

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

Spektrofotometrie

Praktické cvičení z lékařské biochemie

Všeobecné lékařství



2024/2025

Obsah

| | |
|---|----------|
| ÚLOHA 1 – STANOVENÍ CELKOVÉ BÍLKOVINY V SÉRU BIURETOVOU REAKCÍ | 3 |
| ÚLOHA 2 – STANOVENÍ KATALYTICKÉ AKTIVITY LAKTÁTDEHYDROGENASY V SÉRU WARBURGOVÝM OPTICKÝM TESTEM..... | 5 |
| ÚLOHA 3 – SPEKTROFOTOMETRICKÉ VYŠETŘENÍ MOZKOMÍŠNÍHO MOKU | 9 |

Úloha 1 – Stanovení celkové bílkoviny v séru biuretovou reakcí

Princip:

Spektrofotometricky se koncentrace látky obvykle stanoví měřením absorbance při vlnové délce jejího absorpčního maxima a porovná se s absorbancí jednoho nebo více standardů o známé koncentraci stanovované látky.

Hodnotu koncentrace stanovované látky můžeme určit:

1. graficky odečtem z kalibračního grafu
2. výpočtem z kalibračního grafu metodou kalibračního faktoru
3. výpočtem metodou jednoho standardu

V lékařství zjišťujeme koncentrace celé řady látek v různých biologických materiálech (sérum, moč, mozkomíšní mok a další), které představují složitou soustavu obsahující značné množství látek různé chemické povahy. Každá z látek je charakterizovaná individuálními optickými vlastnostmi. Některé látky mají takové optické vlastnosti, které umožňují jejich přímou fotometrii. Avšak vlastnosti většiny látek nedovolují jejich přímé fotometrické stanovení. Je proto nutné konkrétní analyt převést na produkt vhodný k fotometrii. K tomu jsou využívány různé chemické reakce, označované jako indikační.



Možnosti zjištění koncentrace určité látky spektrofotometricky budou demonstrovány na příkladu stanovení tzv. „celkové bílkoviny“ v séru, pro níž je jako indikační reakce využívána biuretová reakce. Je založena na vzniku barevné komplexní sloučeniny Cu^{2+} s ionty peptidových vazeb v alkalickém prostředí. Intenzita zbarvení komplexu je přímo úměrná koncentraci bílkovin a hodnotí se fotometricky. Vyšetření nerozlišuje konkrétní specifické bílkoviny v analyzovaném vzorku.

Stanovení celkové bílkoviny patří k základním biochemickým vyšetřením v séru/plazmě. Vyšetření koncentrace celkové bílkoviny nám poskytuje orientační informaci o biosyntéze, utilizaci a exkreci bílkovin. Kvantitativní změny ve složení sérových bílkovin mohou být důsledkem různých onemocnění.

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. Zásobní standardní roztok bílkoviny 100 g/l

3. Vzorek séra o neznámé koncentraci

Postup:

Příprava roztoků pro kalibrační křivku

Ze zásobního standardního roztoku bílkoviny připravte 5 roztoků o koncentracích uvedených v tabulce. K ředění použijte čistou vodu.

1. Vypočítejte potřebné objemy zásobního roztoku standardu bílkoviny a čisté vody, potřebných k přípravě 0,1 ml jednotlivých naředěných standardů a hodnoty doplňte do tabulky.

| Zkumavka č. | Čištěná voda | Zásobní standardní roztok bílkoviny | Koncentrace bílkoviny ve standardních roztocích |
|-------------|--------------|-------------------------------------|---|
| 1 | – | 0,1 ml | 100 g/l |
| 2 | | | 80 g/l |
| 3 | | | 60 g/l |
| 4 | | | 40 g/l |
| 5 | | | 20 g/l |

2. Připravte a označte 5 zkumavek (1–5). Do jednotlivých zkumavek pipetujte vypočítané objemy zásobního standardního roztoku a čisté vody a poté obsah ve zkumavce promíchejte. K odměřování objemů používejte automatické pipety – výsledky kvantitativní analýzy závisí na přesnosti pipetování.

Provedení biuretové reakce

3. Připravte a označte další sadu 7 zkumavek (1–7). Podle tabulky do nich pipetujte příslušné roztoky.

| 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 | – |
| Čištěná voda | – | – | – | – | – | – | 0,02 |

4. Obsah zkumavek promíchejte a nechte 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Chraňte před působením přímého světla.

- Proměřte absorpční spektrum roztoku ve zkumavce č. 1 proti slepému vzorku (zkumavka č. 7) v oblasti viditelné části spektra (380–740 nm). Určete vlnovou délku absorpčního maxima barevné komplexní sloučeniny Cu^{2+} s ionty peptidových vazeb. Tuto vlnovou délku nastavíte na svých spektrofotometrech.
- Proti slepému vzorku (zkumavka č. 7) proměřte absorbance u všech standardních roztoků a také neznámého vzorku.

Výsledky:

- Do protokolu zakreslete absorpční spektrum barevné komplexní soli Cu^{2+} s ionty peptidových vazeb a vyznačte absorpční maximum.
- Změřené hodnoty absorbancí roztoků ve zkumavkách 1-6 zapište do tabulky.
- Z výsledků měření sestrojte kalibrační graf a vypočítejte průměrný faktor.
- Určete koncentraci celkové bílkoviny těmito způsoby:
 - graficky odečtem z kalibračního grafu
 - výpočtem z kalibračního grafu metodou kalibračního faktoru
 - výpočtem metodou jednoho standardu

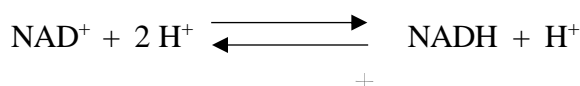
(Metoda jednoho standardu se v klinicko-biochemické diagnostice pro svou jednoduchost používá nejčastěji. Moderní automatické analyzátory vypočítávají faktor na základě změření standardu a absorbance neznámých vzorků pak přepočítávají na koncentrace.)

Úloha 2 – Stanovení katalytické aktivity laktátdehydrogenasy v séru Warburgovým optickým testem

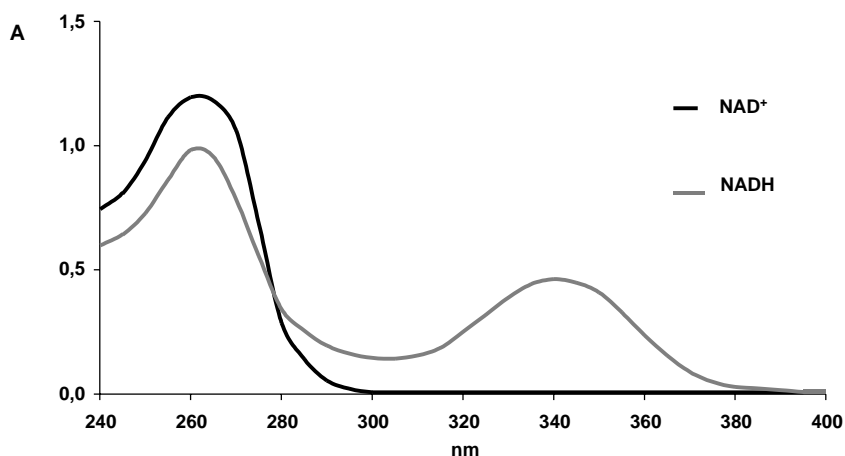
Princip:

Nikotinamidadeninukleotid, popř. nikotinamidadeninukleotidfosfát (NAD, NADP) jsou koenzymy různých oxidoredukčních enzymů. NAD (NADP) jako důležitý přenašeč redukčních ekvivalentů existuje v oxidované a redukované formě jako NAD^+ a $\text{NAD}^+ + \text{H}^+$, které se liší svými absorpčními vlastnostmi v UV oblasti. Redukovaná forma vykazuje charakteristický absorpční vrchol s maximem při 340 nm na rozdíl od formy oxidované, která při této vlnové délce neabsorbuje.

Warburgův optický test využívá odlišných absorpčních vlastností oxidované a redukované formy nikotinamidadeninukleotidu (NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$). Oxidovaná forma NAD^+ je charakterizovaná jedním absorpčním maximem při 260 nm. Redukce, při níž se ztrácí aromatický charakter pyridinu v NAD^+ a je nahrazen chinoidním uspořádáním, je doprovázena vznikem dalšího maxima při 340 nm.



Absorpční spektrum NAD⁺ a NADH

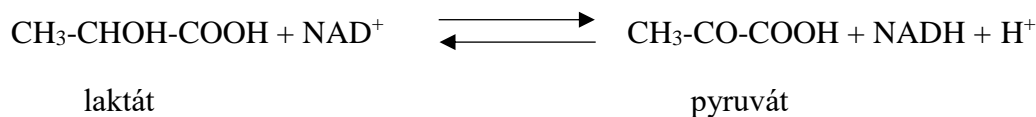


Sledováním úbytku absorbance (při oxidaci NADH+H⁺ na NAD⁺) nebo naopak přírůstku absorbance (při redukci NAD⁺ na NADH+H⁺) při 340 nm za časovou jednotku (ΔA/At, obvykle za 3 minuty) lze měřit rychlost enzymových reakcí, jejichž koenzymem je nikotinamidadenindinukleotid. Platí, že změna absorbance je přímo úměrná počtu přeměněných molekul koenzymu a že přeměna jednoho molu koenzymu odpovídá přeměně jednoho molu substrátu.

Warburgův optický test slouží např. pro stanovení aktivity enzymů, které vyžadují NAD pro svoji reakci, nebo substrátů, které mohou být přeměněny oxidoredukčními enzymy s NAD (NADP) jako koenzymy.

Jako příklad využití Warburgova optického testu v našem cvičení bude stanovení aktivity enzymu laktátdehydrogenasy (LD, EC 1.1.1.27).

Můžeme připravit reakční směs z enzymu laktátdehydrogenasy, koenzymu (NAD⁺) a příslušného substrátu (laktátu) a za optimálních podmínek zjišťovat reakční rychlost měřením změn absorbance NADH při vlnové délce 340 nm.






Aktivita enzymu se projeví v kyvetě spektrofotometru s UV-zdrojem, která obsahuje reakční směs s enzymem, substrátem a NAD⁺, plynulým vzestupem absorbance při 340 nm.

Při znalosti molárního absorpčního koeficientu NADH při této vlnové délce a přepočtu na ředění a časový interval jedné sekundy je možné vyjádřit aktivitu LD v séru v μkat/l. Není-li k dispozici kontinuální měření absorbance v čase, je možné provádět měření v kyvetě s reakční směsí diskontinuálně, např. měřením poklesu absorbance při 340 nm v intervalech po 1 minutě (ΔA_{340 nm}), a přepočíst na interval 1 s.

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava Lactatedehydrogenase-I Bio-La-Test od firmy Erba-Lachema s.r.o.

- | | | | |
|---------------|---------------------|-------------|--|
| 1. Činidlo 1: | N-Methyl D-glukamin | 406 mmol/l |  |
| 2. Činidlo 2: | N-Methyl D-glukamin | 406 mmol/l |  |
| | L-laktát | 62,5 mmol/l | |
| 3. Činidlo 3: | NAD ⁺ | 50 mmol/l |  |
| 4. Sérum | | | |

Postup:

1. Kyvety a roztoky jsou vytemperovány na 37 °C
2. Do kyvety připravte slepý vzorek:
800 µl činidla 2 (pufr a L-laktát)
200 µl činidla 1 (pufr)
20 µl séra
3. Promíchejte.
4. Podle pracovního návodu pro spektrofotometr Lightwave II₊ nastavte měření A při vlnové délce 340 nm (Lightwave II₊ - zjednodušený návod).
5. Vynulujte spektrofotometr na slepý vzorek.
6. Do druhé kyvety napipetujte:
800 µl činidla 2 (pufr a L-laktát)
200 µl činidlo 3 (NAD⁺)
20 µl séra
7. Dobře promíchejte a přesně za 1 minutu změřte A pro vlnovou délku 340 nm a запиšte do tabulky.
8. Měření opakujte ještě 5× v přesně jednominutových intervalech, absorbance запиšte do tabulky v protokolu.
9. Z naměřených hodnot absorbance A₃₄₀ vypočítejte rozdíly absorbance za minutu (ΔA₃₄₀) a z rozdílů absorbance určete průměrnou hodnotu. Získanou průměrnou hodnotu ΔA₃₄₀ použijte pro výpočet katalytické aktivity LD vztážené na 1 l neředěného séra a interval 1 s při aplikaci molárního absorpčního koeficientu koenzymu NADH pro 340 nm:

$$LD (\mu\text{kat/l}) = \Delta A_{340} \cdot 136,7$$

Vysvětlení výpočtu:

Při výpočtu enzymové aktivity vycházíme z **Lambert-Beerova zákona**:

(1)

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot c$$

(2)

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} \quad \Delta c = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot d}$$

(3)

$$\textit{katalytická aktivita enzymu} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{1}{60} \cdot \frac{V}{v} \cdot 10^6 \mu\text{mol} \cdot \textit{l}^{-1} \cdot \textit{s}^{-1}$$

Pro změnu koncentrace použijeme výraz z rovnice 2, $1/60$ je přepočítání z minuty na sekundy a V/v vyjadřuje ředění séra. Jednotkou enzymové aktivity je $\text{kat} = \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$. V klinicko-biochemických stanoveních se používají μkat ($1 \text{ kat} = 10^6 \mu\text{kat}$).

Při stanovení konkrétního enzymu, v našem případě laktátdehydrogenasy dosadíme do rovnice 3 resp. 4 konkrétní údaje.

(4)

$$\textit{katalytická aktivita enzymu LD} = \frac{\Delta A_{340}}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{1}{60} \cdot \frac{V}{v} \cdot 10^6 \mu\text{mol} \cdot \textit{l}^{-1} \cdot \textit{s}^{-1}$$

(5)

$$\textit{katalytická aktivita enzymu LD} = \frac{\Delta A_{340}}{6,22 \cdot 10^3} \cdot \frac{1}{60} \cdot \frac{1,02 \cdot 10^{-3}}{0,02 \cdot 10^{-3}} \cdot 10^6 \mu\text{mol} \cdot \textit{l}^{-1} \cdot \textit{s}^{-1}$$

(6)

$$\textit{katalytická aktivita enzymu LD} = \Delta A_{340} \cdot 136,7 \mu\text{kat} \cdot \textit{l}^{-1}$$

| symbol | | jednotka | konkrétní údaje pro LD a použitou metodu |
|------------|--|--|--|
| V | celkový objem vzorku v kyvetě | l | $1,02 \cdot 10^{-3}$ |
| v | objem přidaného séra | l | $0,02 \cdot 10^{-3}$ |
| ϵ | molární absorpční koeficient (pro NADH při 340 nm) | $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ | $6,22 \cdot 10^3$ |
| d | šířka vrstvy v kyvetě | cm | 1 |
| 10^6 | převod z mol na μmol | | 10^6 |
| 60 | převod z min na sec | | 60 |

Pozn. první tři údaje (vytištěné tučně) se mění se stanovovaným enzymem a použitou metodou, další tři - šířka vrstvy v kyvetě, převod z mol na μmol , převod z min na sec jsou zpravidla stejná pro všechna kinetická stanovení enzymových aktivit stanovovaných Warburgovým optickým testem.

Referenční hodnoty LD v séru (37 °C): 2,9 – 8,6 $\mu\text{k a t} \cdot \text{l}^{-1}$

Úloha 3 – Spektrofotometrické vyšetření mozkomíšního moku

Princip:

Analýzu absorpčního spektra lze použít pro identifikaci látky, neboť pro danou látku je absorpční spektrum charakteristické a může mít jedno, ale i více absorpčních maxim.

Jednou z možností využití vyšetření absorpčního spektra je průkaz subarachnoidálního krvácení pomocí absorpčního spektra mozkomíšního moku.

Při subarachnoidálním krvácení proniká do mozkomíšního moku krev. V mozkomíšním moku potom můžeme prokázat již za 4–8 hodin po začátku krvácení hemoglobin, který vykazuje maximální absorbanci při vlnové délce 415 nm a menší vrcholy jsou patrné při 540 nm a 580 nm. U staršího krvácení můžeme najít v mozkomíšním moku bilirubin, na který se přeměňuje hem. Bilirubin má maximum při 450 nm.

Fyziologicky je spektrofotometrická křivka mozkomíšního moku plochá nebo mírně zvýšená směrem od 600 nm do 370 nm. V oblasti viditelné části spektra jsou absorbance nižší než 0,02.

Reagencie:

Vzorky mozkomíšního moku

Postup:

Proměřte spektra tří vzorků mozkomíšního moku proti čisté vodě v rozsahu vlnových délek od 350 do 600 nm.

Výsledky:

Zakreslete absorpční spektra vzorků mozkomíšního moku, popište polohu absorpčních maxim a vyhodnoťte, zda se jedná o čerstvé nebo starší krvácení, popř. nepřítomnost krvácení.

Použitá literatura

- FIALOVÁ, L. a M. VEJRAŽKA. *Základní vyšetření mozkomíšního moku* [online]. ©2005. Poslední revize 2008, [cit. 8. 9. 2009]. <<https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/5138/01mozkomisni-mok-1112ak.pdf>>
- FIALOVÁ, L. *Návody k praktickým cvičením z lékařské biochemie s klinicko-biochemickými aplikacemi*. 2. rozš. vyd. Praha: Medprint, 2003.
- KRAML J., CRKOVSKÁ J., PLÁTENÍK J.: *Enzymy* [online], ÚLBLD, 2019/2020, ÚLBLD, [citováno 14. 08. 2024]. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/5835/enzymy20192122231.pdf/>

Další studijní materiál

Spektrofotometrie obecně

- Příspěvatelé WikiSkript, *Spektrofotometrie* [online], , c2019, Datum poslední revize 16. 03. 2019, 17:52 UTC, [citováno 14. 08. 2024] <<https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Spektrofotometrie&oldid=423160>>
- SUBHANOVÁ Iva: *Spektrofotometrie* [online], 2022/2023, ÚLBLD, [citováno 14. 08. 2024]. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/5360/uvod.pdf>

Stanovení celkové bílkoviny v séru biuretovou reakcí

- Příspěvatelé WikiSkript, *Celková bílkovina* [online], , c2018, Datum poslední revize 16. 06. 2018, 07:45 UTC, [citováno 14. 08. 2024] <https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Celkov%C3%A1_b%C3%ADlkovina&oldid=407002>

Stanovení katalytické aktivity laktátdehydrogenasy v séru Warburgovým optickým testem

- Příspěvatelé WikiSkript, *Warburgův optický test* [online], , c2022, Datum poslední revize 26. 07. 2022, 12:37 UTC, [citováno 14. 08. 2024] https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Warburg%C5%AFv_optick%C3%BD_test&oldid=456670
- Příspěvatelé WikiSkript, *Laktátdehydrogenáza* [online], , c2018, Datum poslední revize 17. 03. 2018, 11:26 UTC, [citováno 14. 08. 2024] <<https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Lakt%C3%A1tdehydrogen%C3%A1za&oldid=399790>>

Spektrofotometrické vyšetření mozkomíšního moku

- Příspěvatelé WikiSkript, *Spektrofotometrie mozkomíšního moku* [online], , c2016, Datum poslední revize 7. 03. 2016, 18:25 UTC, [citováno 14. 08. 2024] <https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Spektrofotometrie_mozkom%C3%AD%C5%A1n%C3%ADho_moku&oldid=341176>

