

# Návod k praktickému cvičení z biochemie

## Téma: Hemoglobin a jeho deriváty

---

### 1. Stanovení koncentrace hemoglobinu v krvi

#### Reagencie:

#### 1. Kyanidové činidlo



- hexakynoželezitan draselný 0,20 g;
- kyanid draselný 0,05 g.
- dihydrogenfosforečnan draselný 0,14 g;
- voda do 1 000 ml

#### 2. Nesrážlivá krev – neznámý vzorek **Infekční materiál**

#### Pracovní postup:

Do zkumavky odměříme dávkovačem 5,0 ml kyanidového činidla, přidáme 0,02 ml krve, špičku ještě třikrát propláchneme kyanidovým činidlem a obsah zkumavky promícháme. Po 10 minutách změříme absorbanci vzorku proti kyanidovému činidlu při 540 nm. Zbarvení je stálé nejméně 24 hodin.

### 2. Průkaz krve a krevního barviva v moči

#### Reagencie:

#### 1. O-tolidin (3,3'- dimethylbenzidin)



#### 2. Heitz-Boyerovo činidlo (bezbarvý redukovaný fenolftalein

v alkalickém prostředí, uchováván s několika granulemi Zn)



#### 3. Kyselina octová koncentrovaná



#### 4. Peroxid vodíku (30 g/l)



#### 5. Ethanol



#### 6. Diagnostické proužky hemoPHAN nebo některé polyfunkční diagnostické proužky (Erba Lachema s.r.o.)

#### 7. Moč – vzorek s krví **Infekční materiál** normální moč **Infekční materiál**

---

**Pracovní postup:****„Benzidinová“ zkouška**

Několik zrníček o-tolidinu rozpustíme asi ve 2 ml ethanolu a okyselíme koncentrovanou kyselinou octovou. Přidáme asi 2 ml peroxidu vodíku (roztok nesmí zmodrat) a poté asi 1 – 2 ml vzorku moči s krví. Pozitivním výsledkem je modré až modrozelené zbarvení vzorku. Stejnou reakci provedeme i se vzorkem normální moči. Zkoušku s o-tolidinem provedeme také s povraženým vzorkem moči s krví, který před reakcí ochladíme.


**Heitz-Boyerova zkouška**

Ve zkumavce smícháme asi 1 ml vzorku moči s krví se stejným dílem Heitz-Boyerova činidla. Opatrně převrstvíme po stěně zkumavky peroxidem vodíku. V přítomnosti hemoglobinu vznikne na styčné ploše červenofialový prstenec. Reakci opakujeme se vzorkem normální moči.

**Průkaz krve diagnostickými proužky**

Proužek ponoříme do vyšetřované moči. Otřením o okraj nádoby odstraníme přebytečnou moč a asi po 60 s hodnotíme vzniklé zbarvení srovnáním s barevnými srovnávacími stupnicemi pro detekci intaktních erytrocytů – tečkovaná stupnice a volného hemoglobinu – homogenně zbarvená stupnice. Diagnostickým proužkem vyšetříme vzorek moči s krví i vzorek normální moči.

**3. Spektrofotometrické vyšetření hemoglobinu a jeho derivátů****Reagencie:**

1. Hexakynoželezitan draselný  $K_3[Fe(CN)_6]$
2. Dithioničitan sodný  $Na_2S_2O_4$  
3. Neředěná nesrážlivá krev **Infekční materiál**
4. Neředěná nesrážlivá krev sycená CO **Infekční materiál**

**Pracovní postup:**

U jednotlivých derivátů hemoglobinu proměříme absorpční spektra **v rozsahu vlnových délek od 500 do 600 nm**. Spektrofotometr vynulujeme proti destilované vodě.

**Oxyhemoglobin (O<sub>2</sub>Hb)**

Převažuje ve vzorcích krve stojících na vzduchu. Ke 4 ml destilované vody přidáme 0,02 ml krve a proměříme absorpční spektrum. V případě vysokých absorbancí můžeme zvolit vyšší ředění.

**Deoxyhemoglobin (Hb)**

Připravený vzorek oxyhemoglobinu zredukujeme přidáním malého množství (špička lžičky) dithioničitanu sodného a po 2 – 5 minutách změříme spektrum. Porovnáme výsledky měření O<sub>2</sub>Hb a Hb a též si všimáme zbarvení vzorků.

**Hemoglobin (methemoglobin)**

Ke 4 ml destilované vody přidáme 0,02 ml krve a jako oxidační činidlo velmi malé množství hexakvanoželezitanu draselného. Asi po 5 – 10 minutách změříme spektrum a porovnáme je s hodnotami získanými měřením oxyhemoglobinu. Zaznamenáme změnu zbarvení. Poté roztok hemoglobinu zpětně zredukujeme přidáním malého množství dithioničitanu sodného. Pozorujeme změnu zbarvení a opět změříme spektrum.

**Karbonylhemoglobin**

Ke 4 ml destilované vody přidáme 0,02 ml krve syčené CO. Hodnotíme zbarvení a proměříme spektrum. Všimáme si posunu vrcholů spektra při vlnové délce 570 nm ve srovnání s oxyhemoglobinem, který má vrchol při 578 nm. Tohoto posunu se využívá při stanovení koncentrace karbonylhemoglobinu v krvi při otravách CO. Přidáním dithioničitanu se COHb nepřevéde na Hb (karbonylhemoglobin je stabilní).

**4. Pulzní oxymetrie – modelový pokus****Reagencie:**

1. Vzorek naředěné krve s vyšší saturací kyslíku – vzorek 1 **Infekční materiál**
2. Vzorek naředěné krve s nižší saturací kyslíku – vzorek 2 **Infekční materiál**
3. Slepý vzorek – plazma naředěná ve stejném poměru jako vzorky krve **Infekční materiál**

**Pracovní postup:**

V naší úloze se soustředíme na spektrální stránku pulzní oxymetrie. Přístroj vynulujte na připravený slepý vzorek (naředěná plazma). Budeme mít k dispozici dva vzorky krve. Hodnoty absorbance získané měřením vzorku s vyšší saturací kyslíku budou v experimentu nahrazovat pulzující složku absorbance. Hodnoty absorbance získané měřením krve s nižší saturací kyslíku budou představovat statickou složku absorbance. U obou vzorků krve změřte absorbanci při 660 nm a 940 nm a výsledky zaznamenejte do tabulky. Vzorky a slepý vzorek jsou připraveny v kyvetách u spektrofotometrů.

**5. Stanovení koncentrace železa v séru kolorimetrickou metodou****Reagencie:**

K analýze je použita komerční souprava: **IRON – FERAZINE** firmy **Biosystems**

**Roztok A:** guanidinium chlorid 1 mmol/l  
acetátový pufr 0,4 mol/l pH 4.0

**Roztok B:** Ferozin:3-(2-pyridyl)-5,6-bis-(4-sulfofenyl)-1,2,4-triazin di Na sůl 8 mmol/l  
kyselina askorbová 200mmol/l

**Pracovní roztok:**



**Roztok A + roztok B 4:1**

**Standardní roztok Fe<sup>2+</sup>** (koncentrace je uvedena na štítku)



**Sérum** – neznámý vzorek **Infekční materiál**

**Pracovní postup:**

Do 4 označených zkumavek napipetujeme příslušné objemy roztoků podle schématu:

Odměřit v ml:	Zkumavka 1 Vzorek séra	Zkumavka 2 Standard	Zkumavka 3 Slepý vzorek 1	Zkumavka 4 Slepý vzorek 2
Sérum	0,2	-	-	0,2
Standardní roztok	-	0,2	-	-
Deionizovaná voda	-	-	0,2	-
Roztok A	-	-	-	1,0
Pracovní roztok	1,0	1,0	1,0	-

Zkumavky necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a pak změříme absorbance vzorku, standardu a slepého vzorku 1 a 2 proti destilované vodě v 1 cm kyvetě při 560 nm.