

**PROTOKOL ZA ODREĐIVANJA BRZINE ENZIMSKE AKTIVNOSTI
ALKALNE FOSFATAZE (AP) METODOM PO KINGU FENOLNI POSTUPAK)**

Alkalna fosfataza je intrecelularni enzim koji se nalazi u tkivu jetre i kostiju. U krv (plazmu) dospeva pasivno, nakon oštećenja pomenutih tkiva.

Fenolni postupak po Kingu je klasična, statička metoda (metoda dve tačke), za kliničko određivanje aktivnosti AP. Meri se količina fenola koju je enzim (AP) izdvojio iz supstrata (dinatrijum-fenilfosfat) tokom 15 minuta. Jedinica za izražavanje je *jedinica AP* (nesistemska).

	REDOSLED KORAKA PRI UZVOĐENJU METODE	KRATKO OBJAŠNENJE
1.	U dve epruvete sipati po 2 ml pufera i 2 ml dinatrijum-fenilfosfata (DFF).	Pufer omogućava optimalni pH sredine za rad AP, a DFF je njen supstrat .
2.	Staviti epruvete u vodeno kupatilo na 37°C, 3 minuta.	Preinkubacija - zagrevanje reakcione smeše na optimalnu temperaturu, da bi nakon dodavanja uzorka reakcija počela odmah, punom brzinom.
3.	U uzorak mikropipetom dodati tačno 200 µL krvne plazme (uzorak) i promešati (na vorteksu). U kontroli prvo dodati Folin Čukalto reagens (1,8 mL), a zatim 200 µL ispitivane plazme.	U uzorku se nalazi AP čiju aktivnost želimo da odredimo; reakcija će da teče normalno. U kontroli , Folin Čukalto reagens odmah denaturiše AP; neće biti enzimske reakcije.
4.	Staviti obe epruvete u vodeno kupatilo na 37 °C, tačno 15 minuta.	Inkubacija – tokom 15 min. na optimalnoj temperaturi odvija se enzimska reakcija, AP razlaže DFF oslobađajući fenol i fosfor.
5.	U uzorak dodati 1,8 ml Folin Čukalto reagensa i vorteksirati.	Folin Čukalto reagens denaturiše proteine i na taj način inaktivira AP, te se trenutno prekida enzimska reakcija.
6.	Centrifugirati 5 minuta na 2500 obrtaja	Uklanjanje taloga koji u sebi sadrži sve proteine. U supernatantu se nalaze proizvodi enzimske reakcije – fenol i fosfor.
7.	U kivetu odliti tačno 4 ml supernatanta , pažljivo da se ne podigne talog.	Odvaja se bistar rastvor za merenje.
8.	Dodati 2 mL karbonata i 4 ml vode .	Karbonat sa fenolom se formira jedinjenje plave boje .
9.	Staviti kivetu u vodeno kupatilo na 37 °C 10 minuta.	Razvijanje boje.
10.	Očitati vrednost absorbance na 660 nm na spektrofotometru.	Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije fenola .
11.	Izračunati vrednost aktivnosti AP unošenjem očitanih vrednosti adsorbansi. $U_{ap} = \frac{A_{uz} - A_k}{A_s} \times 30$	A_{uz} - absorbansa uzorka , A_k - absorbansa kontrole (pokazuje količinu fenola oslobođenu nezavisno od enzima AP) A_s - absorbansa standarda (pokazuje količinu fenola koja bi se oslobodila iz supstrata ako bi reakcija tekla bez zaustavljanja)