsgálata című gyakorlat előkészítése

Készítette:

2008.12.10.

Dr. Bauer Pál
egyetemi docens

Dátum

Jóváhagyta:

2008. 12.10.

Dr. Kolev Kraszimir
tanulmányi felelős

Dátum

MIR szempontból
ellenőrizte:

2008. 12.10.

Dr. Kolev Kraszimir
minőségirányítási vezető

Dátum

A dokumentáció kódja:	SE-OBI-OKT-MU-02
Változat száma:	01
Érvénybelépés időpontja:	2008.12.10.
Oldalak száma:	5
Mellékletek száma:	0

Nyilvántartott példány:

Munkapéldány:

A példány sorszáma:

Ezen Szabványműveleti előírás a **Semmelweis Egyetem** szellemi tulajdona. Továbbadása, sokszorosítása írásos engedélyhez kötött. A Munkautasításban szereplő információt csak a minőség- és környezetirányítási rendszer működtetéséhez lehet felhasználni.



SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

Piruvát kináz izoenzimek vizsgálata

MÓDOSÍTÁSOK JEGYZÉKE

Módosította Dátum/Aláírás	Módosított oldalszám	Jóváhagyta Dátum/Aláírás	Ellenőrizte Dátum/Aláírás	Kibocsátás időpontja



SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

Piruvát kináz izoenzimek vizsgálata

TARTALOMJEGYZÉK

A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS CÉLJA.....	4
A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS ÉRVÉNYESÉGI TERÜLETE	4
ILLETÉKESÉG ÉS FELELŐSSÉG MEGHATÁROZÁSA	4
A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS LEÍRÁSA	4



SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

Piruvát kináz izoenzimek vizsgálata

A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS CÉLJA

Összefoglalja a rutinszerűen alkalmazott technológiai eljárás részleteit.

A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS ÉRVÉNYESÉGI TERÜLETE

Orvosi Biokémiai Intézet oktatási előkészítő laboratóriuma.

ILLETÉKESÉG ÉS FELELŐSSÉG MEGHATÁROZÁSA

A dokumentum kidolgozásáért felelős:

Tanulmányi felelős

A dokumentum alkalmazásáért felelős:

Vezető laborasszisztens

A dokumentumban foglaltak végrehajtásáért felelős:

Beosztott laborasszisztensek.

A dokumentumban szabályozott tevékenység rendszer felülvizsgálat alkalmával történő felülvizsgálataért felelős:

A Minőségirányítási vezető

A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS LEÍRÁSA

1. Oldatok és módszerek

1.1. Mosott homok

Kétszáz ml homokot 500 ml 0.1 M-os HCl-el összekeverünk, állni hagyjuk fél órát, majd deszt. vízzel többször mossuk, ülepítjük míg a mosófolyadék pH-ja 5-6 közé esik. Szárítás szűrőpapíron.

1.2. 40% PEG 6000, K-foszfát pufferben oldva

1.3. Feltáró puffer: 0.1 M K-foszfát puffer, pH 7,6, 5mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 40 mM 2-merkaptotanol, proteáz gátló (Sigma P-2714)

2. Piruvát kináz L izolálása élesztőből.

120 g élesztő eldörzsölve -20 °C-ra előhűtött mozsárban 120 ml homokkal 120 ml feltáró puffer adagolásával jégen. Centrifugálás 3200rpm, 4 °C 15 perc. Felülúszóhoz (Fu)-hoz 1/6-od térfogatnyi



SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

Piruvát kináz izoenzimek vizsgálata

PEG oldat részletekben, keverés közben, jégen, 15 perc alatt. Centrifugálás 9500 rpm, 15 percig Beckmann J20 rotorban, 4 °C-on. Felülúszó a PK-L preparátum.

3. PK-M enzim, Sigma PK enzim (P-1381), 5000xre hígítva, mediummal naponta ill. a felhasználás előtt.

4. Oldatok az enzimaktivitás méréshez.

Médium, 0.1M K-foszfát puffer, pH 7,6, 5 mM MgSO₄—820 µl/cső (készül: 60 ml 335 mM MgSO₄ + 1050 ml 0.1 M K-foszfát pH 7.6 + 1350 ml víz)

50 mM PEP--- 20 µl/cső

333 U/ml LDH --- 20 µl/cső

10 mM NADH --- 20 µl/ cső

PK-L, vagy PK-M enzim 20-100 µl/ cső, preparátum függően

75 mM ADP --- 20 µl/cső

500 mM Alanin --- 20 µl/cső

20 mM FDP --- 20 µl/cső

5. Aktivitásmérés

Fotométer küvettájába összemérik a médiumot, a PEP-et, NADH-t és az LDH-t. szobahőn. Alapvonal felvétel 340 nm-en PK és ADP hozzáadása után, 1cm/perc papírsebesség mellett. Enzim hozzámérése, alapaktivitás felvétele, majd alanin hozzáadása és a módosított enzimaktivitás mérése. FDP hozzáadása után az aktivitás további mérése. Amennyiben a PK-L alapaktivitása alacsony, FDP hozzáadása a törzsoldathoz lehetséges.

6. Bekészítendő oldatok (fotomérenként, gyakorlatonként):

1 üveg (kb. 50 ml) médium szobahőn

200 – 200 µl ADP, LDH, PK-L, PK-M, Alanin, ATP (=alanin), PEP, FDP, NADH 4 °C-on