

Tetrapyrroly, játra, hemokoagulace. Kardiomarkery

Praktické cvičení z lékařské biochemie

Všeobecné lékařství

Libuše Kadlecová, Lenka Fialová



2024/2025

Obsah

ÚLOHA 1 – STANOVENÍ CELKOVÉHO BILIRUBINU V SÉRU.....	3
ÚLOHA 2 – STANOVENÍ PŘÍMÉHO BILIRUBINU V SÉRU.....	3
ÚLOHA 3 – FLUORESCENCE A SPEKTROFOTOMETRIE HEMATOPORFYRINU	4
ÚLOHA 4 – STANOVENÍ AKTIVITY γ -GLUTAMYLTRANSFERÁZY (GGT)	5
ÚLOHA 5 – VYŠETŘENÍ ZÁKLADNÍCH KOAGULAČNÍCH PARAMETRŮ KOAGULOMETREM.....	5
ÚLOHA 6 – POCT VYŠETŘENÍ TROPONINU	5

Úloha 1 – Stanovení celkového bilirubinu v séru

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava BioSystems Bilirubin (celkový – T – total)

1. **Činidlo AT:** kyselina sulfanilová 29,0 mmol/l, kyselina chlorovodíková 0,2 mol/l, cetrimid 50 mmol/l (tetradecyltrimethylammoniumbromid)  
2. **Činidlo BT:** dusitan sodný 11,6 mmol/l  
3. **Pracovní činidlo:** připravit smícháním 0,5 ml činidla BT + 2 ml činidla AT   
4. **Sérum** – neznámý vzorek (infekční materiál)

Postup:

Podle tabulky připravíme do 3 zkumavek reakční směsi takto:

	Srovnávací roztok 1	Srovnávací roztok 2	Vzorek séra
Čištěná voda	100 µl	–	–
Vzorek séra	–	100 µl	100 µl
Činidlo AT	–	1 ml	–
Pracovní činidlo	1 ml	–	1 ml

Zkumavky promícháme a necháme stát 2 min při pokojové teplotě.

Změříme absorbanci vzorku séra a srovnávacího roztoku 2 při 540 nm proti srovnávacímu roztoku 1.

Úloha 2 – Stanovení přímého bilirubinu v séru

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava BioSystems Bilirubin (přímý – D – direct)

1. **Činidlo AD:** kyselina sulfanilová 35,0 mmol/l, kyselina chlorovodíková 0,24 mol/l,  
2. **Činidlo BD:** dusitan sodný 3,5 mmol/l  
3. **Pracovní činidlo:** připravit smícháním 0,5 ml činidla BD + 2 ml činidla AD   
4. **Sérum** – neznámý vzorek (infekční materiál)

Pracovní postup:

Podle tabulky připravíme do 3 zkumavek reakční směsi takto:

	Srovnávací roztok 1	Srovnávací roztok 2	Vzorek séra
Čištěná voda	100 µl	–	–
Vzorek séra	–	100 µl	100 µl
Činidlo AD	–	1 ml	–
Pracovní činidlo	1 ml	–	1 ml

Zkumavky promícháme a necháme stát přesně 5 min při teplotě 37 °C.

Změříme absorbanci vzorku séra a srovnávacího roztoku 2 při 540 nm proti srovnávacímu roztoku 1.

Úloha 3 – Fluorescence a spektrofotometrie hematoporfyrinu

Fluorescence hematoporfyrinu

Reagencie:

1. **Koncentrovaná kyselina sírová**



Při práci s koncentrovanou kyselinou sírovou dbejte zvýšené opatrnosti. Oči si chraňte štítem

2. **Ředěná krev** (infekční materiál)

3. **Vzorky moče** (infekční materiál)

Postup:

V předem připravených vzorcích krve a moči s kyselinou sírovou pozorujte vzniklý hematoporfyrin pod UV lampou při 366 nm. Vzorek intenzivně červeně fluoreskuje. Fluorescence pod UV lampou je dobře patrná i po dalším zředění vzorku. Současně pod UV lampu vložte i zkumavku se samotnou kyselinou sírovou.

Podobná fluorescence je patrná i u moči obsahujících porfyriny.

Spektrofotometrie hematoporfyrinu

Postup:

Stejně předchozí vzorky (již připravené v uzavřených kyvetách) u fotometrů proměřte v rozmezí vlnových délek 350 – 700 nm proti zředěné kyselině sírové.

Úloha 4 – Stanovení aktivity γ -glutamyltransferázy (GGT)

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava BioSystems Gamma-Glutamyltransferase

1. **Pracovní roztok** ([L- \$\gamma\$ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid](#) 6,5 mmol/l v pufru složeném z [glycylglycinu](#) 165 mmol/l a hydroxidu sodného 104 mmol/l, pH 7,9) 
2. **Sérum** – neznámý vzorek

Postup:

Pracovní roztok a kyvetu předejdeme 5 minut na 37° C. Dále postupujeme podle tabulky.

Do kyvety odměříme v ml	Vzorek
Pracovní roztok	1,0
Sérum	0,1

Promícháme, inkubujeme přibližně 30 s při 37 °C a pak změříme v 1cm kyvetě proti čisté vodě počáteční absorbanci (A_0) při 405 nm. Dále pokračujeme v jednominutových intervalech po dobu 3 minut v odečítání dalších absorbancí (A_1 – A_3).

Úloha 5 – Vyšetření základních koagulačních parametrů koagulometrem

Bude demonstrováno vyučujícím.

Úloha 6 – POCT vyšetření troponinu

Bude demonstrováno vyučujícím.