

Návod k praktickému cvičení z biochemie

Téma: Žlučová barviva a porfyriny

1. Diazotace a azokopulace

Reagencie:

1. Kyselina sulfanilová (Diazo I. činidlo) 5 g/100 ml, 0,6 mol/l HCl



2. Dusitan sodný (Diazo II. činidlo) 5 g/100 ml dest. vody



3. uhličitan sodný 10 g/100 ml dest. vody

4. β -naftol 2 g/100 ml ethanolu



5. tyrosin 0,2 g/100 ml 0,1 mol/l HCl

Pracovní postup:

- 1) K 1 ml kys. sulfanilové (Diazo I.) se přidá asi 5 kapek dusitanu sodného (Diazo II.). Do této směsi se přikapává roztok β -naftolu, vzniká červenooranžové azobarvivo.
- 2) K 1 ml kys. sulfanilové (Diazo I.) se přidá asi 5 kapek dusitanu sodného (Diazo II.), po promíchání se přikapává asi 0,5 ml roztoku uhličitanu sodného do slabě kyselé, až neutrální reakce. Do této směsi se přikapává roztok tyrosinu, vzniká další červené azobarvivo. Pokud by zbarvení nevznikalo, je třeba přidat opatrně roztok uhličitanu sodného.

2. 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: již připraveno z předchozích činidel v poměru dle návodu



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
Destilovaná voda	100 µl	-	-
Vzorek séra	-	100 µl	100 µl
Činidlo AT	-	1 ml	-
Pracovní činidlo	1 ml	-	1 ml

Zkumavky promíchat a nechat stát 2 min při pokojové teplotě.
Změřit absorbanci vzorku séra a srovnávacího roztoku 2 při 540 nm proti srovnávacímu roztoku 1.

3. 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:** již připraveno z předchozích činidel v poměru dle návodu



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
Destilovaná voda	100 µl	-	-
Vzorek séra	-	100 µl	100 µl
Činidlo AD	-	1 ml	-
Pracovní činidlo	1 ml	-	1 ml

Zkumavky promíchat a nechat stát přesně 5 min při teplotě 37 °C.
Změřit absorbanci vzorku séra a srovnávacího roztoku 2 při 540 nm proti srovnávacímu roztoku 1.

4. Fluorescence a spektrofotometrie hematoporfyrinu

A) 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)

Pracovní 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 lampou vložte i zkumavku se samotnou kyselinou sírovou.

Podobná fluorescence je patrná i u moči obsahujících porfyriny.

B) Spektrofotometrie hematoporfyrinu

Pracovní postup:

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