

# Optické a elektroforetické metody v biochemii 1

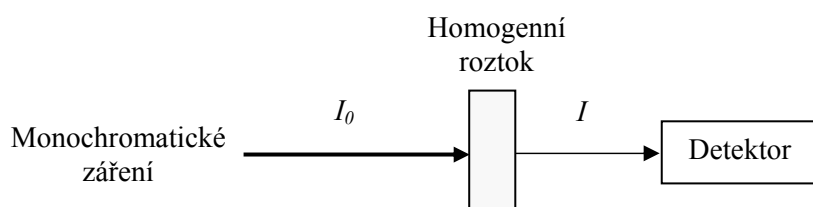


Spektrofotometrie – absorbance, transmittance, Lambertův-Beerův zákon.

Zákalové metody – nefelometrie, turbidimetrie.

Elektroforéza – princip, elektroforetická pohyblivost, základní typy.

## Spektrofotometrie



**Transmittance  $T$**

$$T = \frac{I}{I_0}$$

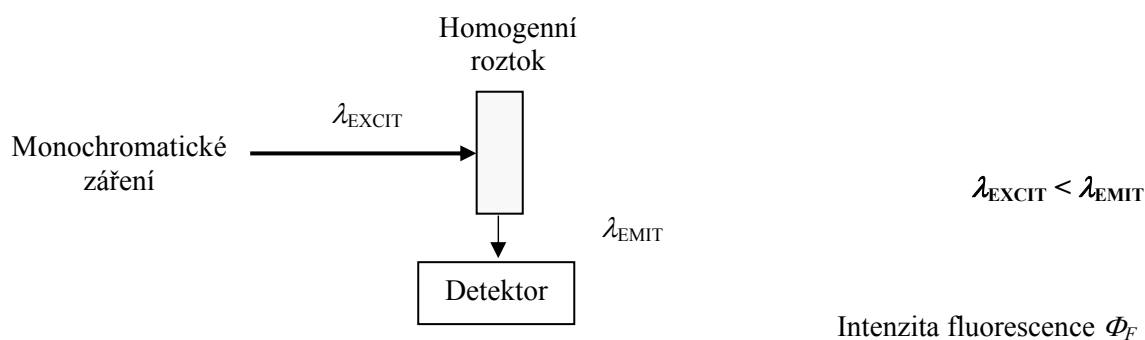
**Absorbance  $A$**

$$A = \log \frac{1}{T} = \epsilon c l$$

1. Vymezte vlnové délky odpovídající viditelné a ultrafialové oblasti světla.
2. Formulujte a vysvětlete Lambertův-Beerův zákon. Uveďte, za jakých podmínek zákon platí (druh světla, koncentrace).
3. Co je to  $\epsilon$ , jakou má jednotku.
4. Vypočítejte odpovídající absorbance, je-li propustnost světla  $T = 10, 50$  a  $100 \%$ .
5. Za jakých podmínek platí vztah:  $\frac{A_1}{c_1} = \frac{A_2}{c_2}$
6. Co je to absorpční křivka určité látky? Které charakteristické hodnoty jsou na absorpční křivce určovány?
7. Které látky lze stanovovat fotometricky? Lze fotometricky stanovit i koncentraci nebarevných látek?
8. Jakou roli má při fotometrickém stanovení standardní roztok?
9. Co je to tzv. slepý pokus (blank)?
10. Pokud chceme fotometricky stanovit koncentraci látky, můžeme v principu použít tři postupy. Vysvětlete podrobněji postup u všech tří metod a uveďte příslušné vztahy pro zjištění koncentrace:
  - a) změřit absorbanci látky a koncentraci spočítat pomocí molárního absorpčního koeficientu
  - b) změřit absorbanci látky a absorbanci série standardních roztoků o různé koncentraci
  - c) změřit absorbanci látky a absorbanci jednoho standardu
11. Vzorek nitrofenolu má při vlnové délce  $420 \text{ nm}$  absorbanci  $A = 0,54$ . Jaká je koncentrace nitrofenolu, je-li jeho molární absorpční koeficient  $\epsilon = 13\,900 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (0,038 mmol.l<sup>-1</sup>)

12. Vypočítejte molární absorpční koeficient látky, která v kyvetě o tloušťce 1 cm vykazuje při dané vlnové délce absorbanci  $A = 0,805$  a jejíž koncentrace je  $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ . (1610  $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )
13. Molární absorpční koeficient NADH má hodnotu  $6220 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Uved'te, jakou absorbanci by měl mít roztok NADH o koncentraci  $50 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ . (0,311)
14. Vypočítejte koncentraci cholesterolu v séru, jestliže bylo zjištěno: 0,1 ml standardního roztoku cholesterolu ( $5 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) smíchaného s 3 ml činidla má při 580 nm absorbanci  $A_{\text{STD}} = 0,39$  (proti destilované vodě). Za stejných podmínek má 0,1 ml vzorku séra s 3 ml činidla absorbanci  $A_{\text{VZ}} = 0,54$ . Absorbance roztoku činidla proti destilované vodě je 0,1. (7,6  $\text{mmol.l}^{-1}$ )
15. Reakční směs pro měření aktivity laktátdehydrogenasy v séru má obsahovat pyruvát ( $1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) a NADH ( $0,22 \text{ mmol.l}^{-1}$ ). Před zahájením enzymové reakce byla změřena absorbance reakční směsi  $A_{340} = 0,84$ . Molární absorpční koeficient NADH má pro danou vlnovou délku hodnotu  $6220 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Rozhodněte, zda koncentrace NADH v reakční směsi dosahuje požadované hodnoty. Pokud ne, spočítejte aktuální koncentraci NADH. (0,135  $\text{mmol.l}^{-1}$ )
16. Při měření koncentrace glukosy v plazmě bylo zjištěno: absorbance vzorku  $A_{\text{VZ}} = 0,75$ . Absorbance roztoku standardního roztoku glukosy ( $5 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) byla  $A_{\text{STD}} = 0,50$ . Standard i vzorky byly měřeny proti slepému pokusu obsahujícím všechny reagentie kromě glukosy při 495 nm. Jaká je koncentrace glukosy v plazmě? (7,5  $\text{mmol.l}^{-1}$ )
17. Při měření koncentrace kreatininu v moči bylo zjištěno: absorbance vzorku  $A_{\text{VZ}} = 0,103$ ; absorbance roztoku standardu  $A_{\text{ST}} = 0,083$ ; koncentrace standardu  $c_{\text{kreatinin}} = 150 \text{ } \mu\text{mol/l}$ . Moč byla zředěna 50x, diuréza 1,35 litru. Vypočítejte látkovou koncentraci kreatininu v moči, a dále vypočítejte exkreci kreatininu v  $\text{mmol/den}$  a  $\text{g/den}$ . ( $M_r$  (kreatinin) = 113) (12,56  $\text{mmol/den}$ ; 1,42  $\text{g/den}$ )

## Fluorimetrie



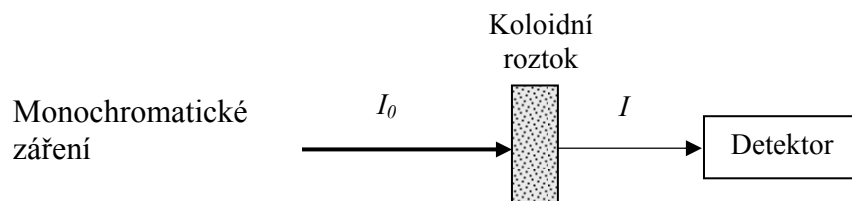
Přístroje: fluorimetry

Využití: např. stanovení vitaminů, hormonů, využití ve fluorescenčních optických elektrodách ( $p\text{O}_2$ , pH,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), průtoková cytometrie.

18. Uved'te, která ze dvou optických metod – absorpční spektrofotometrie nebo fluorimetrie je citlivější a která specifitější.

## Zákalové metody

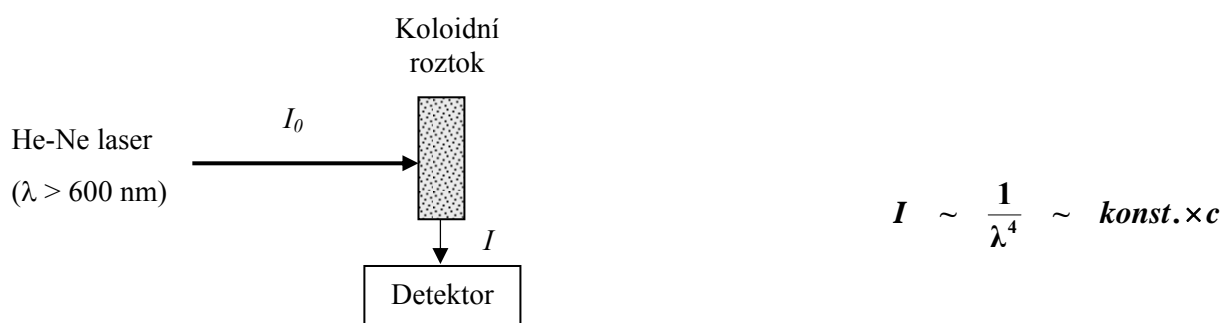
### Turbidimetrie



**Turbidance**  $A_T$        $A_T = \log \frac{I_0}{I} \sim konst. \times c$

Přístroje: turbidimetry, absorpční fotometry

### Nefelometrie



Přístroje: nefelometry

Využití zákalových metod: imunochemická stanovení proteinů

17. Co je společné pro turbidimetrii a nefelometrii, čím se od sebe tyto metody odlišují?
18. Při imunoprecipitačních reakcích dochází k vzájemné reakci mezi antigenem a protilátkou za vzniku imunokomplexů. Tvorba imunokomplexů je často provázána tzv. sekundárními jevy. Mezi ně patří zejména precipitace a aglutinace. Pokud reakce probíhá v roztoku, důsledkem sekundárních jevů je vznik zákalu, jehož intenzitu lze měřit nefelometricky nebo turbidimetricky. Navrhněte způsob stanovení velmi nízkých koncentrací albuminu v moči pomocí zákalových metod. Jaké by bylo složení reakční směsi?

V klinicko-biochemických laboratořích jsou výše uvedené optické metody uplatněny v automatických **biochemických analyzátoch**.

(viz Videozáznam Biochemické analyzátoch)

## Elektroforetické metody

Princip: dělení nabitých částic na základě různé pohyblivosti v elektrickém poli

$$\text{Elektroforetická pohyblivost: } \mu = \frac{v}{E} = \text{konst.} \times \frac{Q}{\eta r}$$

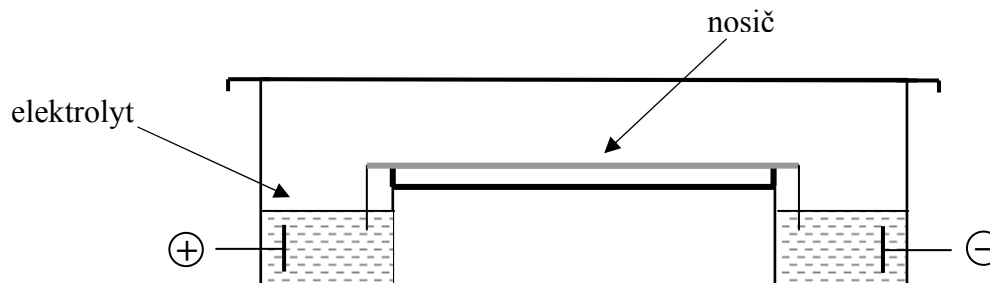
kde  $v$ ... rychlost částice,  $E$ ... potenciálový spád (V/cm),  $Q$ ... celkový náboj,  $\eta$ ... viskozita prostředí,  $r$ ... poloměr částice

- Hlavní faktory ovlivňující dělení:
- potenciálový spád
  - velikost náboje částic
  - velikost molekul
  - pH prostředí
  - vlastnosti nosiče (elektroendoosmóza – pohyb hydratovaných  $H^+$  ke katodě), adsorpce, molekulově síťový efekt)
  - teplota

18. Co určuje celkový náboj proteinu?

19. Jakým způsobem ovlivňují elektroforetickou mobilitu výše uvedené faktory?

Schématické znázornění horizontální elektroforézy

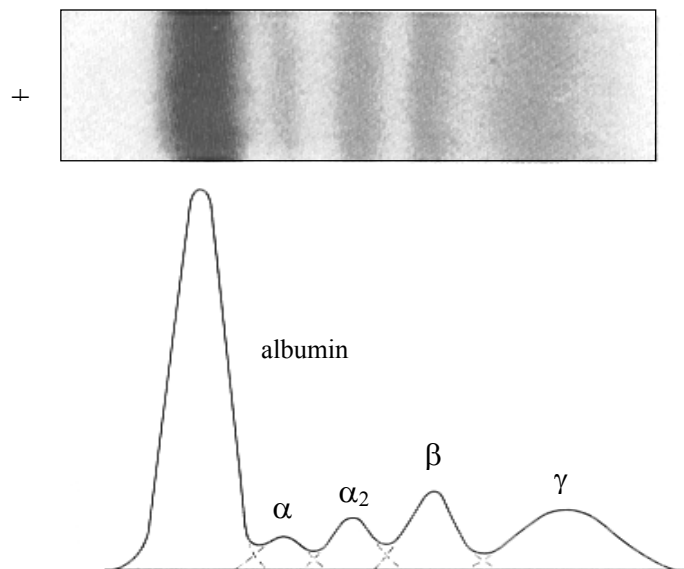


### Příklady nosičů používaných při elektroforéze

Nejběžnější typy nosičů	Dělení v závislosti na	Počet frakcí proteinů krevního séra
Celulosa (papír)	$Q$	5–6
Acetylcelulosa	$Q$	5–7
Agar, agarosa	$Q + (M_r)$	7–8
Polyakrylamidový gel (PAG)	$Q + M_r$	25–30

## Elektroforéza proteinů krevního séra (videozáznam)

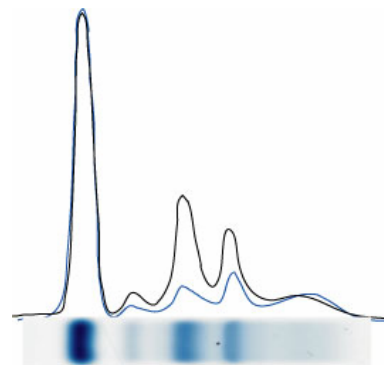
Elektroforeogram a densitogram proteinů lidského séra na acetylcelulose při pH 8,6



Charakteristika frakcí při elektroforéze proteinů krevní plazmy na celulose nebo agarose

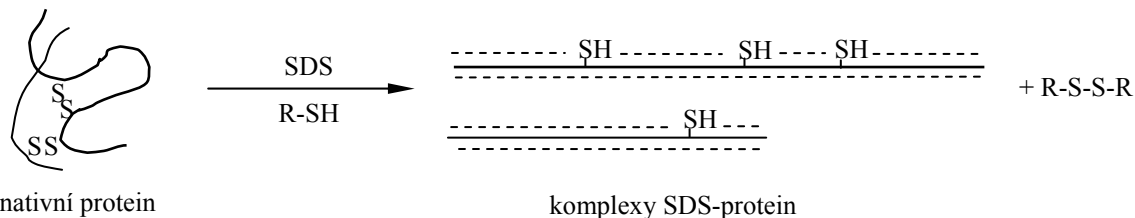
Frakce	Charakteristika	Příklad proteinů
Albumin	výrazný pás v čele	Prealbumin (transthyretin), albumin
$\alpha_1$ -Globuliny	nevýrazný úzký pás	$\alpha_1$ -Kyselý glykoprotein, $\alpha_1$ -antitrypsin, $\alpha_1$ -fetoprotein, $\alpha_1$ -mikroglobulin, $\alpha$ -lipoprotein (HDL)
$\alpha_2$ -Globuliny	difúzní pás	Ceruloplasmin, haptoglobin, ferritin, $\alpha_2$ -makroglobulin
$\beta$ -Globuliny	často rozděleny na $\beta_1$ a $\beta_2$	Hemopexin, transferrin, fibrinogen, $\beta$ -lipoprotein (LDL), složky C3 a C4 komplementu, C-reaktivní protein
$\gamma$ -Globuliny	velmi široký pás	IgM, IgA, IgE, IgD, IgG

20. Na obrázku je popsán typický elektroforeogram proteinů krevní plazmy při akutním zánětu v porovnání s standardním. Které frakce jsou zvýšeny? Pokuste se vysvětlit proč. (vezměte v úvahu, že při zánětu se zvyšuje plazmatická koncentrace proteinů akutní fáze, což jsou zejména ceruloplasmin, C3, C4,  $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\alpha_1$ -antichymotrypsin, haptoglobin, hemopexin, fibrinogen, C-reaktivní protein a další).



### Detergentová elektroforéza (SDS-elektroforéza)

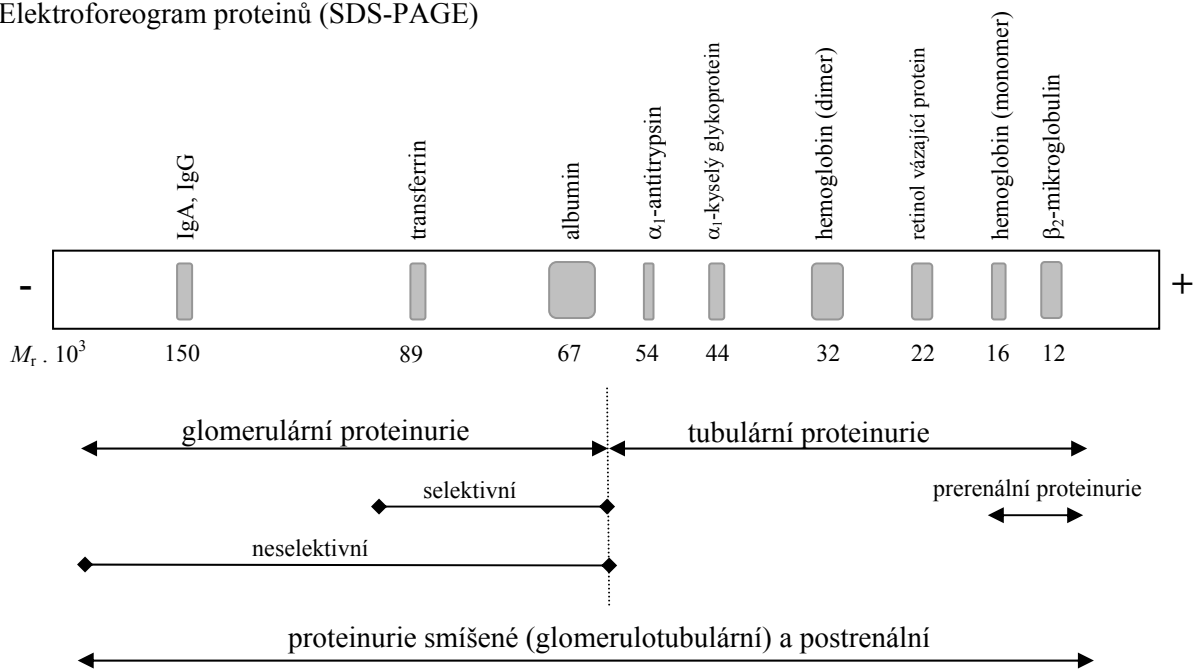
Princip: anionty SDS (dodecylsulfátu sodného) vazbou na proteiny, udílí proteinům stejnoměrný záporný měrný náboj; dělení podle velikosti molekul ( $\mu \sim 1 / \log M_r$ )



Využití: separace DNA, proteinů

Využití SDS-elektroforézy při určení typu proteinurie: Elektroforéza proteinů v moči je významný ukazatel poškození ledvin. Podle molekulové hmotnosti (velikosti molekul) je možné odlišit tubulární proteinurii od glomerulární a smíšené (identifikovat poškození tubulů nebo glomerulů).

### Elektroforeogram proteinů (SDS-PAGE)

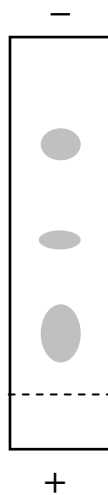


Typ proteinurie	Typický nález
<b>Glomerulární</b>	Exkrece proteinů s $M_r > 70\ 000$ , vč. albuminu (transferrin, IgG, IgA, $\alpha_2$ -makroglobulin, haptoglobin).
<b>Tubulární</b>	Exkrecí proteinů s $M_r < 70\ 000$ ( $\beta_2$ -mikroglobulin, lysozym, retinol-vázající protein, $\alpha_1$ -mikroglobulin, volné lehké řetězce imunoglobulinů (tzv. Bence Jonesova bílkovina) a jejich dimery).
<b>Smíšená</b>	Exkrece nízko- i vysoko-molekulárních proteinů.

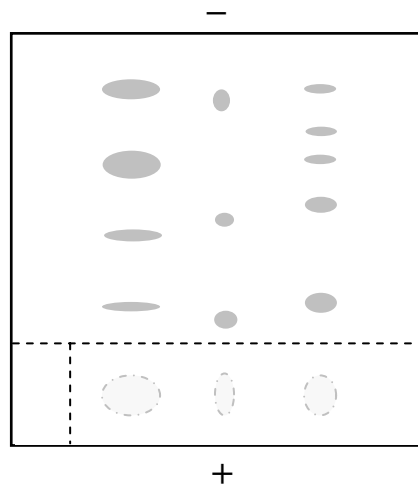
21. V moči byl SDS-elektroforézou prokázán albumin a transferrin. Nízkomolekulární proteiny ( $\beta_2$ -mikroglobulin a retinol-vázající protein nebyly prokázány. O jaký typ proteinurie se jedná?

### Dvojrozměrná elektroforéza (2D-elektroforéza)

1. dělení – podle pI



2. dělení – podle  $Q$  nebo  $M_r$



Využití: separace komplexní směsi proteinů na jednotlivé proteiny, katalogizace proteinů v buňce/organismu ve vztahu k fyziologickým/patofyziologickým procesům (proteomika)

### Kapilární elektroforéza (CE)

Vyžívá elektrokinetických principů elektroforézy a elektroosmózy k separaci látek uvnitř křemenné kapiláry. Vzhledem k vysokému poměru povrchu kapiláry k jejímu objemu dochází k rychlému odvodu tepla, vznikajícího při průchodu elektrického proudu kapilárou. To umožňuje použít mnohonásobně vyššího proudu než u klasické gelové elektroforézy s velmi rychlou separací proteinů. Doba dělení se pohybuje mezi 5–15 minutami. Malý objem dělicí kapiláry dovoluje použít objem vzorku řádově v nanolitrech. K detekci rozdělených frakcí proteinů se používá UV, fluorescenční a elektrochemický detektor. Metoda slouží doposud hlavně k výzkumným účelům, její aplikace však jsou zaváděny i do rutinních aplikací ve větších klinicko-biochemických laboratořích.