## **ćw. 3. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI ACETYLOCHOLINOESTERAZY**

## **(AChE) METODĄ PILZA (modyfikacja metody Hestrina)**

**ZASADA METODY**

AChE po 30-minutowej inkubacji (surowica) w 37ºC rozkłada acetylocholinę (ACh) na cholinę i kwas octowy. Nierozłożona część ACh reaguje z hydroksyloaminą w środowisku zasadowym tworząc kwas acetylohydroksamowy, który w kwaśnym środowisku tworzy barwny kompleks z jonami żelazowymi. Natężenie barwy, proporcjonalne do aktywności AChE, mierzy się kolorymetrycznie za pomocą spektrofotometru przy λ = 490 nm.

**ODCZYNNIKI**

1. 0,1M bufor weronalowy, pH=8,6
2. Roztwór podstawowy Ach 200mM
3. Substrat acetylocholinoesteraza chloride (ACh) 1,33mM: 1ml roztworu ACh 200mM (odcz.2) + 150 ml 0,1M buforu weronalowego (odcz. 1),
4. 2,5M roztwór NaOH
5. 1M roztwór hydroksyloaminy
6. Alkaliczny roztwór hydroksyloaminy: zmieszanie równych objętości roztworów NaOH (odcz.4) i hydroksyloaminy (odcz.5),
7. 0,7M roztwór żelaza (siarczan żelazowo-amonowy)
8. 0,1M bufor cytrynianowy pH=1,4

**WYKONANIE OZNACZENIA**

Przygotowanie surowicy:

1. Do 0,2ml surowicy dodać 2,4ml wody destylowanej.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Kontrola** | **Badana** | **Ślepa** |
| Substrat ACh (odcz. 3) | 2,5ml | 2,5ml | - |
| Surowica | - | 0,2ml | - |
| Inkubacja w 37°C 30 minut |
| Alkaliczny roztwór hydroksyloaminy(odcz. 6) | 0,5ml | 0,5ml | 0,5ml |
| Surowica | 0,2ml | - | - |
| Bufor cytrynianowy (odcz. 8) | 0,5ml | 0,5ml | 0,5ml |
| Roztwór żelaza (odcz. 7) | 1ml | 1ml | 1ml |
| Woda destylowana | 0,3ml | 0,3ml | 3,0ml |

Roztwory należy przesączyć przez sączek karbowany, a następnie zmierzyć w przesączu absorbancję przy długości fali 490nm za pomocą spektrofotometru, wobec próby ślepej.

**OBLICZANIE AKTYWNOŚCI ENZYMU W MJ:**

 **∆E = Ek - EB**

**Ek** – absorbancja próby kontrolnej, **EB** – absorbancja próby badanej, **∆E** x 10833 (mJ/ml) dla surowicy.

**Normy: dla AChE surowicy: 2500 ± 625 mJ/ml surowicy**

Ocenić % błędu wykonanej analizy oraz określić rodzaj zatrucia:

- zatrucie lekkie - zahamowanie aktywności cholinoesterazy w przedziale do 60%;

- zatrucie średnio-ciężkie - zahamowanie aktywności cholinoesterazy w przedziale 60-90%:

- zatrucie ciężkie-najczęściej śmiertelne - zahamowanie aktywności cholinoesterazy w przedziale

90-100%