

ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY 1. LF UK A VFN

Metabolismus vápníku a fosforu. Osteoporóza

Praktické cvičení z lékařské biochemie

Všeobecné lékařství

Lenka Fialová



2024/2025

Obsah


ÚLOHA 1 – STANOVENÍ KONCENTRACE ANORGANICKÝCH FOSFÁTŮ V SÉRU A V MOČI.....	3
ÚLOHA 2 – STANOVENÍ KONCENTRACE CELKOVÉHO VÁPNIKU V SÉRU A V MOČI	3
ÚLOHA 3 – STANOVENÍ KATALYTICKÉ KONCENTRACE ALKALICKÉ FOSFATASY A JEJÍCH IZOFOREM	4
ÚLOHA 4 – ROZPUSTNOST RŮZNÝCH VÁPENATÝCH SOLÍ	5

Úloha 1 – Stanovení koncentrace anorganických fosfátů v séru a v moči

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava Bio-La-Test Fosfor UV liquid 250 firmy Erba-Lachema s.r.o.

1. Pracovní roztok

- a. Kyselina sírová  210 mmol/l
- b. Molybdenan amonný 650 mmol/l
2. **Standardní roztok** fosfátů
3. **Sérum** - neznámý vzorek (infekční materiál)
4. **Moč** - neznámý vzorek (infekční materiál)

Pracovní postup:

Do **umělohmotných jednorázových zkumavek** odměříme reagencie podle rozpisu v tabulce:

Odměřit v ml	Zkumavka 1 Vzorek séra	Zkumavka 2 Vzorek moči	Zkumavka 3 Standard	Zkumavka 4 Slepý vzorek
Pracovní roztok	1,0	1,0	1,0	1,0
Sérum	0,01	–	–	–
Moč	–	0,01	–	–
Standardní roztok	–	–	0,01	–
Čištěná voda	–	–	–	0,01

Promícháme a inkubujeme 5 minut při 37 °C. Poté změříme absorbanci vzorku séra, moči a standardu proti slepému vzorku v 1 cm kyvetě při vlnové délce 340 nm. Zbarvení je stabilní po dobu 60 minut.

Úloha 2 – Stanovení koncentrace celkového vápníku v séru a v moči

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava Bio-La-Test Vápník Liquid 250 Erba-Lachema s.r.o.

1. **Pracovní roztok** [MES (2-morfolino-ethansulfonová kyselina) pufr, pH 6,5 (37 °C) 100 mmol/l; arsenazo III 200 μmol/l]
2. **Standardní roztok kalcia**
3. **Sérum** – neznámý vzorek (infekční materiál)
4. **Moč** – neznámý vzorek (infekční materiál)

Pracovní postup:

Do umělohmotných jednorázových zkumavek odměříme reagentie podle rozpisu v tabulce:


Odměřit v ml	Zkumavka 1 Vzorek séra	Zkumavka 2 Vzorek moči	Zkumavka 3 Standard	Zkumavka 4 Slepý vzorek
Pracovní roztok	1,0	1,0	1,0	1,0
Sérum	0,01	–	–	–
Moč	–	0,01	–	–
Standardní roztok	–	–	0,01	–
Čištěná voda	–	–	–	0,01

Obsah zkumavek promícháme a inkubujeme 1 minutu při 37 °C. Změříme absorbance vzorku séra, moči a standardu proti slepému vzorku v 1 cm kyvetě při vlnové délce 650 nm. Zbarvení je stabilní po dobu 60 minut.

Úloha 3 – Stanovení katalytické koncentrace alkalické fosfatasy a jejích izoforem

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava Bio-La-Test Alkalická fosfatasa 120 firmy Erba-Lachema s.r.o.

1. **Substrát** [[4-nitrofenylfosfát](#)] (disodná sůl) 15 mmol/l] (koncentrace odpovídají hodnotám v reakční směsi)
2. **Pufr** [[N-methyl-D-glukaminový](#) pufr (pH 10,1; 37 °C) 0,35 mol/l; NaCl 70,0 mmol/l; MgCl₂ 0,5 mmol/l] (koncentrace odpovídají hodnotám v reakční směsi)
3. **Inhibitor** (hydroxid sodný 1,0 mol/l; [Chelaton 3](#) 30 mmol/l) 
4. **Sérum** – neznámý vzorek (infekční materiál)

A. Stanovení katalytické koncentrace celkové ALP a jejích izoforem metodou konstantního času

Pracovní postup:

Sérum, které je v tabulce označeno T, před analýzou tepelně inaktivujeme v termostatu při teplotě 56 °C po dobu 10 minut a poté ochladíme v ledové lázni. **Inaktivace vzorků označených T je již provedena.**

Odměřit v ml	Zkumavka 1 Vzorek s nativním sérem (S1)	Zkumavka 2 Kontrolní vzorek s nativním sérem (S2)	Zkumavka 3 Vzorek s tepelně inaktivovaným sérem (T1)	Zkumavka 4 Kontrolní vzorek s tepelně inaktivovaným sérem (T2)
Pufr	1,0	1,0	1,0	1,0
Sérum	0,02	–	0,02	–
Obsah zkumavek promícháme a inkubujeme 5 minut při 37 °C				
Substrát	0,2	0,2	0,2	0,2
Obsah zkumavek promícháme a inkubujeme přesně 10 minut při 37 °C				
Inhibitor	0,5	0,5	0,5	0,5
Sérum	–	0,02	–	0,02
Promícháme a do 30 minut změříme absorbanci vzorků S1, S2, T1 a T2 proti čišťené vodě v 1 cm kyvetě při vlnové délce 420 nm.				

B. Stanovení katalytické koncentrace celkové alkalické fosfatasy kineticky

Pracovní postup:





- Kyvety jsou vytemperovány na 37 °C.
- Vynulujeme fotometr na slepý vzorek (čištěná voda).
- Do kyvety připravíme reakční směs podle tabulky:

Odměříme v ml:	
Pufř	1,0
Sérum nativní (S)	0,02
Promícháme a 5 minut preinkubujeme při teplotě 37 °C	
Substrát	0,2

- Dobře promícháme a přesně za 30s změříme A při vlnové délce 420 nm.
- Měření opakujeme ještě 5× v přesně jednominutových intervalech.

Úloha 4 – Rozpustnost různých vápenatých solí

Reagencie:

- Chlorid vápenatý  pevná substance
- Fosforečnan vápenatý  pevná substance
- Uhličitan vápenatý pevná substance
- Šťavelan amonný  nasycený roztok
- Kyselina chlorovodíková  zředěná
- Hydrogenuhlíčan sodný 10 g/l
- Na₂EDTA nasycený roztok
- Laktosa 10 g/l

A. Rozpustnost vápenatých solí ve vodě a HCl

Pracovní postup:

- Do čtyř centrifugačních zkumavek nasypeme odměrku příslušné vápenaté soli (viz tabulka).

Zkumavka 1 CaCl ₂	Zkumavka 2 CaCO ₃	Zkumavka 3 Ca ₃ (PO ₄) ₂	Zkumavka 4 Ca ₃ (PO ₄) ₂ + Na ₂ EDTA
--	--	--	--

- Do každé zkumavky přidáme 1,5 ml čištěné vody.
- Promícháme a pozorujeme rozpustnost jednotlivých vápenatých solí ve vodě.
- Do 2. – 4. zkumavky postupně přikapáváme zředěnou kyselinu chlorovodíkovou. Do tabulky v protokolu poznamenáme, kolik kapek zředěné kyseliny chlorovodíkové bylo zapotřebí k rozpuštění solí.

- e. Do 3. zkumavky s rozpuštěnou solí přikapáváme hydrogenuhličitan sodný a pozorujeme vznik sraženiny.
- f. Do 4. zkumavky přidáme cca 8 kapek nasyceného roztoku Na₂EDTA a pak stejný počet kapek hydrogenuhličitanu sodného jako ve 3. zkumavce. Na₂EDTA zabrání vzniku sraženiny.
- g. Výsledky rozpustnosti zapíšeme do tabulky.

B. Vliv některých látek na rozpustnost vápenatých solí

Pracovní postup:

Podle tabulky připravíme do dvou zkumavek následující reagenty:

	Zkumavka 1 CaCl ₂ + šťavelan amonný	Zkumavka 2 CaCl ₂ + laktosa
CaCl ₂	1 odměrka	1 odměrka
Čištěná voda	1 ml	1 ml
Šťavelan amonný	cca 5 kapek	–
Laktosa	–	cca 5 kapek