

## Vybrané biochemické metody

### I. FLUORESCENCE

Postup:

1. Nastavení a kalibrace přístroje: rychlost posunu (2nm)  
citlivost fotonásobiče  
napětí (korekce temného proudu)
2. 5 zkumavek: jednotlivě 2 ml H<sub>2</sub>O, methanolu, ethanolu, propanolu a butanolu

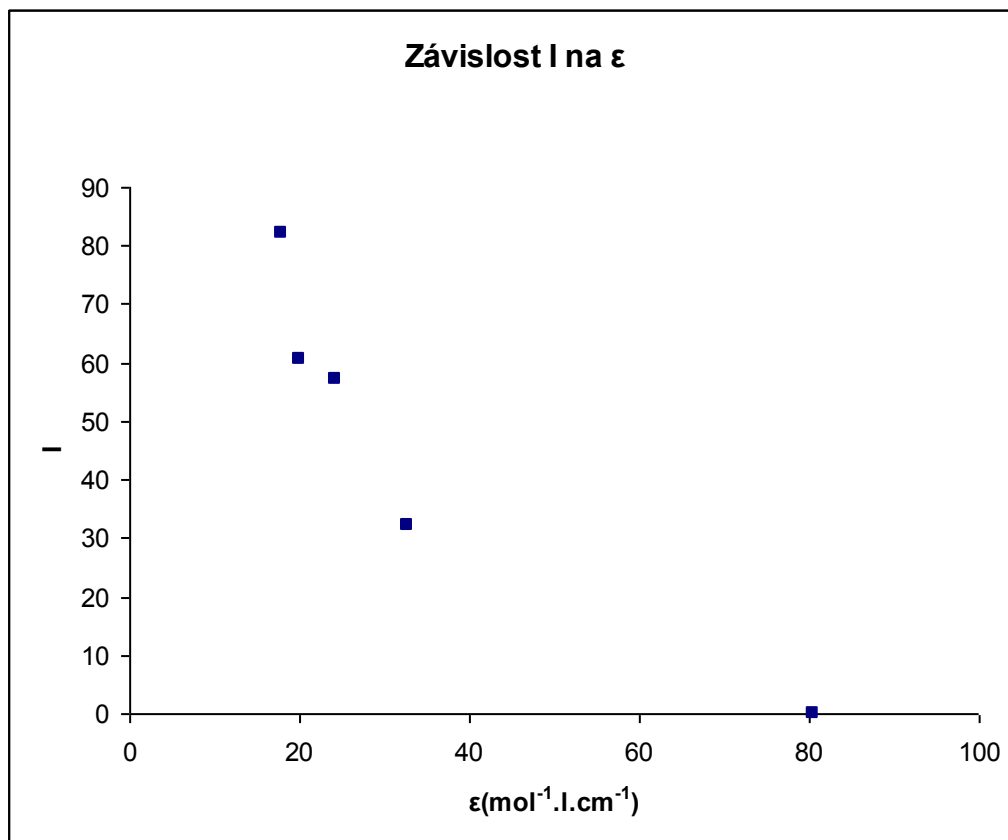
Do každé 20 μL 10 mM ANS ( $c=10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>)

3. měření

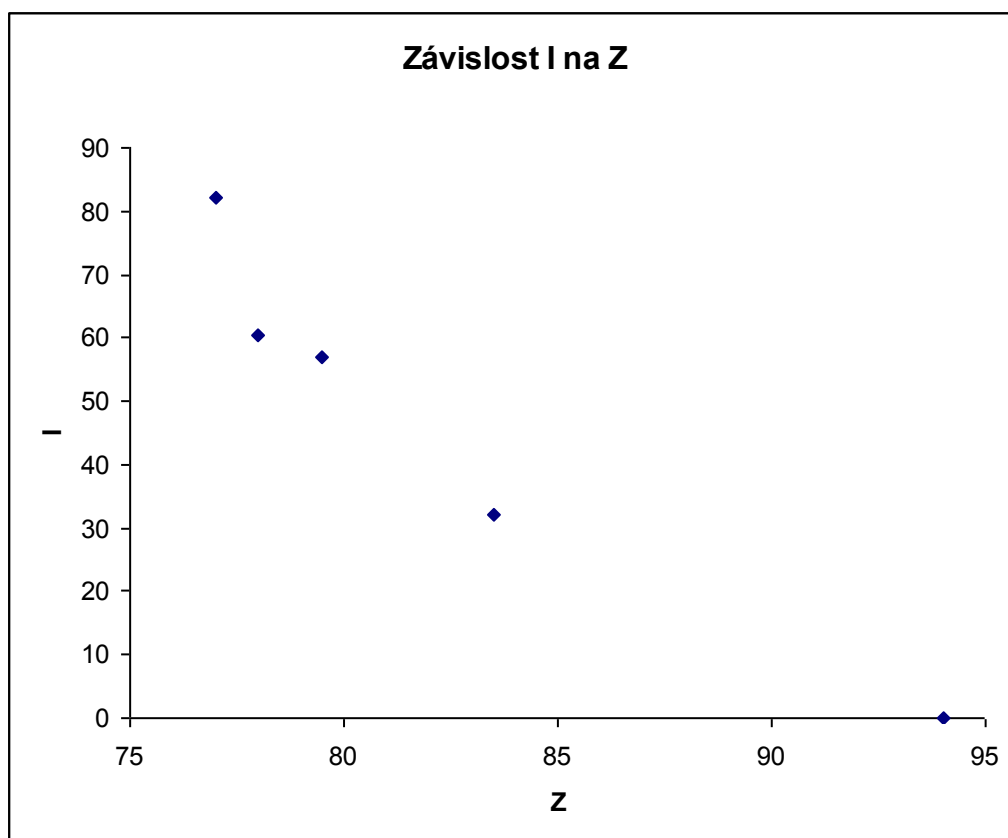
|          | λ(nm) | F, AU | ε    | Z    |
|----------|-------|-------|------|------|
| voda     |       |       | 80,4 | 94   |
| methanol |       |       | 32,6 | 83,5 |
| ethanol  |       |       | 24,3 | 79,5 |
| propanol |       |       | 20,1 | 78   |
| butanol  |       |       | 17,8 | 77   |
| dioxan   |       |       | 2,4  |      |

Permitivita, resp. energie absorpce CT-komplexu I<sup>-</sup> - alkylpyridinium<sup>+</sup>

**Závislosti intenzity fluorescenčního záření na permitivitě prostředí:**



### Závislost intenzity fluorescenčního záření na parametru Z:



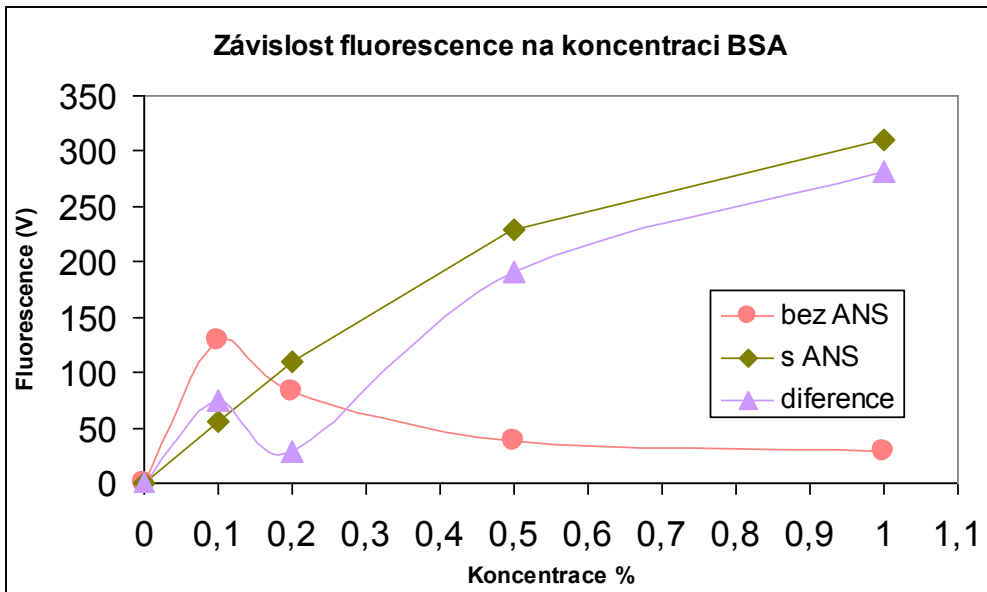
6 zkumavek – etanol dle tabulky, voda do 2 ml

| Etanol, ml - ca % | $\lambda$ (nm) | F, AU |
|-------------------|----------------|-------|
| 0 0               |                |       |
| 0,4 20            |                |       |
| 0,8 40            |                |       |
| 1,2 60            |                |       |
| 1,6 80            |                |       |
| 2,0 100           |                |       |

### Závislost fluorescence na koncentraci:

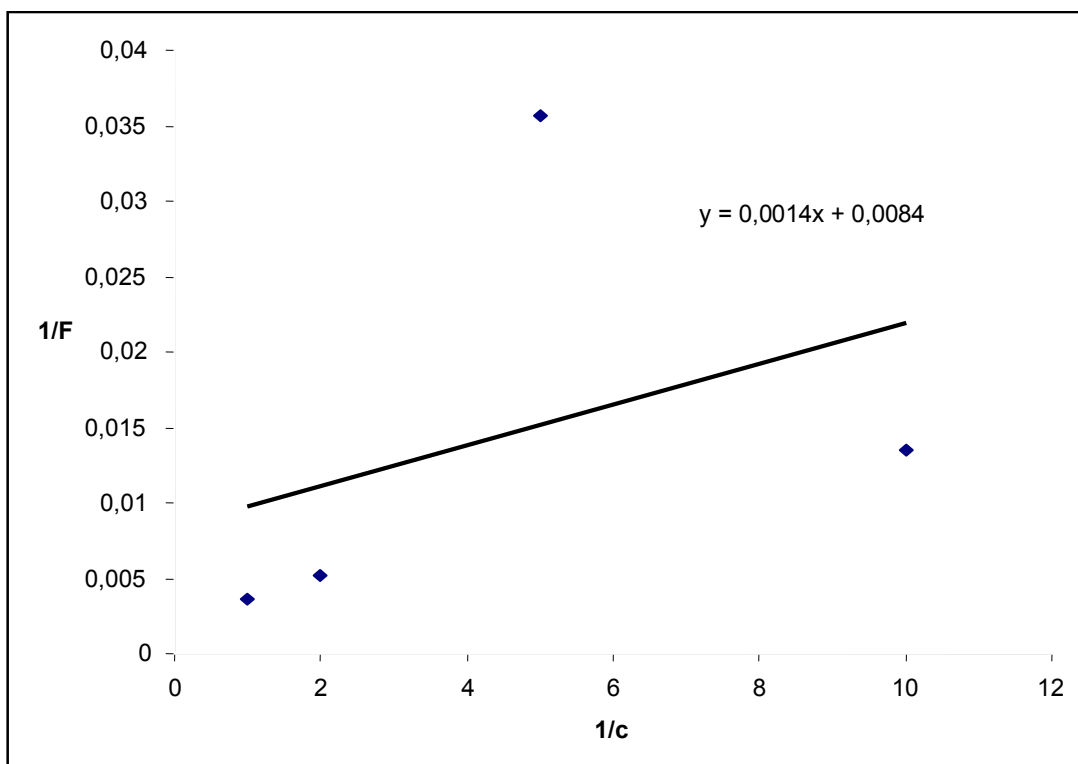
-5 zkumavek: roztok BSA 0,2% albuminu (s a bez ANS)

| zkumavka | albumin          |             | voda<br>objem ml | bez<br>ANS<br>(AU) | s ANS<br>(AU) | diference<br>(AU) |
|----------|------------------|-------------|------------------|--------------------|---------------|-------------------|
|          | koncentrace<br>% | objem<br>ml |                  |                    |               |                   |
| 1        | 0                | 0           | 2                |                    |               |                   |
| 2        | 0,01             | 0,1         | 1,9              |                    |               |                   |
| 3        | 0,02             | 0,2         | 1,8              |                    |               |                   |
| 4        | 0,05             | 0,5         | 1,5              |                    |               |                   |
| 5        | 0,1              | 1           | 1,0              |                    |               |                   |



-určení  $F_{\max}$  z grafu (převrácená hodnota směrnice přímky):

| 1/c | 1/F    |
|-----|--------|
| 10  | 0,0135 |
| 5   | 0,0357 |
| 2   | 0,0052 |
| 1   | 0,0036 |



$$F_{\max} = 1/0,0084 = 119$$

### Koncentrční řada roztoku BSA s přidavkem ANS:

| BSA | ANS     | F    | $c_{bx}$ | $v$     | $c_{volny\ BSA}$ | $v/c_{volny\ BSA}$ |
|-----|---------|------|----------|---------|------------------|--------------------|
| ml  | $\mu l$ |      | mmol/l   | mol/l/g | mmol/l           |                    |
| 2   | 0       | 11,9 | 0,5      | 0,025   | 4,5              | 5,56               |
|     | 2       | 12,5 | 0,53     | 0,0265  | 4,47             | 5,93               |
|     | 3       | 24,5 | 1,03     | 0,0515  | 3,97             | 12,97              |
|     | 5       | 33,8 | 1,42     | 0,071   | 3,58             | 19,83              |
|     | 10      | 29,2 | 1,23     | 0,0615  | 3,77             | 16,31              |
|     | 20      | 9,2  | 0,39     | 0,0195  | 4,62             | 4,11               |
|     | 20      | 3,5  | 0,15     | 0,0075  | 4,85             | 1,55               |

$c_{bx}$  je koncentrace jednotlivých přidavků ANS vypočítaná podle:  $F_{max}=119 \dots c=5 \cdot 10^{-3}$

$F_x \dots c_{bx}$

$v$  vypočítáme jako podíl  $c_{bx}$  a  $c_{BSA}$

$c_{volny\ BSA}$  vypočítáme jako rozdíl celkové koncentrace ANS =  $5 \cdot 10^{-3}$  a koncentrace vázaného ANS

