

Mesures de concentrations en activité catalytique AST : méthode standardisée IFCC

1. Questions préalables

Le document n°1 en annexe présente la procédure standardisée IFCC pour la mesure des concentrations catalytiques en aspartate aminotransférase dans les sérums.

- Écrire la réaction principale mesurée (formules chimiques planes conventionnelle). Écrire les 2 réactions indicatrices mesurées (formules chimiques planes conventionnelle sauf pour NAD^+/NADH).
- Quelle réaction doit être limitante ?
- Pourquoi apporte-t-on du pyridoxal-5'-phosphate dans le milieu réactionnel ?
- Tracer l'allure attendue de la fonction Absorbance = f(temps) pour un échantillon présentant une activité catalytique AST. Annoter le graphe : moment de l'introduction de l'échantillon, du réactif de démarrage 2-oxoglutarate, phase quasi-stationnaire.

2. Travail à réaliser et compte-rendu du travail

Le mode opératoire IFCC est présenté dans le document n°1 en annexe. On propose de travailler avec un kit selon le standard IFCC et selon un suivi total comme indiqué ci-dessous :

Dans une cuve pour photométrie :

- 2 mL de « mix » réactionnel équilibré à 37°C
- + 200 μL d'échantillon, homogénéiser, démarrer le suivi, suivre 300 s ;
- poursuivre le suivi : ajouter 200 μL de solution de 2-oxoglutarate à 37°C, homogénéiser, suivre pendant 270 s .

Soit un suivi ininterrompu pendant 570 s avec par exemple, une mesure chaque 10 s .

Mesurer :

- travail individuel, un échantillon de contrôle (notice fournie) ou l'échantillon « broyat de foie d'huître » (1 g qsp 5 mL, surnageant de centrifugation dosé , voir annexe n° 2)
- travail de groupe, un blanc réactifs (échantillon = 200 μL de NaCl 9g/L) ;
- travail de groupe, un blanc échantillon (on remplace la solution de 2-oxoglutarate par du NaCl 9g/L) ;
- travail de groupe, un échantillon « pyr » (= NaCl 9g/L + pyruvate 1g/L) ;
- travail de groupe, un échantillon « oaa » (= NaCl 9g/L + pyruvate 1g/L) ;

Rapporter les graphes obtenus. Annoter. Analyser. Conclure.

Calculer la concentration en activité catalytique [z] de l'échantillon de contrôle proposé ou du broyat hépatique d'huître.

Document n°1. Mesures d'activités catalytiques AST au standard IFCC, données techniques

Reaction Principle	Concentrations in the final complete reaction mixture for the measurement of AST
<p>AST : L-aspartate + α-ketoglutarate \rightarrow L-glutamate + oxaloacetate MDH : Oxaloacetate + NADH + H^+ \rightarrow L-malate + NAD^+ Catalysed by -NH₂ of protéins in assay : oxaloacetate \rightarrow pyruvate + CO_2 LDH : pyruvate + NADH + H^+ \rightarrow L-lactate + NAD^+</p> <p>The resulting rate of decrease in absorbance at 340 nm is directly proportional to the AST activity.</p> <p>*Aspartate aminotransferase (AST, EC 2.6.1.2) ; malate dehydrogenase (MDH, EC) ; Lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27)</p>	<p>Tampon Tris 80 mmol/l, pH 7.65 (37°C) L-aspartate 240 mmol/l NADH 0.18 mmol/l MDH > 10 $\mu\text{kat/L}$ LDH > 15 $\mu\text{kat/L}$ 2-oxoglutarate 12 mmol/l pyridoxal-5'-phosphate 0.1 mmol/L volume fraction of sample 0.0833 (1:12)</p>

Analytical system for the measurement of AST

Temperature $37.0^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$
 Wave length $339 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$
 Band width $\leq 2 \text{ nm}$
 Light path $10.00 \text{ mm} \pm 0.01 \text{ mm}$

- 2.000 ml Reaction solution
- Equilibrate to 37.0°C .
- 0.200 ml Sample
- Mix thoroughly and incubate for 300 s. At the end of the incubation time, the temperature of the solution in the cuvette shall have reached 37.0°C .
- 0.200 ml Start reagent solution
- Mix thoroughly, wait 90 s and monitor time and absorbance for additional 180 s.

If the absolute reagent blank rate exceeds $3.3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (0.002 min^{-1}) or has a reverse direction, the measurements must be repeated and if necessary the reaction solution must be discarded.

Sources of error

High pyruvate concentrations in the sample lead to high NADH consumption during the incubation period. This can reduce the upper limit of the measurement range and considerably lower the results of analyses.

Upper limit of the measurement range

If the change of absorbance exceeds 0.0022 s^{-1} (0.13 min^{-1}) in the measurement interval, an analytical portion of the sample must be diluted with 9 g/l (154 mmol/l) sodium chloride solution and the measurement procedure must be repeated with the diluted sample. The obtained value must then be multiplied by the corresponding factor of the dilution.

Remarques importantes :

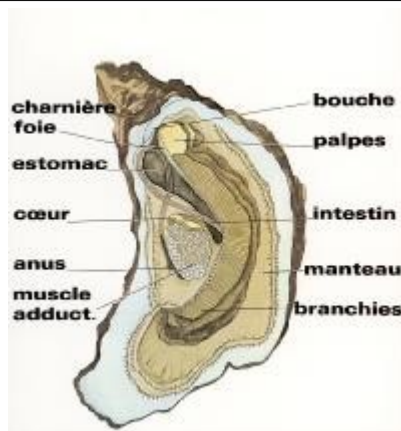
- On comprend facilement la fonction de réaction indicatrice de la réaction catalysée par la MDH. Le rôle de la LDH est moins évident. Elle permet notamment de prendre en compte la décarboxylation de l'oxaloacétate sous l'effet des fonctions amines des protéines (albumine et immunoglobulines du sérum). Ainsi, le système mesure la somme de 2 réactions indicatrices oxydant du NADH : $V_{i\text{-indic-MDH}} + V_{i\text{-indic-LDH}}$.
- Dans les conditions du système, la vitesse initiale de la réaction principale est de $0,91 V_{\text{max}}$.
- La pré-incubation de 300s a pour fonction essentielle de permettre la recharge éventuelle en coenzyme pyridoxal de l'AST et l'équilibration en température.
- La présence de concentrations élevées en pyruvate et oxaloacétate dans les échantillons à mesurer conduit évidemment à une forte diminution du NADH pendant les 300s de pré-incubation et donc à des résultats de vitesses indicatrices qui peuvent être diminuées : erreur par défaut.

Ce document annexe est adapté de :

IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C . Part 4. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of Aspartate Aminotransferase ; *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* : 2002, Volume 40(7) : 725–733

Bergmeyer HU, Hørdler M, Rej R. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. *J Clin Chem. Clin Biochem* 1986 ; 24:497–510.

R. Rej, R. E. Vanderlinde ; Assay of aspartate aminotransferase activity : effects of serum and serum proteins on oxaloacetate decarboxylation and dialysis, *Clin. Chem.* 20/4, 454-464 (1974)

Document n°2. Préparation d'un extrait hépatique d'huître

Repérer les 2 palpes labiaux de la bouche puis l'estomac entouré des diverticules digestifs dont le foie.

m g de foie dilacéré

Broyage ultraturax avec 5*m mL de tampon Tris 80 mmol/l, pH 7,65 (37°C)

Centrifugation 13 000g

Surnageant = extrait hépatique d'huître