

Aminokyseliny – reakce a přeměny. Dusíková bilance

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství



2024/25

Obsah

ÚLOHA 1 – BAREVNÉ REAKCE AMINOKYSELIN A BÍLKOVIN	3
ÚLOHA 2 – STANOVENÍ AKTIVITY ASPARTÁTAMINOTRANSFERÁZY (AST)	7
ÚLOHA 3 – STANOVENÍ AKTIVITY ALANINAMINOTRANSFERÁZY (ALT)	8
ÚLOHA 4 – STANOVENÍ KONCENTRACE MOČOVINY V SÉRU A V MOČI	9
ÚLOHA 5 – VÝPOČET DUSÍKOVÉ BILANCE	10

Úloha 1 – Barevné reakce aminokyselin a bílkovin

Ninhydrinová reakce

Reagencie:

1. Testované vzorky:

Alanin	20 g/l
Prolin	20 g/l
Roztok vaječné bílkoviny	
Roztok želatiny	

2. Roztok ninhydrinu v ethanolu



2 g/l

Pracovní postup:

a) Do zkumavek si podle tabulky připravte následující reakční směsi:

	ZKUMAVKA 1 Alanin	ZKUMAVKA 2 Prolin	ZKUMAVKA 3 Vaječná bílkovina	ZKUMAVKA 4 Želatina
Alanin	asi 0,5 ml	–	–	–
Prolin	–	asi 0,5 ml	–	–
Vaječná bílkovina	–	–	asi 0,5 ml	–
Želatina	–	–	–	asi 0,5 ml
Ninhydrin	několik kapek	několik kapek	několik kapek	několik kapek

Obsah ve zkumavkách promíchejte, zahřívejte ve vodní lázni a zaznamenejte všechny změny zbarvení.

Xanthoproteinová reakce

Reagencie:

1. Testované vzorky:

Alanin

20 g/l

Tyrosin

1 g/l

Roztok vaječné bílkoviny

Roztok želatiny

2. Kyselina dusičná koncentrovaná



Pracovní postup:



Do zkumavek podle tabulky připravte následující reakční směsi.

	ZKUMAVKA 1 Alanin	ZKUMAVKA 2 Tyrosin	ZKUMAVKA 3 Vaječná bílkovina	ZKUMAVKA 4 Želatina
Alanin	asi 0,5 ml	–	–	–
Tyrosin	–	asi 0,5 ml	–	–
Vaječná bílkovina	–	–	asi 0,5 ml	–
Želatina	–	–	–	asi 0,5 ml
Kyselina dusičná	asi 0,5 ml	asi 0,5 ml	asi 0,5 ml	asi 0,5 ml

Obsah ve zkumavkách promíchejte, zkumavku s vaječnou bílkovinou opatrně zahřejte. Zaznamenejte všechny změny zbarvení.

Reakce na cystein

Reagencie:

1. Testované vzorky:
 - Alanin 20 g/l
 - Cystein 20 g/l
 - Roztok vaječné bílkoviny
 - Roztok želatiny
2. Octan olovnatý  50 g/l
3. Hydroxid sodný  100 g/l

Pracovní postup:



Do zkumavek podle tabulky připravte následující reakční směsi.

	ZKUMAVKA 1 Alanin	ZKUMAVKA 2 Cystein	ZKUMAVKA 3 Vaječná bílkovina	ZKUMAVKA 4 Želatina
Alanin	asi 0,5 ml	–	–	–
Cystein	–	asi 0,5 ml	–	–
Vaječná bílkovina	–	–	asi 0,5 ml	–
Želatina	–	–	–	asi 0,5 ml
Hydroxid sodný	asi 1 ml	asi 1 ml	asi 1 ml	asi 1 ml
Octan olovnatý	asi 2 – 3 kapky	asi 2 – 3 kapky	asi 2 – 3 kapky	asi 2 – 3 kapky

Obsah ve zkumavkách promíchejte a asi 5 minut povařte. Zaznamenejte všechny změny zbarvení.

Biuretová reakce – průkaz peptidových vazeb

Reagencie:

1. Močovina (pevná substance)
2. Pentahydrát síranu měďnatého $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  10 g/l
3. Hydroxid sodný  80 g/l
4. Alanin 20 g/l
5. Roztok vaječné bílkoviny
6. Želatina

Pracovní postup:

1 Příprava biureta

Ve zkumavce opatrně zahřejte 0,1 g močoviny. Při zahřívání močovina taje a rozkládá se za vzniku biureta. Poté, co tavenina utuhne v bílou hmotu, zahřívání ukončete. Po vychladnutí rozpustíte biuret v 1 ml vody.

2 Vlastní biuretová reakce

Do zkumavek podle tabulky připravte následující reakční směsi.

	ZKUMAVKA 1 Biuret	ZKUMAVKA 2 Alanin	ZKUMAVKA 3 Vaječná bílkovina	ZKUMAVKA 4 Želatina
Biuret	asi 1 ml	–	–	–
Alanin	–	asi 1 ml	–	–
Vaječná bílkovina	–	–	asi 1 ml	–
Želatina	–	–	–	asi 1 ml
NaOH	asi 1 ml	asi 1 ml	asi 1 ml	asi 1 ml
Síran měďnatý	1 kapka	1 kapka	1 kapka	1 kapka
Obsah ve zkumavkách důkladně promíchejte.				

Poznámka

Síran měďnatý přidaný v nadbytku vytváří modrou sraženinu hydroxidu měďnatého, který znesnadňuje správné hodnocení.

Pozitivní reakce se projeví vznikem fialového zbarvení, lépe patrného proti bílému pozadí.

Úloha 2 – Stanovení aktivity aspartátaminotransferázy (AST)

Reagencie:

Pro stanovení se použije komerční souprava BioLATest AST-UV L 500 firmy Erba-Lachema Diagnostika.

1. **Pracovní roztok** [(malátdehydrogenáza $\geq 12,5$ $\mu\text{kat/l}$, laktátdehydrogenáza $\geq 66,6$ $\mu\text{kat/l}$, tris-pufir (pH 7,8) 110,0 mmol/l, L-aspartát 340,0 mmol/l, pyridoxal-5'-fosfát 120,0 $\mu\text{mol/l}$)]
2. **Startér** (2-oxoglutarát 85,0 mmol/l, NADH 1,05 mmol/l)
3. **Sérum** – neznámý vzorek

Pracovní postup:

Startér před analýzou předejdeme alespoň 5 minut na teplotu 37 °C.

Kyvetu, ve které budeme provádět měření, necháme rovněž alespoň 5 minut vyhřát na 37 °C.

Odměřit v ml do kyvety:	Vzorek
Pracovní roztok	1,000
Sérum	0,100
Promícháme a inkubujeme 5–10 minut při 37 °C a pak přidáme	
Startér	0,250
Promícháme a inkubujeme 1 minutu při 37 °C	

Během jednodominutové inkubace připravíme spektrofotometr k měření nastavením vlnové délky 340 nm a nulové absorbance proti čištěné vodě. Po jednodominutové inkubaci změříme absorbanci vzorku. Pak pokračujeme v měření absorbancí v jednodominutových intervalech (přesně) po dobu 3 minut v 1cm kyvetě při vlnové délce 340 nm proti čištěné vodě.

Výpočet:

Vypočteme průměrný pokles absorbance při 340 nm za minutu (ΔA_{340}).

Katalytickou koncentraci AST vypočítáme

$$S\text{-AST } (\mu\text{kat/l}) = \Delta A_{340} \cdot 35,7$$

Úloha 3 – Stanovení aktivity alaninaminotransferázy (ALT)

Reagencie:

Pro stanovení je použita komerční souprava BIOLATEST® ALT-UV Liquid (Erba Lachema).

1. **Pracovní roztok** [[laktátdehydrogenáza](#) $\geq 26,6$ $\mu\text{kat/l}$, tris-pufr (pH 7,5) 110,0 mmol/l, [L-alanin](#) 567 mmol/l, [pyridoxal-5'-fosfát](#) 100 $\mu\text{mol/l}$, [2-oxoglutarát](#) 17,0 mmol/l, [NADH](#) 0,21 mmol/l]
2. **Sérum** – neznámý vzorek

Pracovní postup:

Pracovní roztok před analýzou alespoň 5 minut předejdeme na teplotu 37 °C.

Kyvetu, ve které budeme provádět měření, necháme rovněž alespoň 5 minut vyhrát na 37 °C.

Odměřit v ml do kyvety:	Vzorek
Pracovní roztok	1,00
Sérum	0,10
Promícháme a inkubujeme 1 minutu při 37 °C	

Během jednodominutové inkubace připravíme spektrofotometr k měření nastavením vlnové délky 340 nm a nulové absorbance proti čišťené vodě. Po jednodominutové inkubaci změříme absorbanci vzorku. Pak pokračujeme v měření absorbancí v jednodominutových intervalech (přesně) po dobu 5 minut v 1cm kyvetě při vlnové délce 340 nm proti čišťené vodě.

Výpočet:

Vypočteme průměrný pokles absorbance při 340 nm za minutu (ΔA_{340}).

Katalytickou koncentraci ALT vypočítáme

$$S\text{-AST } (\mu\text{kat/l}) = \Delta A_{340} \cdot 29,08$$

Úloha 4 – Stanovení koncentrace močoviny v séru a v moči

Reagencie:

K analýze je použita souprava Bio-La-Test Enzymové stanovení močoviny kineticky (UREA UV KIN 6x100) Erba-Lachema s.r.o

Složení činidel

1. R1 ČINIDLO

Tris pufr	100 mmol/l
α -ketoglutarát	5,49 mmol/l
Ureasa	166,6 μ kat/l
GLDH	63,3 μ kat/l

2. R2 ČINIDLO

NADH	100 mmol/l
------	------------

Pracovní roztok:

Pracovní roztok se připraví smícháním 4 dílů činidla R1 s 1 dílem činidla R2

Standardní roztok močoviny (koncentrace $c_{\text{standardu}}$ bude uvedena)

3. **Sérum** – neznámý vzorek (infekční materiál)

4. **Ředěná moč** – neznámý vzorek (infekční materiál) (ředění bude uvedeno)

Pracovní postup:

Do vytemperované kyvety na 37 °C se postupně napipetuje množství vzorku a vytemperovaného pracovního roztoku podle tabulky, promíchá se a po 30 s se změří absorbance A_1 a za dalších 60 s se změří absorbance A_2 . Totéž se pak provede s kyvetou 2 se vzorkem moči a s kyvetou 3 se standardním roztokem močoviny.

Odměřit roztok v ml:	KYVETA 1 Vzorek séra	KYVETA 2 Vzorek moči	KYVETA 3 Standard	KYVETA 4 Reagenční blank
Sérum	0,01	–	–	–
Moč	–	0,01	–	–
Standardní roztok	–	–	0,01	–
Čištěná voda	–	–	–	0,01
Pracovní roztok	1,00	1,00	1,00	1,00

Promíchat, po 30 s změřit absorbanci A_1 při 340 nm proti reagenčnímu blanku a za dalších 60 s znovu proměřit absorbanci A_2 za stejných podmínek

Úloha 5 – Výpočet dusíkové bilance

K výpočtu použijte koncentrace urey v séru a moči. Další údaje potřebné pro výpočet dusíkové bilance budou k dispozici na praktickém cvičení.

Použitá literatura

- FIALOVÁ, Lenka a Martin VEJRAŽKA. Nebílkovinné dusíkaté látky [online]. Ústav lékařské biochemie 1. LF UK Praha, 2009. Dostupné také z <<https://el.lf1.cuni.cz/p45355481/>>.
- FIALOVÁ, Lenka. *Návody k praktickým cvičením z lékařské biochemie s klinicko-biochemickými aplikacemi*. 2. rozš. vyd. Praha: Medprint, 2003.

Další studijní materiál

Aminotransferázy

- Příspěvatelé WikiSkript, Aminotransferázy [online], , c2024, Datum poslední revize 1. 06. 2024, 11:15 UTC, [citováno 9. 09. 2024] <https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Aminotransfer%C3%A1zy&oldid=477016>

Močovina

- Příspěvatelé WikiSkript, Urea [online], , c2021, Datum poslední revize 5. 12. 2021, 15:12 UTC, [citováno 9. 09. 2024] <<https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Urea&oldid=451392>>