**3. OZNACZANIE SYNTAZY PORFOBILINOGENOWEJ – DEHYDRATAZY KWASU DELTA-AMINOLEWULINOWEGO W KRWINKACH wg. Bonsignore i wsp. (ALAD)**

**ZASADA OZNACZANIA**

Metoda polega na kolorymetrycznym oznaczaniu porfobilinogenu z odczynnikiem Ehrlicha powstającego z kwasu delta-aminolewulinowego pod wpływem syntazy porfobilinogenowej obecnej w erytrocytach.

**ODCZYNNIKI**

1. 0,01M roztwór chlorowodorku kwasu delta-aminolewulinowego, pH=7,0
2. Odczynnik Ehrlicha: 1g p-dimetyloaminobenzaldehydu rozpuścić w 30 ml lodowatego kwasu octowego, dodać 16ml 70% kwasu nadchlorowego i uzupełnić do 50 ml lodowatym kwasem octowym
3. 10% roztwór kwasu trichlorooctowego (TCA) zawierający 0,1M HgCl2.

**PRZYGOTOWYWANIE HEMOLIZATU**

Pobrać 0,2ml krwi heparynowej z żyły i wymieszać z 1,3ml wody destylowanej.

**WYKONANIE OZNACZENIA**

Do uzyskanego hemolizatu krwi dodać 1ml roztworu ALA i wymieszać. Następnie przenieść do dwóch probówek wirówkowych po 1ml roztworu. Do jednej probówki dodać 1ml kwasu TCA (kontrola). Obie probówki wstawić na 30 min do łaźni wodnej o temp. 37°C. Po wyjęciu z łaźni wodnej do drugiej probówki (badana) dodać 1ml kwasu TCA i wymieszać. Obie próbki umieścić w wirówce i wirować 10min. z szybkością 4-5tys. obrotów/min. Następnie pobrać 1ml supernatantu i dodać 1ml odczynnika Ehrlicha. Wymieszać i po 5 minutach zmierzyć absorbancję próby badanej i kontrolnej przy długości fali λ=555 nm.

**OBLICZANIE WYNIKÓW**

Wynik podaje się w jednostkach aktywności na 1ml erytrocytów:

 

gdzie:

A – aktywność enzymu na 1ml erytrocytów,

A555 – absorbancja próby badanej wobec próby kontrolnej,

12,5 – rozcieńczenie krwi w próbie.

 **Norma**:

U osób nienarażonych na ołów aktywność enzymu ALAD wynosi 100$\pm $15J/ml erytrocytów. Obniżenie aktywności enzymu następuje podczas zatrucia ołowiem.