



SEMMELWEIS EGYETEM

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

SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

Plazmin koncentráció meghatározása aktivitás alapján

Készítette:

2009.01.19.

Dr. Kolev Kraszimir
részlegvezető

Dátum

Jóváhagyta:

2009.01.19.

Dr. Kolev Kraszimir
részlegvezető

Dátum

MIR szempontból
ellenőrizte:

2009.01.19.

Dr. Kolev Kraszimir
minőségirányítási vezető

Dátum

A dokumentáció kódja:	SE-OBI-H-MU-04
Változat száma:	01
Érvénybelépés időpontja:	2009.01.19.
Oldalak száma:	6
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

Plazmin koncentráció meghatározása aktivitás alapján

TARTALOMJEGYZÉK

A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS CÉLJA	4
A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS ÉRVÉNYESÉGI TERÜLETE.....	4
ILLETÉKESÉG ÉS FELELŐSSÉG MEGHATÁROZÁSA.....	4
A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS LEÍRÁSA	5



SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

Plazmin koncentráció meghatározása aktivitás alapján

A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS CÉLJA

Összefoglalja a rutinszerűen alkalmazott technológiai eljárás részleteit.

A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS ÉRVÉNYESÉGI TERÜLETE

Orvosi Biokémiai Intézet Hemosztázis részlege.

ILLETÉKESÉG ÉS FELELŐSSÉG MEGHATÁROZÁSA

A dokumentum kidolgozásáért felelős:

Részlegvezető

A dokumentum alkalmazásáért felelős:

Kutatók, oktatók

A dokumentumban foglaltak végrehajtásáért felelős:

Laborasszisztensek.

A dokumentumban szabályozott tevékenység rendszer felülvizsgálat alkalmával történő felülvizsgálatáért felelős:

A Minőségirányítási vezető



SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

Plazmin koncentráció meghatározása aktivitás alapján

A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS LEÍRÁSA

Plazmin koncentráció meghatározása aktivitás alapján

Plazmin szubsztrátból (Spectrozyme-PL) a következő hígítási sort készítjük 20 mM TRIS 150 mM NaCl pH 7,4 pufferrel (TRIS puffer) 10 mM Spectrozyme-PL törzsoldatból

$S=5/10/20/40/60/80/100/150 \mu\text{M}$

Ennek menete:

1,98 ml TRIS puffer + 20 μl 10 mM Spectrozyme-PL = 2 ml 100 μM Spectrozyme-PL

0,49 ml TRIS puffer + 7,5 μl 10 mM Spectrozyme-PL = 0,5 ml 150 μM Spectrozyme-PL

A 100 μM Spectrozyme-PL-t használjuk a további hígításokhoz:

0,475 ml TRIS puffer + 25 μl 100 μM Spectrozyme-PL = 0,5 ml 5 μM Spectrozyme-PL

0,450 ml TRIS puffer + 50 μl 100 μM Spectrozyme-PL = 0,5 ml 10 μM Spectrozyme-PL

0,400 ml TRIS puffer + 100 μl 100 μM Spectrozyme-PL = 0,5 ml 20 μM Spectrozyme-PL

0,300 ml TRIS puffer + 200 μl 100 μM Spectrozyme-PL = 0,5 ml 40 μM Spectrozyme-PL

0,200 ml TRIS puffer + 300 μl 100 μM Spectrozyme-PL = 0,5 ml 60 μM Spectrozyme-PL

0,100 ml TRIS puffer + 400 μl 100 μM Spectrozyme-PL = 0,5 ml 80 μM Spectrozyme-PL

A plazmin aktivitást szobahőn mérjük: 10 μl plazmin + 200 μl Spectrozyme-PL, 1 perc alatt mérjük az abszorbanciát 405 nm-nél Beckmann DU7500 spektrofotométeren (a plazmin törzsoldatát n -szer hígítjuk úgy, hogy a 100 μM Spectrozyme-PL-en a percenkénti abszorbancia változás $0.1 < dA < 0.15$). A plazmin törzsoldat koncentrációját (E_0) és a plazmin K_m értéke a

$$dA = k_{cat} * (E_0 / (21 * n)) * (S * \epsilon_{pNA} / 1e6) / (K_m + S)$$

egyenlethez történő regressziós analízissel történik, ahol $\epsilon_{pNA} = 8820 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $k_{cat} = 810 \text{ min}^{-1}$

A meghatározás akkor fogadható el, ha a $K_m < 20 \mu\text{M}$.

A k_{cat} az alábbi módszer szerint került meghatározásra

Active site titration of plasmin

(Bock PE, Craig PA, Olson ST, Singh P. Isolation of human blood coagulation α -factor X_a by soybean trypsin inhibitor-Sepharose chromatography and its active-site titration with fluorescein mono- p -guanidinobenzoate. Arch Biochem Biophys 1989;273:375-388.)

- 3 mM FMBG in DMSO (1 évig tárolható -20 °C-on)
- 3 mM Na-fluorescein in DMSO (1 évig tárolható -20 °C-on)
- Na-fluorescein koncentráció ellenőrzése 0,01 M NaOH-dal hígítva (kb. 2-3 μM -ra) A_{490} alapján ($\epsilon = 89125 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- titráláshoz 20 μM FMGB in 25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 75 mM NaCl pH 7,4 (mindig közvetlenül mérés előtt hígítandó!!!)



SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

Plazmin koncentráció meghatározása aktivitás alapján

- fluorescencia kalibrálás 0/2/3/5/6/8/10 μM Na-fluorescein in 25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 75 mM NaCl pH 7,4 oldatból 20 μl -t kell hozzáadni 200 μl 20 μM FMGB-hez (mérés Victor-on, Active site FMGB módszerrel, 10 perc, 3 sorozat egyszerre)
- titráláshoz 0/0,24/0,4/0,8 g/l plazminból 20 μl -t kell hozzáadni 200 μl 20 μM FMGB-hez (mérés Victor-on, Active site FMGB módszerrel, 30 perc, 3-3 párhuzam)