**OZNACZANIE AKTYWNOŚCI GAMMA-GLUTAMYLOTRANSFERAZY (GGT-γ) oraz KREATYNINY metodą kolorymetryczną**

**ZASADA OZNACZANIA**

GGT katalizuje przenoszenie reszty γ-glutamylowej z cząsteczki substratu na glicylglicynę i zostaje uwolniona p-nitroanilina o żółtym zabarwieniu.

**ODCZYNNIKI**

1. 6mM 4-nitroanilina
2. 10% kwas octowy
3. 0,55M glicylo-glicyna w 0,1M buforze Tris-HCl o pH 8,0

(72,6mg glicylo-glicyny w 1ml 0,1M Tris-HCl pH 8,00)

1. 0,9% NaCl
2. Substrat: 7,5mM L-glutamic acid γ-(p-nitroanilide)

(27mg substratu rozpuścić na ciepło w 10ml PBS i dodać 2,5ml odczynnika 3 (0,55M glicylo-glicyna w 0,1M buforze Tris-HCl o pH 8,0)

**WYKONANIE KRZYWEJ WZORCOWEJ**

Przygotować roztwory według poniższej tabeli:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Stężenie (µkat/ml)** | **6mM 4-nitroanilina [µl]** | **H2O [µl]** |
| 0,5 | 50 | 550 |
| 1,0 | 100 | 500 |
| 1,5 | 150 | 450 |
| 2,0 | 200 | 400 |
| 3,0 | 300 | 300 |
| 4,0 | 400 | 200 |

Roztwory wymieszać, pobrać z każdego po 25µl do nowych probówek i dodać po 1,75ml 10% kwasu octowego. Wymieszać i odczytać absorbancję na spektrofotometrze przy długości fali λ = 405 nm wobec wody. Następnie wykreślić w Excelu krzywą zależności absorbancji od stężenia 4-nitroaniliny.

**OZNACZENIE W MOCZU**

Mocz do badania należy zwirować (10min. przy 4000obr./min.) i użyć supernatantu.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Próbka badana  | Próbka kontrolna |
| Materiał badany (mocz) | 25µl |  |
| NaCl |  | 25µl |
| Substrat: 7,5mM L-glutamic acid γ-(p-nitroanilide) | 250µl | 250µl |
| Inkubacja 60min. w 37°C |
| 10% kwas octowy | 1,5ml | 1,5ml |

Wymieszać i odczytać absorbancję na spektrofotometrze przy długości fali λ = 405 nm wobec wody.

Uzyskaną absorbancję próby kontrolnej (Ek) odjąć od próby badanej (Eb) uzyskując ∆E. Następnie podstawić obliczone ∆E do wzoru z krzywej i wyliczyć stężenie GGT w próbce w µkat/l, który należy pomnożyć przez 60, aby uzyskać wynik w jednostkach U/l (mU/ml; mg/ml).

**OZNACZANIE KREATYNINY**

ODCZYNNIKI

1. 1,2M kwas trichlorooctowy (odczynnik odbiałczający)
2. 0,035M kwas pikrynowy (odczynnik kompleksujący)
3. 1,6mM wodorotlenek sodu (odczynnik zasadowy)
4. 0,177mM roztwór kreatyniny (wzorzec)

WYKONANIE OZNACZENIA

Przygotowanie hemolizatu moczu:

Mocz przed oznaczeniem należy rozcieńczyć wodą destylowaną w stosunku 1:49 i odwirować przez 15 minut przy 4000 obr./min. Do oznaczenia użyć supernatantu rozcieńczonego moczu.

Wykonać trzy próby wg poniższej tabelki: badaną, wzorcową i odczynnikową.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Próba badana  | Próba wzorcowa | Próba odczynnikowa |
| Materiał badany (mocz) | 0,5ml |  |  |
| Wzorzec |  | 0,5ml |  |
| H2O |  |  | 0,5ml |
| Odczynnik odbiałczający | 0,5ml | 0,5ml | 0,5ml |

Dobrze wymieszać i dodać po 1ml odczynnika roboczego, wymieszać i pozostawić na 20 minut w temperaturze pokojowej. (Odczynnikiem roboczym jest mieszanina 0,035M kwasu pikrynowego (odczynnika 2) i 1,6mM wodorotlenek sodu (odczynnika 3) w stosunku 1:1).

Zmierzyć absorbancję próby badanej i wzorcowej względem próby odczynnikowej przy λ= 520nm w kuwecie o grubości warstwy d=1cm na spektrofotometrze.

OBLICZENIA

Stężenie kreatyniny w moczu obliczyć wg wzoru:



A B – absorbancja próby badanej

A WZ – absorbancja próby wzorcowej

…………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………...

Gdy znane jest stężenie kreatyniny można obliczyć zawartość gamma-glutamylotransferazy. Otrzymane stężenie GGT w moczu należy ostatecznie podzielić przez otrzymany wynik kreatyniny (mg/ml) uwzględniając w ten sposób stężenie moczu, otrzymując wartość GGT w mU/mg kreatyniny.

**GGTmU/mg kreatyniny = [(Eb-Ek)\*wsp.przeliczony z krzywej] / mg kreatyniny w moczu**

Normy GGT dla moczu:

Kobiety: 0,17-1,1µkat/l

Mężczyźni: 0,25-1,77µkat/l

1µkat/l = 60U/l