Návod k praktickému cvičení z biochemie

Téma: Bílkoviny v séru a v moči

---

1. Stanovení celkové bílkoviny v séru biuretovou metodou

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava Celková bílkovina liquid 500 S Bio-La-Test od firmy Erba-Lachema s.r.o.

1. Biuretové činidlo

Síran měďnatý	12,0 mmol/l
Vinan draselno-sodný	31,9 mmol/l
Hydroxid sodný	0,6 mol/l
Jodid draselný	30,1 mmol/l

2. Standardní roztoky bílkovin

Standard 1 (S1)	20 g/l
Standard 2 (S2)	40 g/l
Standard 3 (S3)	60 g/l
Standard 4 (S4)	80 g/l
Standard 5 (S5)	100 g/l

3. Vzorek séra o neznámé koncentraci

4. Deionizovaná voda

Pracovní postup:

Připravíme a označíme 7 zkumavek. Napipetujeme do nich příslušné roztoky dle tabulky:

Odměřit v ml	**Zkumavka 1**	**Zkumavka 2**	**Zkumavka 3**	**Zkumavka 4**	**Zkumavka 5**	**Zkumavka 6**	**Zkumavka 7**
	Standard 1 20 g/l	Standard 2 40 g/l	Standard 3 60 g/l	Standard 4 80 g/l	Standard 5 100 g/l	Neznámý vzorek	Slepý vzorek
Biuretové činidlo	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Standardní roztok 1–5	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	–	–
Sérum (neznámý vzorek)	–	–	–	–	–	0,02	–
Deionizovaná voda	–	–	–	–	–	–	0,02
Obsah zkumavek promícháme a necháme 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Chráníme před působením přímého světla. Po skončení inkubace změříme absorbance standardních roztoků 1 až 5 („A1“ až „A5“) a neznámého vzorku („A vzorku“) proti slepému vzorku v 1cm kyvetě při vlnové délce 540 nm.							

Určete koncentraci celkové bílkoviny v séru:

1. Pomocí kalibračního faktoru
2. Odečtením z kalibrační křivky
3. Pomocí jednoho standardního roztoku

Metoda jednoho standardu se v klinicko-biochemické diagnostice pro svou jednoduchost používá nejčastěji. Moderní automatické analyzátory vypočítávají faktor na základě změření standardu a absorbance neznámých vzorků pak přepočítávají na koncentrace.

2. Stanovení koncentrace albuminu v séru

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava Albumin BioSystems S.A. (Španělsko)

1. Činidlo

Bromkresolová zeleň	0,27 mmol/l
Acetátový pufr pH 4,2	100,0 mmol/l
Detergent	2,0 g/l

2. Standardní roztok albuminu
3. Vzorek séra o neznámé koncentraci – nelze zcela vyloučit bezinfekčnost vzorku
4. Deionizovaná voda

Pracovní postup:

Připravíme a označíme 3 zkumavky. Napipetujeme do nich roztoky dle tabulky:

Odměřit v ml	**Zkumavka 1 Vzorek**	**Zkumavka 2 Standard**	**Zkumavka 3 Slepý vzorek**
Činidlo	1,0	1,0	1,0
Sérum	0,01	–	–
Standard	–	0,01	–
Deionizovaná voda	–	–	0,01
Obsah zkumavek promícháme a necháme inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě. Změříme absorbanci séra a standardu proti slepému vzorku v 1cm kyvetě při 630 nm.			

3. Hodnocení elektroforézy bílkovin v séru

Pracovní postup:

K dispozici budou již hotové elektroforeogramy sérových bílkovin. Vyhodnoťte 3 z nich. Zakreslete jejich denzitometrické záznamy a určete, o jaký typ dysproteinémie se jedná.

4. Kvalitativní stanovení bílkovin v moči

Reagencie:

1. Kyselina sulfosalicylová dihydrát 200 g/l
2. Vzorek moči s bílkovinou - – nelze zcela vyloučit bezinfekčnost vzorku
3. Vzorek moči bez bílkoviny
4. Diagnostický proužek s reakční zónou pro bílkoviny

Pracovní postup:

Zkouška s kyselinou sulfosalicylovou: k asi 1 ml vzorku přidáme několik kapek roztoku kyseliny sulfosalicylové. Sledujeme, zda vznikne zákal či sraženina. Změnu je vhodné hodnotit proti tmavému pozadí nebo proti stránce s textem. Reakci provedeme se vzorkem s bílkovinou a se vzorkem bez bílkoviny.

Zkouška diagnostickým proužkem: Diagnostický proužek ponoříme na 1 s celou funkční zónou do vzorku moči. Po vyjmutí položíme proužek na savou podložku, aby se odstranil přebytek moči. Po 60 s odečteme zbarvení srovnáním s barevnou stupnicí na obalu tuby od diagnostických proužků.

Proveďte kvalitativní zkoušky na bílkoviny oběma metodami ve vzorcích moči, výsledky zaznamenejte a porovnejte.

5. Kvantitativní stanovení bílkovin v moči

Reagencie:

Pro analýzu je použita komerční souprava Celková bílkovina 600 M firmy SKALAB Svitavy

1. Pufr

Benzoan sodný	6,94 mmol/l
Kyselina jantarová	100,0 mmol/l
Molybdenan sodný	0,12 mmol/l
Šťavelan sodný	2,09 mmol/l
Detergenty a stabilizátory	

2. Chromogen

Pyrogallolová červeň	0,14 mmol/l
Stabilizátory	

3. Standardní roztok bílkoviny
4. Neznámý vzorek moči – nelze zcela vyloučit bezinfekčnost vzorku

Pracovní postup:

Připravíme a označíme 3 zkumavky. Napipetujeme do nich roztoky dle tabulky:

Odměřit v ml	**Zkumavka 1 Vzorek**	**Zkumavka 2 Standard**	**Zkumavka 3 Slepý vzorek**
Moč	0,03	–	–
Standard	–	0,03	–
Deionizovaná voda	–	–	0,03
Pufr	0,5	0,5	0,5
Chromogen	0,5	0,5	0,5
Obsah zkumavek promícháme a necháme inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Změříme absorbanci vzorku moči a standardu proti slepému vzorku v 1cm kyvetě při vlnové délce 600 nm.			

6. Hodnocení elektroforézy bílkovin v moči

Pracovní postup:

K dispozici budou již hotové elektroforeogramy bílkovin v moči. Vyhodnoťte 3 z nich. Zakreslete polohu frakcí a určete, o jaký typ proteinurie se jedná.