

Laboratorní cvičení z lékařské chemie a biochemie II

2. ročník, všeobecné lékařství

ZIMNÍ SEMESTR



Ústav lékařské chemie a biochemie

Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Pravidla bezpečnosti a ochrany zdraví při práci

1. Do laboratoře mají přístup pouze studenti, kteří jsou rozvrhem hodin vypsáni na příslušná praktika. Jakékoliv návštěvy jsou zakázány.
2. Studenti jsou povinni před nástupem do praktik teoreticky ovládat úlohy, které budou prakticky provádět. Přinesou si laboratorní plášť a pracovní návod. Praktikování bez pláště je nepřipustné. Vlasy musí být upraveny tak, aby nemohlo dojít k úrazu při práci s kahanem. Svrchní oděvy, tašky, batohy a ostatní zavazadla studenti odloží na místě k tomu určeném.
3. Veškeré odchody z praktik jsou povoleny pouze s výslovným svolením asistenta vedoucího praktika.
4. V laboratoři je povoleno provádět pouze ty práce, které jsou náplní praktického cvičení. V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit, dále přechovávat potraviny a používat laboratorní nádobí a zařízení k jiným účelům, než jsou určeny.
5. Pro práce, při nichž může dojít k úniku škodlivých chemických látek do ovzduší, se musí zabezpečit odsávání. Práce s látkami dýmovými, dráždivými, zápachajícími, jedovatými plyny a parami, stejně jako žihání a spalování je dovoleno provádět jen v digestořích.
6. Při nasazování balónku na skleněnou pipetu je nutné dbát zvýšené opatrnosti. Střepy a jiné odpadky s ostrými hranami musí být odkládány do zvláštní nádoby s označením „SKLO“.
7. Do výlevek lze vylévat jen rozpouštědla s vodou dokonale mísitelná, dostatečně zředěná (nejméně 1:10), v množství nejvýše 0,5 litru a vodné roztoky kyselin a zásad zředěné nejméně 1:30. S vodou nemísitelná rozpouštědla, jedy, kyseliny a louhy nad uvedenou koncentraci a látky, které uvolňují jedovaté a dráždivé plyny, do výlevek vylévat nelze. Tyto látky se likvidují do zvláštní odpadní nádoby.
8. Při ředění se kyseliny zásadně vlévají do vody, nikoliv naopak.
9. Je zakázáno nasávat roztoky do pipet ústy. Musí být použito příslušných pomůcek (balónek).
10. Rozlité kyseliny je nutno ihned spláchnout vodou, případně neutralizovat práškovou sodou. Rozlité zásady stačí jen důkladně spláchnout vodou.
11. Při rozlité hořlavých kapalin se musí okamžitě zhasnout všechny kahany, vypnout elektrický proud a zajistit účinné větrání. Rozlité kapalina se nechá vsáknout do vhodného porézního materiálu, který se odklídí na bezpečné místo.
12. Při zahřívání kapalin v baňkách se musí zabránit utajenému varu alespoň tak, že se do baňky vloží varný kamínek.
13. Před zahájením práce je nutno zkontrolovat stav všech přístrojů a zařízení, případné závady a nedostatky nahlásit asistentovi nebo laborantce.
14. Posluchačům je zásadně zakázána jakákoliv svévolná manipulace s elektrickou instalací, s přístrojovým vybavením a materiálem. Zapnutí přístroje a zapálení plynových kahanů se děje až po souhlasu asistenta nebo laborantky.
15. Obsluha laboratorní centrifugy musí být prováděna jen v přítomnosti asistenta nebo laborantky. Centrifugační nádobky musí být dokonale vyváženy, víko centrifugy při chodu bezpečně uzavřeno.
16. Při úniku plyných paliv (zemní plyn) musí být uzavřen přívod plynu, vypnut elektrický proud a účinně větráno.
17. Zapálené kahany nelze nechat hořet bez dozoru. Prošlehne-li plamen dovnitř, musí se okamžitě uzavřít přívod plynu a kahan seřídít.
18. Jakékoliv nehody, úrazy, požití chemikálií apod. je nutno ihned nahlásit vedoucímu asistentovi.
19. Hrubé porušení uvedených pravidel, vyplývající z nekázně či neznalosti, má za následek vykázání posluchače z praktických cvičení se sankcí neomluvené absence.
20. Studenti musí být seznámeni s klasifikací látek toxických, kancerogenních, mutagenních a toxických pro reprodukci. Bezpečnostní listy jednotlivých látek jsou k dispozici v praktikárnách.
21. Studenti musí být seznámeni s pravidly bezpečnosti práce s látkami vysoce toxickými (označeny T+) používanými ve studentské laboratoři (např. rtuť, kyanid draselný, ethidium bromid, dusičnan rtuťnatý).

ROZPIS ÚLOH

<u>Lab 1: Vyšetřování krve I (proteiny)</u>	<i>strana 5</i>
a) Stanovení celkové bílkoviny biuretovou reakcí b) Stanovení albuminu c) Stanovení C-reaktivního proteinu (CRP) v séru	
<u>Lab 2: Vyšetřování krve II (glukóza, lipidy)</u>	<i>strana 11</i>
a) Stanovení glukózy v séru b) Stanovení glukózy v kapilární krvi glukometrem c) Stanovení celkového cholesterolu d) Stanovení triacylglycerolů	
<u>Lab 3: Vyšetřování krve III (dusíkaté látky)</u>	<i>strana 21</i>
a) Stanovení močoviny b) Stanovení kyseliny močové c) Stanovení přímého a celkového bilirubinu	
<u>Lab 4: Vyšetřování moči I</u>	<i>strana 29</i>
a) Fyzikální vyšetření moči b) Základní chemické vyšetření moči c) Mikroskopické vyšetření močového sedimentu	
<u>Lab 5: Vyšetřování moči II</u>	<i>strana 41</i>
a) Stanovení glomerulární filtrace jako clearance kreatininu b) Aminokyseliny a jejich metabolity v moči	
<u>Lab 6: Klinická enzymologie</u>	<i>strana 49</i>
a) Sledování aktivity aminotransferáz ALT a AST v jaterním extraktu b) Stanovení aktivity alkalické fosfatázy v séru c) Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy v séru	
<u>Lab 7: Molekulární biologie I</u>	<i>strana 57</i>
a) Izolace DNA b) Měření koncentrace DNA, kontrola čistoty	
<u>Lab 8: Molekulární biologie II</u>	<i>strana 60</i>
a) Polymerázová řetězová reakce	
<u>Lab 9: Molekulární biologie III</u>	<i>strana 64</i>
a) Restrikční štěpení b) Elektroforéza, vyhodnocení	
<u>Vybrané klinicko-biochemické hodnoty</u>	<i>strana 71</i>

Jméno:
Skupina:
Spolupracovníci:

Datum:

Lab 1: Vyšetřování krve I (proteiny)

a) Stanovení celkové bílkoviny biuretovou reakcí

Peptidy (nejméně tříčlenné) poskytují podobně jako biuret a karbamylderiváty s ionty Cu^{2+} v alkalickém prostředí modrý komplex vhodný k fotometrickému stanovení.

Co to je biuret? Jak vzniká (napište reakční rovnici)?

Úkol: Stanovte hladinu celkové bílkoviny v krevním séru

Připravte si tři zkumavky a označte je **vz**, **st** a **0**. Do zkumavek odpipetujte podle tabulky sérum, standard, fyziologický roztok a biuretové činidlo.

	vz (vzorek)	st (standard)	0 (porovnávací roztok)
vzorek séra (ml)	0,1	-	-
standard (ml)	-	0,1	-
fyziol. roztok (ml)	-	-	0,1
biuretové činidlo (ml)	5,0	5,0	5,0

Nechte stát **30 minut** při laboratorní teplotě. Změřte absorbanci vzorku a standardu proti porovnávacímu roztoku při vlnové délce **546 nm**.

A vzorku	
A standardu	

Vypočítejte koncentraci celkové bílkoviny ve vzorku podle následujícího vztahu:

Koncentrace celkové bílkoviny ve vzorku: $c \text{ (g/l)} = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times c_{\text{st}}$

Koncentrace standardu: $c_{\text{st}} = 70 \text{ g/l}$

	Výsledek
	$c_{\text{vz}} = \quad \text{g/l}$

Jaká je normální (fyziologická) hodnota celkové bílkoviny v séru?

Závěr:

b) Stanovení albuminu

Bromkrezolový purpur (5,5'-dibrom-o-kresolsulfonftalein) tvoří s albuminem ve slabě kyselém prostředí za přítomnosti povrchově aktivních látek zelenomodrý komplex vhodný k fotometrickému stanovení.

Úkol: Stanovte hladinu albuminu v krevním séru

Připravte si tři zkumavky a označte je **vz**, **st** a **0**. Do zkumavek odpipetujte podle tabulky sérum, standard, destilovanou vodu a činidlo.

	vz (vzorek)	st (standard)	0 (porovnávací roztok)
vzorek séra (ml)	0,02	-	-
standard (ml)	-	0,02	-
dest.voda (ml)	-	-	0,02
činidlo (ml)	2,0	2,0	2,0

Roztoky zamíchejte a nechte stát **10 minut** při laboratorní teplotě. Změřte absorbanci vzorku a standardu proti porovnávacímu roztoku při vlnové délce **600 nm**.

A_{vzorku}	
$A_{\text{standardu}}$	

Vypočítejte koncentraci albuminu ve vzorku podle vztahu:

$$\text{Koncentrace albuminu ve vzorku: } c_{\text{vz}} \text{ (g/l)} = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times c_{\text{st}}$$

Koncentrace standardu: $c_{\text{st}} = 40 \text{ g/l}$

	Výsledek
	$c_{\text{vz}} = \quad \text{g/l}$

Jaká je normální (fyziologická) hodnota albuminu v séru?

Vypočítejte **albumino-globulinový kvocient**.

$$A/G = \frac{c \text{ alb.}}{c \text{ celk.b.} - c \text{ alb.}}$$

	Výsledek
	A/G =

Orientační rozmezí A/G je 1,3 – 2,0

Závěr:

c) Stanovení C-reaktivního proteinu (CRP) v séru

CRP je klasická bílkovina akutní fáze, jedna z prvních, které byly objeveny. Její nárůst v plazmě nebo séru téměř vždy poukazuje na přítomnost zánětu, především zánětu vyvolaného bakteriální infekcí. Vzestup koncentrace CRP doprovází také nekrózu tkání a malignity, přičemž výše hladiny odráží závažnost nemoci a rozsah tkáňového poškození. Koncentrace CRP v séru začíná růst 6 hodin po začátku poruchy, maxima dosahuje za 48 hodin a klesá s poločasem okolo 48 hodin.

CRP je složen z pěti polypeptidových podjednotek, z nichž každá obsahuje 206 aminokyselinových zbytků. Tato struktura řadí CRP mezi pentraxiny, proteiny s funkcí v imunitní obraně organismu, které se vyskytují u všech obratlovců i u většiny bezobratlých, jedná se tedy o fylogeneticky velmi starou bílkovinu. CRP se vytváří v játrech velmi rychle po indukci prostřednictvím cytokinů a na vrcholu reakce akutní fáze může dosáhnout jeho tvorba až 20 % celkové jaterní proteosyntézy.

Biologickou funkcí CRP je vázat se na řadu endogenních i exogenních látek a urychlovat jejich odstranění z krve a tkání opsonizací (tj. např. u urychlení fagocytózy). Na buňky vlastního organismu se CRP váže jen v případě, že mají poškozenou normální strukturu membrány. Naopak, k vazbě CRP na buňky bakterií nebo parazitů dochází i v případě, že se jedná o živé nepoškozené mikroorganismy. Vazba na CRP může dokonce propojit některé ligandy a vést k jejich precipitaci v tkáních.

Ke stanovení CRP se používá imunoturbidimetrická metoda. Vzorek (sérum nebo plazma) se inkubuje v přítomnosti specifické protilátky proti lidskému CRP (antisérum, monoklonální protilátky) a míra imunoprecipitace se kvantifikuje turbidimetricky při vlnové délce 700 nm.

Úkol: Stanovte hladinu CRP v krevním séru

K **0,05 ml** séra ve zkumavce přidejte **2,0 ml** roztoku protilátek.

Promíchejte a inkubujte **10 minut při 37 °C**.

Změřte absorbanci zakaleného roztoku proti vodě při **700 nm**.

A_{vzorku}	
---------------------	--

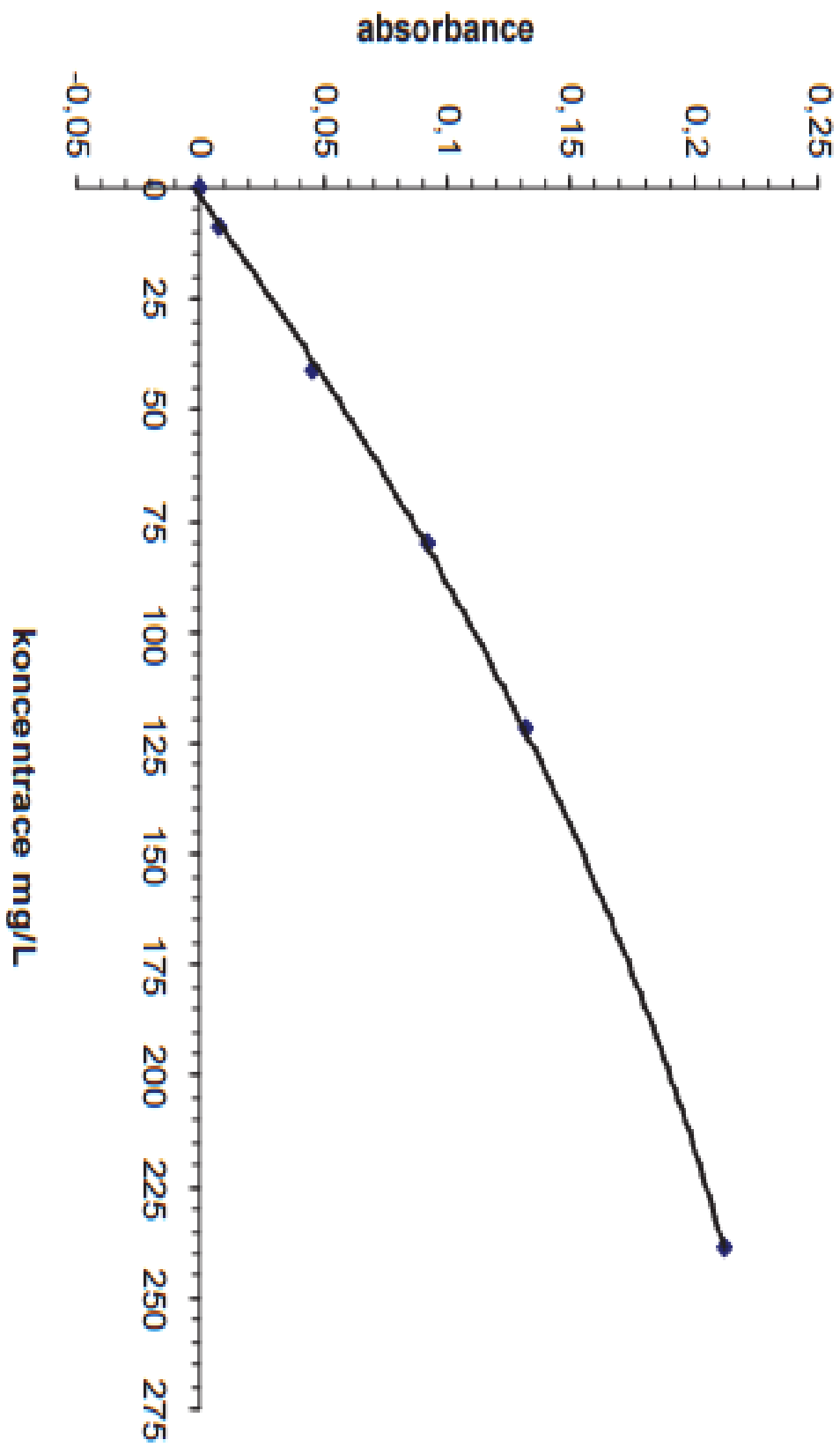
Podle přiložené kalibrační křivky odečtěte koncentraci CRP v mg/l a výsledek interpretujte.

$CRP =$ mg/l
--

Jaká je normální (fyziologická) hodnota CRP v séru?

Závěr:

CRP - turbidimetry



Jméno:
Skupina:
Spolupracovníci:

Datum:

Lab 2: Vyšetřování krve II (glukóza, lipidy)

a) Stanovení glukózy

Glukóza se oxiduje vzdušným kyslíkem za katalýzy *glukózaoxidázou* na glukonolakton a peroxid vodíku, který se stanoví oxidační kopulací se substituovaným fenolem a 4-aminofenazonem. Tato druhá reakce je katalyzovaná *peroxidázou*.

Zakreslete *D*-glukózu různými typy vzorců:

<i>lineární vzorec (Fischerův)</i>	<i>cyklický vzorec (Tollensův)</i>	<i>cyklický vzorec (Haworthův)</i>
<i>D</i> -glukóza	<i>α</i> - <i>D</i> -glukopyranóza	<i>α</i> - <i>D</i> -glukopyranóza

Úkol 1: Stanovte hladinu glukózy v krevním séru

Připravte si tři zkumavky a označte je **vz**, **st** a **0**. Do zkumavek odpipetujte podle tabulky sérum, standard, destilovanou vodu a činidlo.

	vz (vzorek)	st (standard)	0 (porovnávací roztok)
Vzorek séra (ml)	0,02	-	-
standard (ml)	-	0,02	-
destilovaná voda (ml)	-	-	0,02
činidlo (ml)	2,0	2,0	2,0

Inkubujte **15 minut** při **37°C**. Změřte absorbanci vzorku a standardu proti porovnávacímu roztoku při vlnové délce **498 nm**.

A vzorku	
A standardu	

Vypočítejte koncentraci vzorku podle následujícího vztahu:

Koncentrace glukózy ve vzorku: c (mmol/l) = $\frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times c_{\text{st}}$

Koncentrace standardu: $c_{\text{st}} = 10 \text{ mmol/l}$

	Výsledek
	$c_{\text{vz}} =$ mmol/l

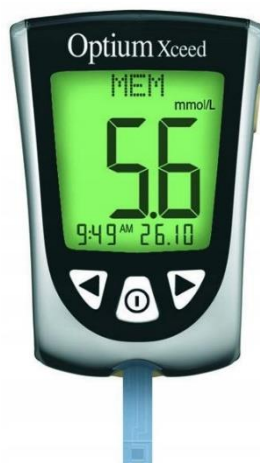
Jaká je normální (fyziologická) hodnota glukózy v séru?

Závěr:

Úkol 2: Stanovte hladinu glukózy v kapilární krvi glukometrem

Glukometr Optimum xceed využívá pro měření glukózy elektrochemický princip. Jedná se o kombinaci glukózooxidázové reakce a ampérometrie. Na testacím proužku je úzká kapilára, kterou je krev nasávána dovnitř. Zde proběhne oxidace glukózy za vzniku peroxidu vodíku. Čím více je glukózy v krvi, tím více vznikne molekul peroxidu vodíku. Peroxid vodíku je v glukometru elektrolyticky rozkládán na kladné kationty vodíku a záporné anionty kyslíku. Anionty kyslíku putují k registrační elektrodě. Takto vzniká proud záporně nabitých částic, jež může být změřen glukometrem jako elektrický proud. Velikost proudu odpovídá výsledné glykemii.

Před vlastním odběrem vzorku vyjměte testovací proužek z fóliového obalu. Vložte konec testovacího proužku se třemi černými pruhy do portu. Testovací proužek zasuněte až na doraz. Glukometr se automaticky zapne. Na displeji se zobrazí symbol kapky. Dezinfikujte a osušte špičku prstu. Proved'te vpich lancetou. Kápněte kapku krve na bílou plošku na konci testovacího proužku. Kapka krve se nasaje do testovacího proužku. Po pár vteřinách se na displeji zobrazí hodnota glykémie. Vyjmutím testovacího proužku z portu vypnete glukometr.



Zaznamenejte změřenou hodnotu glukózy v mmol/l a výsledek interpretujte.

Glukóza =		mmol/l
-----------	--	--------

Závěr:

b) Stanovení celkového cholesterolu

Hladina celkového cholesterolu se stanoví třemi, po sobě jdoucími, enzymovými reakcemi. Nejprve hydrolýzou esterů *cholesterolesterázou* je uvolněn volný cholesterol, který se oxiduje na cholestenon pomocí *cholesteroxidázy*. Vedlejším produktem cholesteroxidázové reakce je peroxid vodíku. Ten se stanoví za katalýzy *peroxidázou* oxidační kopulací s vhodným chromogenem. Intenzita vzniklého růžovočerveného zabarvení je úměrná koncentraci cholesterolu.

Zakreslete rovnici reakce katalyzované cholesterol esterázou ve strukturních vzorcích.

Úkol: Stanovte hladinu celkového cholesterolu v krevním séru

Připravte si tři zkumavky a označte je **vz**, **st** a **0**. Do zkumavek odpipetujte podle tabulky sérum, standard, destilovanou vodu a činidlo.

	vz (vzorek)	st (standard)	0 (porovnávací roztok)
vzorek séra (ml)	0,02	-	-
standard (ml)	-	0,02	-
destilovaná voda (ml)	-	-	0,02
činidlo (ml)	2,0	2,0	2,0

Promíchejte a inkubujte **20 minut** při **37°C**.

Změřte absorbanci vzorku a standardu proti porovnávacímu roztoku při vlnové délce **498 nm**.

A vzorku	
A standardu	

Vypočítejte koncentraci vzorku podle následujícího vztahu:

Koncentrace celkového cholesterolu ve vzorku: $c \text{ (mmol/l)} = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times c_{st}$

Koncentrace standardu: $c_{st} = 5,17 \text{ mmol/l}$

	Výsledek
	$c_{vz} =$ mmol/l

Jaká je normální (fyziologická) hodnota celkového cholesterolu v séru?

Závěr:

c) Stanovení triacylglycerolů

Koncentrace triacylglycerolů (TAG) se stanoví enzymaticky. Činidlo obsahuje celkem čtyři enzymy a chromogen. Triacylglyceroly jsou hydrolyzovány na mastné kyseliny a glycerol lipázou. Vzniklý glycerol je fosforylován *glycerolkinázou* na glycerol-3-fosfát, který je následně oxidován *glycerol-3-fosfát oxidázou* na dihydroxyacetonfosfát za současné tvorby peroxidu vodíku, který v přítomnosti *peroxidázy* umožňuje oxidační kopulaci s chromogeny. Získá se barevná sloučenina vhodná pro fotometrické stanovení.

Zakreslete rovnici reakce katalyzované lipázou ve strukturních vzorcích.

Úkol: Stanovte hladinu triacylglycerolů v krevním séru

Připravte si tři **ependorfky** a označte je **vz**, **st** a **0**. Do nich odpipetujte podle tabulky sérum, standard, destilovanou vodu a činidlo.

	vz (vzorek)	st (standard)	0 (porovnávací roztok)
vzorek séra (ml)	0,01	-	-
standard (ml)	-	0,01	-
destilovaná voda (ml)	-	-	0,01
činidlo (ml)	1,0	1,0	1,0

Ependorfky inkubujte **10 minut při 37°C**.

Na spektrofotometru nastavte (podle příloženého postupu) vlnovou délku **546 nm**.

Po uplynutí inkubační doby vyjměte ependorfky a opatrně přelijte jejich obsah do spektrofotometrických kyvet. Změřte absorbanci vzorku a standardu proti porovnávacímu roztoku.

A vzorku	
A standardu	

Vypočítejte koncentraci vzorku podle následujícího vztahu:

Koncentrace TAG ve vzorku: $c \text{ (mmol/l)} = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times c_{\text{st}}$

Koncentrace standardu: $c_{\text{st}} = 2,26 \text{ mmol/l}$

	Výsledek
	$c_{\text{vz}} = \quad \text{mmol/l}$

Jaká je normální (fyziologická) hodnota triacylglycerolů v séru?

Závěr:

Výpočet LDL cholesterolu

Výpočet koncentrace LDL cholesterolu se provádí podle Friedewalda na základě látkové koncentrace cholesterolu celkového, HDL cholesterolu a triacylglycerolů. Výpočet je založen na předpokladu, že cholesterol je obsažen v částicích VLDL, LDL a HDL. Koncentrace VLDL je v rovnici odhadována z hladiny triacylglycerolů.

$$\text{LDL cholesterol (LDL-C)} = \text{celkový cholesterol} - \text{HDL cholesterol} - \frac{\text{TAG}}{2,2}$$

Pro výpočet LDL cholesterolu potřebujete stanovit ještě HDL cholesterol, počítejte s **0,9 mmol/l**.

	Výsledek
	C _{vz} = mmol/l

Jaká je normální (fyziologická) hodnota LDL cholesterolu v séru?

Závěr:

Vyhodnocení rizika aterosklerózy

Z naměřených hodnot týkajících se lipidového metabolismu lze počítat různé ukazatele. Doporučovány jsou indexy, které berou v úvahu vliv koncentrace nejen celkového cholesterolu, ale i HDL cholesterolu.

$$\text{Aterogenní index (AI)} = \frac{\text{celkový cholesterol}}{\text{HDL cholesterol}}$$

	Výsledek
	AI =

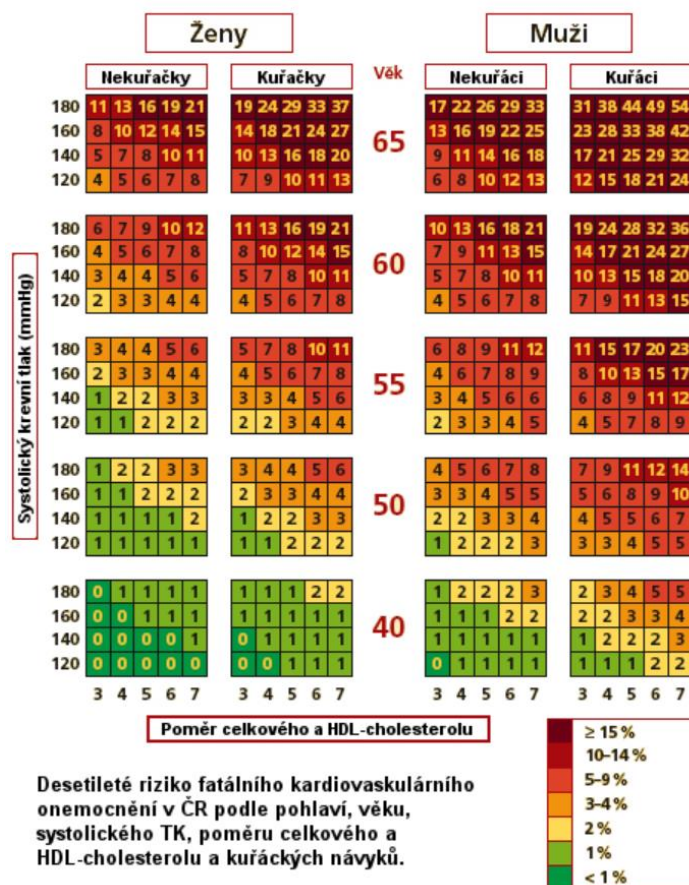
Riziko aterosklerózy se zvyšuje se stoupající hodnotou aterogenního indexu. Tento výpočet zohledňuje, že zvýšená hladina celkového cholesterolu může být zapříčiněna zvýšenou hladinou HDL cholesterolu, který není rizikový.

Existují i ukazatele počítající s hladinou triacylglycerolů jako je např. aterogenní index plazmy.

$$\text{Aterogenní index plazmy (AIP)} = \log \frac{\text{TAG}}{\text{HDL cholesterol}}$$

	Výsledek
	AIP =

Rizikových faktorů aterosklerózy je ale více (věk, pohlaví, hypertenze, kouření). V klinické praxi se pro vyhodnocení celkového kardiovaskulárního rizika používá tabulka vycházející z projektu SCORE (Systematic COronary Risk Evaluation), pomocí které se provádí odhad rizika fatálních kardiovaskulárních příhod v následujících 10 letech.



Tabulka rizika podle projektu SCORE

Vyhodnořte riziko aterosklerózy pro fiktivního pacienta (údaje o něm si запиšte do následující tabulky). Použijte během praktik naměřené hodnoty cholesterolu.

Pacient číslo:			
Pohlaví:	muž / žena	Kouření:	ANO / NE
Věk	let	Krevní tlak:	mm Hg

Hodnocení, závěr:

Lab 3: Vyšetřování krve III (dusíkaté látky)

a) Stanovení močoviny

Močovina se syntetizuje v játrech z amoniaku produkovaného převážně katabolismem aminokyselin. Kinetické enzymatické stanovení močoviny využívá spřažení dvou reakcí – ureázové a glutamátdehydrogenázové:



Nejprve dochází k rozkladu močoviny pomocí ureázy. Vzniklé amonné ionty se vážou na 2-oxoglutarát za vzniku glutamátu. Při této druhé reakci, katalyzované glutamátdehydrogenázou, se současně koenzym NADH oxiduje na NAD^+ , což lze sledovat jako pokles absorbance při 340 nm.

Využívání rozdílu v absorpčních spektrech těchto dvou forem koenzymu se říká Warburgův optický test. Redukovaná forma koenzymu (NADH) má charakteristickou absorpci při 340 nm. Oxidovaná forma (NAD^+) v této oblasti neabsorbuje.

strukturní vzorec močoviny

Úkol: Stanovte hladinu močoviny v krevním séru

Fotometr zapněte hlavním vypínačem a nechte temperovat při **37°C 10 minut**.

Navolte vlnovou délku **340 nm**.

Všechno měřte proti destilované vodě.

1) Měření reagenčního blanku

Do fotometrické kyvety připravte reagenční blank: **0,02 ml destilované vody** a **2 ml pracovního roztoku**. Obsah kyvety promíchejte nasátím do pipety a následným vypuštěním zpět do kyvety. Spusťte stopky a kyvetu vložte do fotometru. Po **30 s** odečtěte počáteční absorbanci (A_1), další absorbanci odečtěte přesně po **1 minutě** od předešlého měření (A_2).

A ₁ blanku	
A ₂ blanku	

2) Měření standardu

Do fotometrické kyvety napipetujte **0,02 ml standardu** a **2 ml pracovního roztoku**. Promíchejte, stiskněte stopky a vložte do fotometru. Po **30 s** odečtěte absorbanci (A_1), další absorbanci odečtěte přesně po **1 minutě** od předešlého měření (A_2).

A ₁ standardu	
A ₂ standardu	

3) Měření vzorku

Stejný postup použijte při měření vzorku (**0,02 ml vzorku + 2 ml pracovního roztoku**).

A ₁ vzorku	
A ₂ vzorku	

Výpočet

Vypočítejte změnu absorbance za 1 minutu pro reagenční blank, standard i vzorek:

$\Delta A_{bl} = A_1 \text{ blanku} - A_2 \text{ blanku}$	
$\Delta A_{st} = A_1 \text{ standardu} - A_2 \text{ standardu}$	
$\Delta A_{vz} = A_1 \text{ vzorku} - A_2 \text{ vzorku}$	

Vypočítejte koncentraci močoviny v séru:

$$\text{Koncentrace močoviny ve vzorku: } c \text{ (mmol/l)} = \frac{\Delta A_{vz} - \Delta A_{bl}}{\Delta A_{st} - \Delta A_{bl}} \times c_{st}$$

$$\text{Koncentrace standardu: } c_{st} = 15 \text{ mmol/l}$$

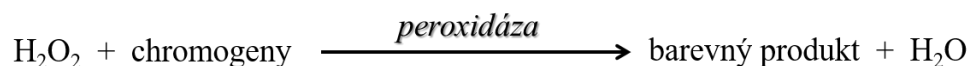
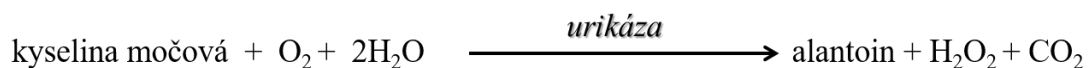
	Výsledek
	$c_{vz} =$ mmol/l

Jaká je normální (fyziologická) hodnota močoviny v séru?

Závěr:

b) Stanovení kyseliny močové

Koncentrace kyseliny močové se stanoví dvěma po sobě jdoucími enzymovými reakcemi:



Nejprve **oxidací** a fotometricky měřitelný barevný produkt vzniká **oxidační kopulací** dvou původně nebarevných sloučenin.

strukturní vzorec kyseliny močové

Úkol: Stanovte hladinu kyseliny močové v krevním séru

Označte 3 **eppendorfky** symboly **vz**, **st** a **0**. Do nich odpipetujte podle tabulky vzorek, standard, destilovanou vodu a činidlo.

	vz (vzorek)	st (standard)	0 (porovnávací roztok)
vzorek (ml)	0,02	-	-
standard (ml)	-	0,02	-
voda (ml)	-	-	0,02
činidlo (ml)	1,00	1,00	1,00

Eppendorfky inkubujte **2 minuty při 37°C**.

Na spektrofotometru nastavte vlnovou délku **550 nm**.

Po uplynutí inkubační doby vyjměte eppendorfky a opatrně přelijte jejich obsah do spektrofotometrických kyvet. Změřte absorbanci vzorku a standardu proti porovnávacímu roztoku.

A_{vzorku}	
$A_{\text{standardu}}$	

Vypočítejte koncentraci vzorku podle následujícího vztahu:

Koncentrace kyseliny močové ve vzorku: $c \text{ (}\mu\text{mol/l)} = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times c_{\text{st}}$

Koncentrace standardu: $c_{\text{st}} = 357 \mu\text{mol/l}$

	Výsledek
	$c_{\text{vz}} = \quad \mu\text{mol/l}$

Jaká je normální (fyziologická) hodnota kyseliny močové v séru?

Závěr:

c) Stanovení přímého a celkového bilirubinu v séru

Bilirubin poskytuje s diazotovanou kyselinou sulfanilovou intenzivně zbarvený roztok azobarviva, vhodný k fotometrickému stanovení. Stanovení přímého (konjugovaného) bilirubinu provádíme bez akcelarátoru, celkový bilirubin (konjugovaný + nekonjugovaný) stanovujeme v přítomnosti akcelarátoru (kofein + benzoan).

strukturní vzorec bilirubinu

Úkol 1: Stanovte hladinu přímého bilirubinu v krevním séru

Připravte si dvě zkumavky a označte je symboly **vz** a **0**. Do zkumavek napipetujte podle tabulky činidlo, dusitan sodný, fyziologický roztok a sérum.

	vz (vzorek)	0 (porovnávací roztok)
činidlo – kys. sulfanilová (ml)	0,2	0,2
dusitan sodný	1 kapka	1 kapka
fyziologický roztok (ml)	1,0	1,2
sérum (ml)	0,2	-

Promíchejte a přesně po **5 minutách** změřte absorbanci vzorku proti porovnávacímu roztoku při vlnové délce **510 nm**.

A vzorku	
-----------------	--

Koncentraci přímého bilirubinu odečtete z kalibračního grafu.

Cpřímý bilirubin = _____ $\mu\text{mol/l}$

Úkol 2: Stanovte hladinu celkového bilirubinu v krevním séru

Do dvou zkumavek označených symboly **vz** a **0** napipetujte podle tabulky:

	vz (vzorek)	0 (porovnávací roztok)
čínidlo – kys. sulfanilová (ml)	0,2	0,2
dusitan sodný	1 kapka	1 kapka
akcelerátor (ml)	1,0	1,0
fyziologický roztok (ml)	-	0,2
sérum (ml)	0,2	-

Promíchejte a po **10 minutách** přidejte:

tlumivý roztok (ml)	1,0	1,0
---------------------	-----	-----

Promíchejte a po **5 minutách** změřte absorbanci vzorku proti porovnávacímu roztoku při vlnové délce **580 nm**.

A vzorku	
----------	--

Koncentraci celkového bilirubinu odečtěte z kalibračního grafu.

Celkový bilirubin =	μmol/l
---------------------	--------

Jaká je normální (fyziologická) hodnota celkového bilirubinu v séru?

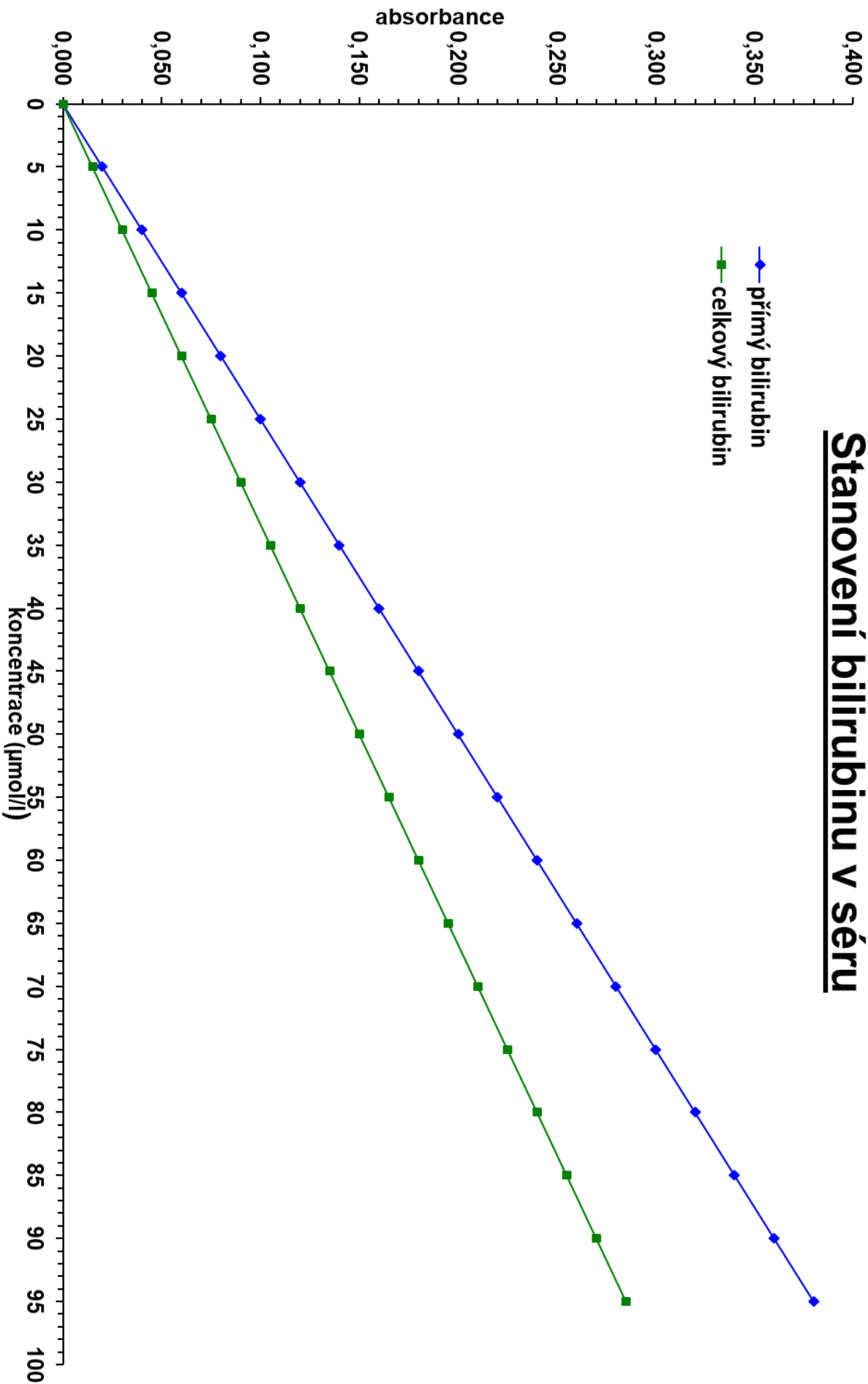
Jaká je normální (fyziologická) hodnota konjugovaného bilirubinu v séru?

Jaká je normální (fyziologická) hodnota nekonjugovaného bilirubinu v séru?

Výsledky obou metod interpretujte. O jaký typ hyperbilirubinémie se jedná?

Závěr:

Stanovení bilirubinu v séru



Lab 4: Vyšetřování moči I

a) Fyzikální vyšetření moči

Termínem fyzikální vyšetření moči se myslí to, co jde zjistit lidskými smysly, případně pomocí jednoduchých pomůcek:

- objem moči vytvořený za určitý čas (diuréza)
- barva
- zákal
- pěna
- zápach
- specifická hmotnost (hustota)
- osmolalita

Úkol: Proved'te fyzikální vyšetření vlastní moči

Do čisté nádoby odeberte vlastní moč. Vyhodno'te **barvu, zákal, pěnu a zápach**.

Popis vzorku moči:

Hustotu moči stanovte urometrem ve skleněném válci přiměřené velikosti. Moč nalijte do válce a opatrně do ní ponořte urometr tak, aby se nerozbil o dno válce. Urometr se nesmí dotýkat dna, ani stěn válce. Hustotu odečtěte na stupnici ve výšce hladiny moči.

Hustota moči:

Závěr:

b) Základní chemické vyšetření moči

I. Klasické chemické zkoušky

Během praktik budeme klasickými "zkumavkovými" zkouškami prokazovat bílkovinu, glukózu, aceton, krevní barvivo a žlučová barviva (bilirubin, urobilinogen). Dá se říct, že tyto látky nejsou normální součástí moči, fyziologicky obsahuje moč pouze velmi malé množství, které není běžnými zkouškami prokazatelné. Výsledky by proto měly být u zdravých jedinců negativní.

Abyste viděli pozitivní výsledek zkoušek, je připravený modelový vzorek moči obsahující danou látku (lahvička označená názvem dané látky). Doporučujeme provést danou zkoušku paralelně vždy jednak s modelovým vzorkem a se vzorkem vlastní moči, kde můžeme očekávat, že výsledek bude negativní. Naše "modelové vzorky" mají daleko ke skutečné moči, skutečná moč není bezbarvá :-).

Úkol 1: Proved'te základní chemické vyšetření vlastní moči klasickými zkouškami

Pro odměřování vzorků a činidel použijte přiložená kapátka, předepsané objemy jsou přibližné. Nezaměňujte kapátka, ať nedojde ke kontaminaci roztoků!

1. Průkaz bílkovin

Jaký je společný princip všech prováděných testů na bílkoviny v moči?
Co je proteinurie?
Co je Bence-Jonesova bílkovina?
Co je mikroalbuminurie?

a) Průkaz kyselinou sulfosalicylovou

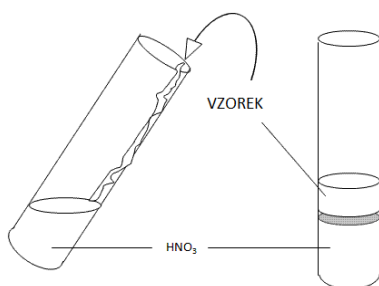
Do zkumavky přeneste asi 2 ml vzorku. Přidejte 5-10 kapek 20% kyseliny sulfosalicylové. Bílý zákal znamená přítomnost bílkoviny. Tato zkouška je nejcitlivější.

strukturní vzorec kys. sulfosalicylové

modelový vzorek		vlastní moč

b) Hellerova zkouška

Johann Florian Heller (1813-1871)



Do zkumavky dejte trochu koncentrované kyseliny dusičné (POZOR ŽÍRAVINA).

Zkumavku nakloňte a velmi opatrně navrstvěte vyšetřovaný vzorek (po stěně zkumavky).

V přítomnosti bílkoviny vznikne na rozhraní bílý prstenec sražené bílkoviny.

modelový vzorek	vlastní moč

c) Průkaz bílkoviny varem

Do zkumavky přeneste asi 2 ml vzorku moči. Přidejte asi 0,2 ml acetátového pufru (pH 4,6) a krátce povařte. Bílkovina dává bílý zákal.

modelový vzorek	vlastní moč

2. Průkaz glukózy

Jaký je společný princip všech prováděných testů na glukózu v moči?
Co je glukosurie?

a) Fehlingova zkouška *Hermann von Fehling (1812-1885)*

Nejprve do zkumavky připravte Fehlingovo činidlo - smícháním stejných dílů Fehlingova roztoku I a II, nejlépe hned tolik, abyste měli dost pro vyšetření modelového vzorku, vzorku vlastní moči a neznámého vzorku k analýze. Připravené činidlo je tmavě modré, čiré.

Vlastní zkouška:

Do zkumavky odlijte asi 1 ml připraveného Fehlingova činidla a přidejte stejný objem vzorku. Obsah zkumavky nad kahanem povařte. Pozitivita zkoušky se projeví vznikem sraženiny.

modelový vzorek	vlastní moč

b) Benediktova zkouška *Stanley Rossiter Benedict (1884-1936)*

Do zkumavky přeneste asi 2 ml Benediktova činidla. Přidejte 4-5 kapek vzorku a obsah zkumavky povařte. Pozitivita zkoušky se projeví změnou barvy a vznikem sraženiny.

modelový vzorek	vlastní moč

c) Nylanderova zkouška *Claus Wilhelm Gabriel Nylander (1835-1907)*

Do zkumavky přeneste asi 2 ml vzorku. Přidejte asi 1 ml činidla a obsah zkumavky povařte. V pozitivním případě vznikne špinavě žluté, žlutohnědé až černé zbarvení.

modelový vzorek	vlastní moč

3. Průkaz ketolátek

Termín "ketolátky" se týká 3 sloučenin. Napište jejich názvy a nakreslete jejich strukturní vzorce:

--	--	--

Jedna ze zmíněných ketolátek není keton (neobsahuje KETO skupinu). Která?

Bude tato látka prokazatelná níže uvedenými testy? ANO NE

*Ketolátky se tvoří, pokud dochází k nadměrnému metabolismu tuků ve spojení s nedostatečným metabolismem sacharidů (cukrů).
Uveďte příklad poruchy, když nastane tato situace:*

a) Lestradetova zkouška

Henri Lestradet (1921-1997)

Na filtrační papír dejte malé množství práškového Lestradetova činidla a pouze je zvlhčete kapkou vzorku. Pozitivní výsledek se projeví postupným vývojem fialového zbarvení.

modelový vzorek	vlastní moč

b) Legalova zkouška

Emmo Legal (1859-1922)

V jedné zkumavce si připravte čerstvý roztok nitroprusidu sodného ve vodě (několik zrnek do asi 2 ml vody).

Do další zkumavky dejte asi 5 ml vzorku, přidejte 5 kapek připraveného roztoku nitroprusidu a 5 kapek 10% NaOH. Objeví se červené zbarvení způsobené kreatininem.

Přidejte několik kapek koncentrované kyseliny octové a v přítomnosti ketolátek se zbarvení prohloubí (ztmavne), v negativním případě barva zežloutne.

modelový vzorek	vlastní moč

4. Průkaz krevního barviva

Heitz-Boyerova zkouška

Ve zkumavce smíchejte stejné díly vzorku a Heitz-Boyerova činidla.

Opatrně převrstvěte obsah zkumavky 3% peroxidem vodíku. Pozitivní reakce se projeví červenofialovým zbarvením (fenoltalein) na rozhraní kapalin.

modelový vzorek	vlastní moč

5. Průkaz bilirubinu

a) Naumannova reakce

Hans Norbert Naumann (1901-1985)

Ve zkumavce si protřepete asi 5 ml vzorku s talkem (na špičku nože).

Připravte si malou nálevku, filtrační papír a směs moči s talkem zfiltrujte.

Do středu filtračního papíru (na zachycený talek) kápněte Fouchéovo činidlo (FeCl_3 a kyselina trichloroctová). Pozitivní výsledek se projeví modrou skvrnou (bilicyanin).

modelový vzorek	vlastní moč

6. Průkaz Ehrlich pozitivních látek (urobilinogenů)

Ehrlichova zkouška

Paul Ehrlich (1884-1915)

Do zkumavky přeneste asi 2 ml vzorku. Přidejte několik kapek Ehrlichova aldehydového činidla. Pozitivním výsledkem je různě intenzivní červené zbarvení.

modelový vzorek	vlastní moč

Závěr:

Úkol 2: Proved'te analýzu neznámého vzorku

Imitaci vzorku moči otestujte na přítomnost proteinů, glukózy, ketolátek, krve a urobilinogenu pomocí uvedených zkoušek.

<i>Vzorek číslo:</i>	
Testovaná látka	Výsledek
proteiny (precipitace kyselinou sulfosalicylovou)	
glukóza (Fehlingova reakce)	
ketony (Lestradetova zkouška)	
krev (Heitz-Boyerova zkouška)	
urobilinogen (Ehrlichova zkouška)	
Závěr:	

II. Diagnostické proužky

V dnešní době se základní chemické vyšetření moči provádí pomocí diagnostických proužků. Jsou vyrobeny z plastu, na který jsou nalepené plošky s fixovanými chemickými činidly. Počet detekčních zón je různý dle výrobce a typu diagnostického proužku. Výhodou je snadnost provedení a rychlost získání výsledku. V České republice jsou nejčastěji používané proužky „PHAN“ (výrobce: Erba Lachema).



HeptaPHAN

pH
bílkoviny
glukóza
ketolátky (ketony)
urobilinogen
bilirubin
krev (erythrocyty a hemoglobin)

Výsledek je možné odečíst vizuálním srovnáním s barevnou stupnicí na krabičce nebo provést objektivní vyhodnocení pomocí analyzátoru. Pro odečítání proužků „PHAN“ je dostupný systém LAURA® Smart. Vyhodnocování analýzy moče pomocí LAURA® Smart eliminuje subjektivní interpretaci barevné odezvy diagnostických zón.



Úkol: Proved'te základní chemické vyšetření vlastní moči pomocí diagnostického proužku

Pracovní postup:



1 Vyměte proužek z tuby.



2 Tubu se zbývajícím diagnostickými proužky ihned pečlivě uzavřete.



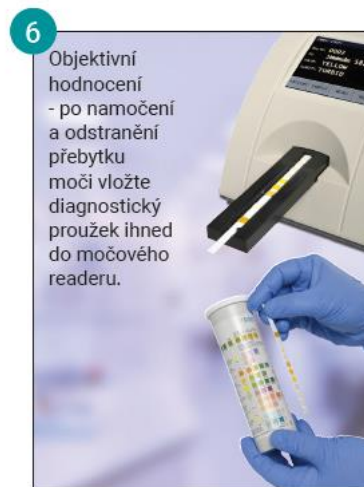
3 Namočte diagnostický proužek do vzorku moči tak, aby všechny diagnostické zóny byly ponořené (namočení 2 - 3 s).



4 Proužek vyměte a přebytečnou moč odstraňte otřením hrany o okraj nádoby.



5 Zbývající přebytečnou moč odstraňte otřením hrany proužku o papírový ubrousek (neotírejte testovací zóny).



6 Objektivní hodnocení - po namočení a odstranění přebytku moči vložte diagnostický proužek ihned do močového readeru.

Vizuální hodnocení – po uplynutí předepsané reakční doby uvedené v návodu srovnajte výsledné zbarvení s barevnou srovnávací stupnicí na štítku.

*Vyšetřete svoji vlastní moč pomocí diagnostického proužku HeptaPHAN.
(K odečtení výsledku je možné využít systém Laura[®] Smart.)*

c) Mikroskopické vyšetření močového sedimentu

Teorie je velmi pěkně zpracovaná zde:

<https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/js15/mikroskop/web/index.html>

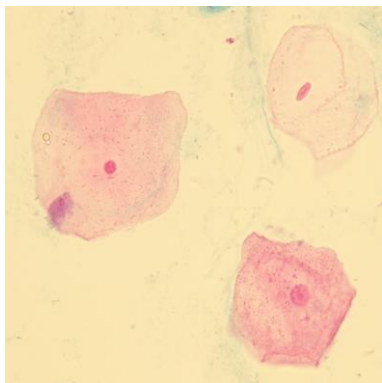
Atlas močového sedimentu:

<http://sekk.cz/atlas/index.htm>

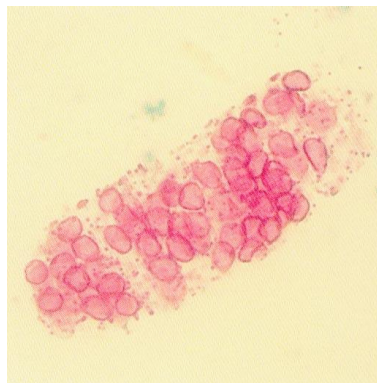
Velmi stručně:

Centrifugací moči se získá sediment ("dense and insoluble deposits"), který se následně hodnotí pod mikroskopem. Elementy, po kterých se pátrá, jde stručně shrnout jako:

buňky (cells)



válce (casts)



krystaly (crystals)



Úkol: Proved'te mikroskopické vyšetření vlastní moči

Preparát zhotovíte z vlastní moči, kterou odeberete do čisté nádoby.

Moč dobře promíchejte a napipetujte 5 ml moči do centrifugační zkumavky. Zkumavku předejte laborantce. Následuje centrifugace 5 min při 2000 ot/min.

Bezprostředně po odstředění slijte supernatant tak, aby ve zkumavce zůstalo jen přibližně 0,5 ml supernatantu. K sedimentu přidejte 1 kapku pracovního roztoku ze soupravy na barvení močového sedimentu a důkladně promíchejte pomocí kapátka. Nechte 5 minut barvit.

1 kapku obarveného sedimentu naneste do jamky speciálního sklíčka pro vyšetření močového sedimentu a prohlížejte pod mikroskopem.

Popište nález, vypracujte závěr:

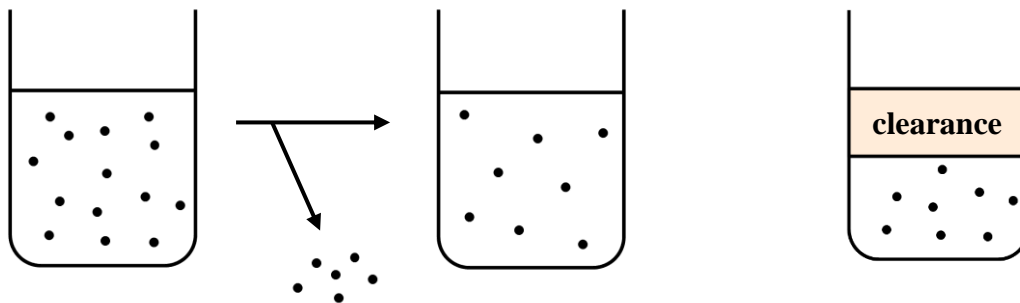
Lab 5: Vyšetřování moči II

a) Stanovení glomerulární filtrace jako clearance kreatininu

Funkční vyšetření ledvin umožňují posoudit, zda je funkce ledvin fyziologická či snižená. K základním metodám patří stanovení glomerulární filtrace (GF). Glomerulární filtrace je jedním ze základních procesů probíhajících v nefronu. Lze ji měřit na podkladě vylučování látky, která volně prochází do glomerulárního filtrátu (tj. ve stejné koncentraci jakou má v krevní plazmě) a v tubulech není ani resorbována ani secernována.

Clearance

Je to taková virtuální, ne úplně snadno pochopitelná veličina. Clearance udává objem krevní plazmy, který byl úplně očištěn od dané látky za jednotku času.



Ve skutečnosti nebude od dané látky **úplně** očištěno pravděpodobně vůbec nic, dojde *jen* ke snížení koncentrace dané látky. Obrázek vpravo ukazuje, jak se na to dívat. Uvažujme, že v části zůstane původní koncentrace a část bude úplně očištěna. Právě tato úplně očištěná část reprezentuje clearance.

Rozumět termínu clearance je nutné hlavně ve farmakologii, "očist'ovat" krevní plazmu je možné činnostmi více orgánů:

ledviny - vylučování látky do moči

játra - odstranění látky jejím metabolismem

plíce - vydýchání

kůže - eliminace látky v potu

My se dále budeme zabývat pouze a jenom **renální clearance**. *Renální clearance* udává objem krevní plazmy, který byl úplně očištěn od dané látky za jednotku času *činností ledvin*.

glomerulární filtrace = clearance látky, která volně prochází do glomerulárního filtrátu a v tubulech není ani resorbována ani secernována.

Takovou teoretickou ideální látkou je inulin.

Co to je inulin?

Inulin se normálně v lidském těle nevyskytuje, vyšetření využívající inulin by bylo velmi komplikované. V praxi je možné měřit glomerulární filtraci pomocí clearance endogenního markeru filtrace - kreatininu. I tak je to metoda dosti složitá, hlavním limitujícím faktorem je správný sběr moči.

strukturní vzorec kreatininu

Úkol: Stanovte clearance kreatininu

Do čisté nádoby odeberte vlastní moč.

Vzorek moči 100× zřed'te.

Do odměrné baňky (o objemu 100 ml) napipetujte **1 ml moči**.

Destilovanou vodou doplňte odměrnou baňku po rysku (tj. na objem 100 ml).

Odměrnou baňku uzavřete zátkou a obsah **důkladně promíchejte**.

Proč moč ředíme?

Látky, které se v glomerulu volně filtrují a následně nepodléhají ani tubulární resorpci ani tubulární sekreci (o kreatininu předpokládáme, že se právě tak chová), mají v definitivní moči zhruba 100× větší koncentraci než v glomerulárním filtrátu (koncentrace v glomerulárním filtrátu je blízká koncentraci v krevní plazmě).

Při fotometrickém stanovení, kdy paralelně zpracováváme vzorek a standard, je nutné, aby koncentrace vzorku nebyla příliš vzdálená od koncentrace standardu. V praxi se postupuje tak, že se používá standard o koncentraci srovnatelné s očekávanou koncentrací vzorku. Další možností je ředění vzorku tak, abychom se dostali po naředění řádově ke koncentraci standardu. Ze změřené koncentrace naředěného vzorku a známého ředění můžeme snadno spočítat koncentraci původního (neředěného) vzorku, která nás zajímá.

V našem případě jako standard použijeme krevní sérum o známé koncentraci kreatininu (**177 μmol/l**), pro zjištění clearance kreatininu musíme změřit jeho koncentraci jednak ve vzorku krevní plazmy (sérum) vyšetřovaného pacienta, jednak v průměrném vzorku po dobu 24 hodin sbírané moči. Očekávaná koncentrace kreatininu v séru je řádově srovnatelná s koncentrací standardu, ale pro moč tohle neplatí, očekávaná koncentrace v moči je řádově 100× vyšší, proto musíme před měřením vzorek moči ředit.

Podle následujícího schématu napipetujte:

- vzorek **séra** a **standardu** do **centrifugačních zkumavek**
- vzorek moči a slepý vzorek (porovnávací roztok) do **tenkostěnných zkumavek**

Krevní sérum a moč jsou úplně jiné biologické matrice, zkumavky 1 (sérum) a 2 (standard) budou zpracovávány odlišným způsobem – je nutné odstranit proteiny, které by rušily stanovení, precipitací kyselinou trichloroctovou.

Objemy jsou uvedeny v ml	centrifugační zkumavky		tenkostěnné zkumavky	
	1	2	3	4
	Sérum	Standard	Zředěná moč	Porovnávací roztok
sérum	0,50	–	–	–
standard	–	0,50	–	–
zředěná moč	–	–	0,50	–
destilovaná voda	1,00	1,00	0,25	0,75
kys. trichloroctová	0,50	0,50	0,25	0,25

Lihovým fixem zkumavky očísľujte a centrifugační zkumavky označte tak, abyste si je poznali.

Obsah zkumavek promíchejte a nechte **5 minut stát**.

Centrifugační zkumavky (1 a 2) odevzdejte laborantce k provedení centrifugace (10 min, 2500 ot/min). Tenkostěnné zkumavky (3 a 4) ponechte zatím stát ve stojánku na stole.

Čekání můžete využít k vyzkoušení webových kalkulačků GF.

Po dokončení centrifugace přeneste opatrně do paralelních tenkostěnných zkumavek (1 a 2) po **1,00 ml** supernatantu.

V tomto kroku máte připravené 4 zkumavky, každá obsahuje 1 ml roztoku (zkumavka 1 a 2 supernatant odebraný po centrifugaci, zkumavky 3 a 4 máte už připraveny).

Vlastní stanovení kreatininu (Jaffého reakce)

Ke stanovení kreatininu se používá reakce s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí. Reakce není specifická, podobně reaguje řada dalších látek (tzv. Jaffé-pozitivní chromogeny).

Do všech zkumavek napipetujte roztok kyseliny pikrové a NaOH (viz tabulka):

	1	2	3	4
<i>kys. pikrová</i>	0,50	0,50	0,50	0,50
<i>hydroxid sodný</i>	0,50	0,50	0,50	0,50

Obsah zkumavek promíchejte a nechte **20 minut** stát.

Čekání můžete využít k provedení další úlohy - Aminokyseliny a jejich metabolity v moči.

Změřte absorbanci všech tří vzorků ($A_{\text{sérum}}$ = zkumavka č. 1 – sérum, A_{st} = zkumavka č. 2 – standard, $A_{\text{zř. moč}}$ = zkumavka č. 3 – zředěná moč) proti porovnávacímu roztoku (zkumavka č. 4) při vlnové délce **505 nm**.

$A_{\text{sérum}}$	
A_{st}	
$A_{\text{zř. moč}}$	

Proveďte výpočet koncentrace kreatininu v séru (S_{kr}):

$$S_{\text{kr}} = c_{\text{st}} \times \frac{A_{\text{sérum}}}{A_{\text{st}}}$$

Proveďte výpočet koncentrace kreatininu ve zředěné moči ($U_{\text{zř. moč}}$):

$$U_{\text{zř. moč}} = c_{\text{st}} \times \frac{A_{\text{zř. moč}}}{A_{\text{st}}}$$

Proveďte výpočet koncentrace kreatininu v původní neředěné moči (U_{kr}):

$$U_{kr} = 50 \times U_{zř. moč}$$

pozn. Moč jste před stanovením kreatininu ředili 100×, ale zkumavky 1 a 2 (kde je bylo matricí sérum) byly zpracovávány odlišným způsobem než zkumavka se zředěnou močí, po centrifugaci byla dále zpracovávána jen polovina výchozího množství...

Proveďte výpočet odhadu glomerulární filtrace jako clearance kreatininu:

$$GF \approx C_{kr} = \frac{U_{kr}}{S_{kr}} \times V$$

kde V je diuréza/24 hodin, počítejte s údajem $V = 1,78$ l/den

Referenční hodnota kreatininu v krvi:

Referenční hodnota kreatininu v moči: 1. ranní moč

♂ 3,5 – 24,6 mmol/l

♀ 2,6 – 20,0 mmol/l

Referenční hodnota clearance kreatininu:

Závěr:

Provedení v praktických cvičeních neodpovídá vyšetření jednoho daného pacienta, i když pracujete s vlastní močí, spočítaná glomerulární filtrace nic neříká o funkci vašich ledvin !!!

Zamyslete se, jak jste postupovali:

U_{kr}	vlastní moč – jednorázový odběr
S_{kr}	fetální bovinní sérum
V	24-hodinový sběr moče nebyl prováděn, diuréza/24 hodin je už pro výpočet dopředu udána

Jak se vyšetření skutečně provádí:

Pokyny k provedení vyšetření (citováno dle: Ústav klinické biochemie a hematologie FN Plzeň)

Clearance endogenního kreatininu (C_{kr})

3 dny před a během testu vynechat maso, výrobky z masa, léky – pokud je to z klinického hlediska možné. Vyhnout se fyzické námaze. V den testu přijímat průměrné množství tekutin; pacient nesmí pít příliš, ale též nesmí žíznit. Nepodávat látky s močopudným účinkem (diuretika, káva, čaj). Dodržovat tělesný klid; vyšetřovaný leží nebo mírně přechází. Provádíme **24-hodinový sběr moče**. Moč není třeba konzervovat, případná konzervace nevadí. Do laboratoře zaslat 5 ml průměrného vzorku moče na stanovení hladiny kreatininu (U_{kr}). Na žadance vyznačit diurézu/24 h s přesností na 10 ml. Současně ráno nalačno, stačí na konci sběrného období, odebrat srážlivou krev na stanovení hladiny sérového kreatininu (S_{kr}). Výpočet se vztahuje na ideální tělesný povrch $1,73 \text{ m}^2$; k výpočtu skutečného tělesného povrchu je třeba udat hmotnost a výšku pacienta.

Největší zdroj chyb představuje sběr moči!

Proto se dnes glomerulární filtrace raději odhaduje z parametrů, jejichž zjištění nevyžaduje sběr moči. Existuje spousta vzorců pro odhadování glomerulární filtrace:

Cockcroft a Gault (1973)

MDRD (2005)

CKD-EPI kreatinin (2009)

CKD-EPI cystatin C (2012)

CKD-EPI kreatinin - cystatin C (2012)

b) Aminokyseliny a jejich metabolity v moči

Aminokyseliny jsou nízkomolekulární látky (rozuměj: mají malou relativní molekulovou hmotnost), v glomerulech jsou tedy volně filtrovány, ale podobně jako glukóza jsou v proximálním tubulu aktivně resorbovány. V moči proto nejsou normálně téměř vůbec přítomny, fyziologické vylučování je minimální. Vylučování aminokyselin do moči se nazývá **aminoacidurie**.

Renální aminoacidurie je důsledkem postižení renálních tubulů, které nejsou schopny z glomerulárního filtrátu resorbovat všechny aminokyseliny ani při jejich normální hladině v krvi. Existují i geneticky podmíněné defekty specifických reabsorpčních systémů.

Při **overflow** aminoacidurii nabídka jedné nebo více aminokyselin převyšuje resorpční kapacitu ledvinných tubulů, tj. ledviny jsou v pořádku, problém je ve zvýšené hladině nějaké aminokyseliny v krvi (stejný princip jako v případě glukózy v moči u diabetika).

Úkol: Proved'te průkaz aminokyselin ve vlastní moči

Pro stanovení aminokyselin v moči použijte modelový vzorek moči. Obsahuje danou aminokyselinu, proto bude výsledek pozitivní. Jako negativní kontrolu použijte vlastní moč.

1. Průkaz cystinu

Zvýšená hladina cystinu v moči je typická u cystinurie . Uveďte stručnou charakteristiku tohoto onemocnění:	<i>strukturní vzorec cystinu</i>
---	----------------------------------

Na filtrační papír dejte malé množství práškového činidla (nitroprusid sodný + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Na_2CO_3 + NaCN) a zvlhčete kapkou vyšetřovaného vzorku. V pozitivním případě vznikne ihned červenofialové zbarvení.

modelový vzorek	vlastní moč

2. Průkaz fenylpyruvátu

nemoc: fenylketonurie Uveďte stručnou charakteristiku tohoto onemocnění:	<i>strukturní vzorec fenylpyruvátu</i>
--	--

K několika ml vyšetřovaného vzorku ve zkumavce přidejte 2 kapky 10% HCl a 3 kapky FeCl₃. V pozitivním případě vznikne tmavozelené zbarvení.

modelový vzorek	vlastní moč

3. Průkaz tyrosinu

nemoc: tyrosinémie (je jich více typů) Uveďte stručnou charakteristiku tohoto onemocnění:	<i>strukturní vzorec tyrosinu</i>
---	-----------------------------------

Ve zkumavce smíchejte stejný díl vyšetřovaného vzorku (max. 0,5 ml) a Millonova činidla (Hg + HNO₃). V pozitivním případě se do 10 minut vyvine červené zbarvení.

modelový vzorek	vlastní moč

Závěr:

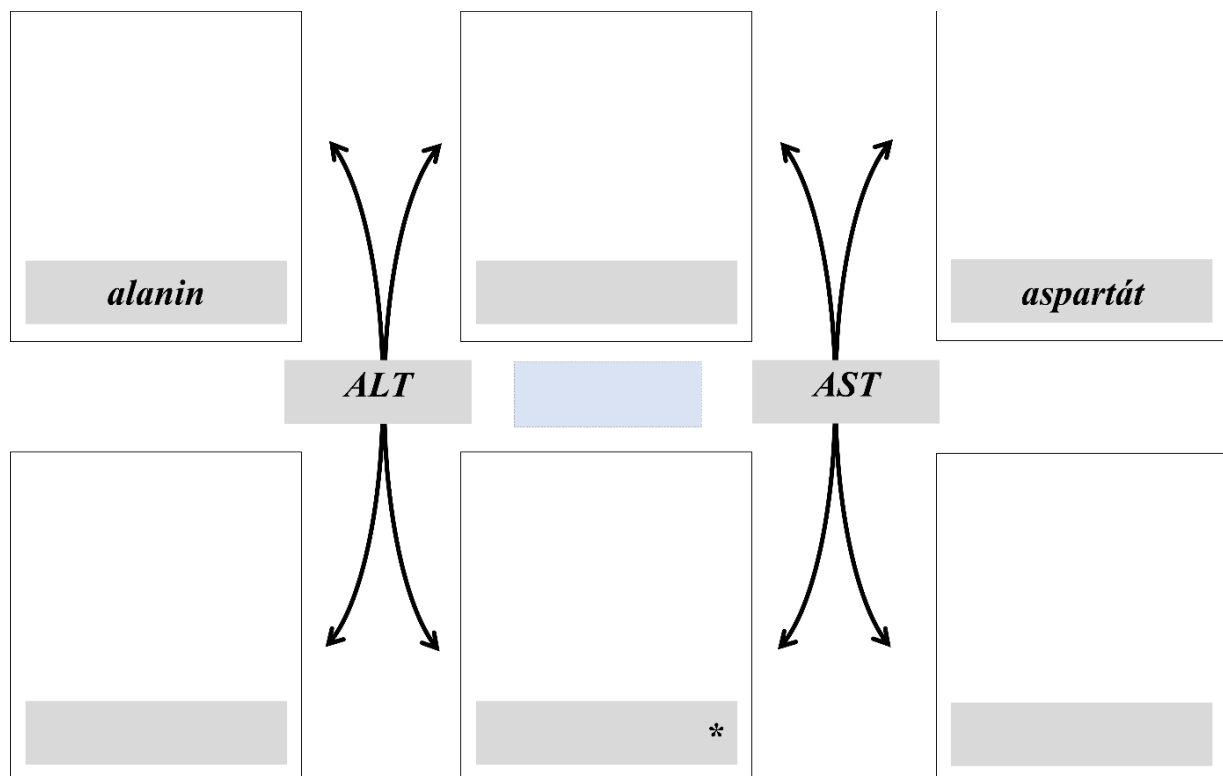
Lab 6: Klinická enzymologie

a) Sledování aktivity aminotransferáz ALT a AST v jaterním extraktu

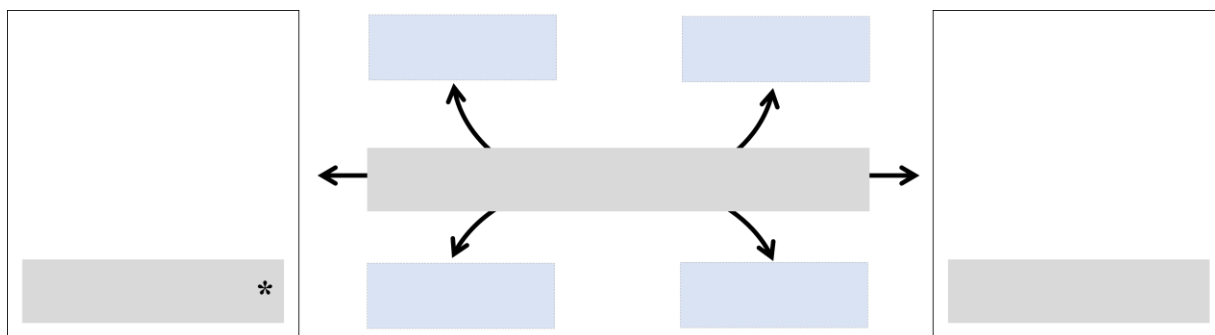
ALT a AST jsou enzymy katalyzující transaminační reakce, patří k nejvíce stanovovaným enzymům v klinické praxi. V našem experimentu nebudeme měřit jejich katalytickou koncentraci v krevním séru, budeme pouze prokazovat jejich přítomnost v jaterní tkáni (hepatocytech).

ALT =
AST =

Zapište ve vzorcích rovnice reakcí:



Tímto mechanismem (nepřímou deaminací = transaminací) se při degradaci zbavuje dusíku většina aminokyselin. Pouze jedna jediná aminokyselina se zbavuje dusíku přímo ve formě amoniaku (přímá deaminace = oxidační deaminace). Je to právě ta, která vzniká "odkládáním dusíku" při transaminacích (označená * ve schématech).



ALT je obsažena nejvíce v **játrech**, je lokalizována pouze v cytoplazmě. Stanovení ALT v krevním séru je citlivým a relativně specifickým testem pro poškození jater. Aktivita v séru se zvyšuje již při malém poškození hepatocytů, stačí jen narušení permeability jejich buněčné membrány.

AST se vyskytuje v řadě orgánů – v **játrech, myokardu, kosterním svalstvu**, ale i v erythrocytech. AST je přítomna v mitochondriích (70 %) i v cytoplazmě (30 %). Mitochondriální frakce se dostává do krve až při nekróze (rozpadu) buňky. Výrazné zvýšení aktivity AST v séru je proto známkou těžšího poškození. AST není specifická pouze pro jaterní tkáň, její zvýšení může být způsobeno i poškozením kosterního svalstva nebo myokardu.

Jaká je normální (fyziologická) hodnota ALT v séru?
Jaká je normální (fyziologická) hodnota AST v séru?
K čemu se využívá De Ritisův kvocient?

Metoda stanovení je založena na rozdílné světelné absorpci 2,4-dinitrofenylhydrazonů kys. 2-oxo-glutarové a pyrohroznové, která vzniká u reakce ALT přímo, u reakce AST po spontánní dekarboxylaci oxalacetátu. Při vyšetření séra se určí aktivita z kalibrační křivky, sestavené podle absorpcí různě koncentrovaných hydrazonů pyrohroznové kyseliny.

Úkol: Prokažte přítomnost aminotransferáz v jaterních buňkách

Do 4 připravených zkumavek napipetujte roztoky dle tabulky:

	1 (pokusná)	2 (porovnávací)	3 (pokusná)	4 (porovnávací)
	ALT		AST	
substrát ALT	0,50 ml	0,50 ml	-	-
substrát AST	-	-	0,50 ml	0,50 ml

Zkumavky preinkubujte asi **10 minut při 37°C** ve vodní lázni.

Příprava jaterního extraktu (enzymového preparátu)

Asi 1 cm³ jaterní tkáň (připraveno na pracovním stole) rozdrťte v třecí misce, přidejte **5 ml fosforečnanového pufru** a ještě chvíli pokračujte v homogenizaci. Celý obsah třecí misky („homogenát“) přeneste do centrifugační zkumavky a zkumavku odevzdejte laborantce k provedení centrifugace (5 min, 2500 ot/min). Supernatant použijete jako enzymový preparát.

Do vlastních „pokusných“ zkumavek přidejte získaný enzymový preparát (jaterní extrakt):

jaterní extrakt	0,10 ml	-	0,10 ml	-
-----------------	---------	---	---------	---

Všechny 4 zkumavky inkubujte **30 minut při 37°C**, pak přidejte do všech zkumavek roztok dinitrofenylhydrazinu:

dinitrofenylhydrazin	0,50 ml	0,50 ml	0,50 ml	0,50 ml
----------------------	---------	---------	---------	---------

Obsah zkumavek promíchejte a nechte **stát 15 minut**.

Do všech zkumavek napipetujte roztok NaOH:

NaOH	5,00 ml	5,00 ml	5,00 ml	5,00 ml
------	---------	---------	---------	---------

Jaterní extrakt přidejte i do porovnávacích zkumavek:

jaterní extrakt	-	0,10 ml	-	0,10 ml
-----------------	---	---------	---	---------

Obsah zkumavek promíchejte. Na spektrofotometru při nastavené vlnové délce **506 nm** změřte absorbanci zkumavky č. 1 proti zkumavce č. 2 (odpovídá aktivitě ALT) a absorbanci zkumavky č. 3 proti zkumavce č. 4 (odpovídá aktivitě AST).

A _{ALT}	
A _{AST}	

Vyhodnocení, závěr:

b) Stanovení alkalické fosfatázy v séru

Alkalická fosfatáza (ALP) je enzym katalyzující hydrolýzu esterů kyseliny fosforečné v alkalickém prostředí (pH optimum 9,5–10,5). Alkalická fosfatáza je lokalizována v cytoplazmatických membránách buněk epitelu žlučových cest, v játrech, kostech, střevech, placentě.

Stanovení aktivity ALP je založeno na štěpení syntetického substrátu na barevný produkt, který umožňuje přímé fotometrické měření.

Do reakčního schématu doplňte strukturní vzorce a názvy reaktantů!



Úkol: Stanovte aktivitu ALP v krevním séru

Do 2 připravených zkumavek napipetujte roztoky dle tabulky:

Sérum najdete v malé plastové zkumavce („eppendorfce“).

Při pipetování malého objemu séra je třeba pracovat velice pečlivě, dbát na to, aby se sérum dostalo na dno zkumavky - sérum nesmí ulpět na stěně zkumavky!

	1 (vzorek)	2 (porovnávací roztok)
pufř	1,00 ml	1,00 ml
sérum	20 µl	-

Obsah zkumavek promíchejte a preinkubujte **5 minut při 37°C** ve vodní lázni.

Přidejte do obou zkumavek substrát:

substrát	0,20 ml	0,20 ml
----------	---------	---------

Inkubujte přesně **10 minut při 37°C**, pak enzymovou reakci zastavte přidáním inhibitoru:

inhibitor	0,50 ml	0,50 ml
-----------	---------	---------

Do zkumavky obsahující kontrolní roztok přidejte 20 µl séra:

sérum	-	20 µl
-------	---	--------------

Tím dosáhnete toho, že obě zkumavky obsahují „to samé“. Ale do zkumavky obsahující porovnávací roztok bylo sérum přidáno až po přidání inhibitoru. Enzym obsažený ve vyšetřovaném séru tedy zpracovával substrát pouze ve zkumavce č. 1, čím více enzymu je ve vyšetřovaném séru přítomno, tím více substrátu se ve zkumavce č. 1 přeměnilo na barevný produkt.

Obsah zkumavek promíchejte. Na spektrofotometru při nastavené vlnové délce **420 nm** změřte absorpanci (A) vzorku (zkumavka č. 1) proti porovnávacímu roztoku (zkumavka č. 2).

A	
---	--

Vypočítejte katalytickou koncentraci ALP ve vyšetřovaném séru dle vztahu:

$$\text{ALP } (\mu\text{kat/l}) = 10,236 \times A$$

ALP	µkat/l
-----	--------

Jaká je normální (fyziologická) hodnota ALP v séru?

Závěr:

c) Stanovení laktátdehydrogenázy v séru

Laktátdehydrogenáza (LDH) katalyzuje přeměnu *pyruvátu* na *laktát* za současné oxidace NADH na NAD⁺. Ke kinetickému stanovení aktivity laktátdehydrogenázy využijeme Warburgův optický test.

Zakreslete rovnici reakce katalyzované laktátdehydrogenázou ve strukturních vzorcích. Vyznačte reaktant, jehož absorbanci měříme.

Úkol: Stanovte aktivitu LDH v krevním séru

Zapněte fotometr (vyhříváný na 37°C). Dle přiloženého návodu nastavte vlnovou délku **340nm**.

Do fotometru vložte skleněnou kyvetu určenou pro měření **LDH**.

Pomocí pipety 1000 µl napipetujte do kyvety slepý vzorek (destilovaná voda) a proveďte měření slepého vzorku A = 0,000.

Skleněnou kyvetu vyprázdněte a vložte zpět do fotometru.

Stanovení aktivity standardu

Do „eppendorfky“ napipetujte **20 µl standardu** a **1000 µl pracovního roztoku**, spusťte stopky, promíchejte roztok 2× nasátím do pipety na 1000 µl a neprodleně vpravte do kyvety. Na konci **2., 3., 4. a 5. minuty** stiskněte tlačítko pro měření absorbance a na displeji fotometru odečtěte absorbanci. Po změření standardu obsah odstraňte a kyvetu několikrát propláchněte destilovanou vodou.

Stanovení aktivity vzorku

Stejný postup opakujte s reakční směsí **20 µl vzorku** a **1000 µl pracovního roztoku**.

	standard	vzorek
A ₂		
A ₃		
A ₄		
A ₅		

Získané hodnoty zadejte do připraveného souboru v počítači (*LD.xls*).

Sem vložte získaný graf

LDH	$\mu\text{kat/l}$
-----	-------------------

Jaká je normální (fyziologická) hodnota LDH v séru?

Závěr:

Lab 7: Molekulární biologie I

Úkol: Vyšetřete přítomnost Leidenské mutace ve vzorku vlastní DNA

Celý blok praktik z molekulární biologie se bude zabývat detekcí Leidenské mutace.

Co je Leidenská mutace (o jaký typ mutace se jedná, co způsobí)?

a) Izolace DNA

Nejprve musíte získat vlastní DNA potřebnou pro detekci Leidenské mutace.
Izolační kit MACHEREY-NAGEL (ze stěru bukální sliznice)

Studenti, kteří budou poskytovat vzorek pro izolaci DNA, by před odběrem neměli pít horké nápoje a alkohol, stejně tak by se měli vyvarovat použití ústní vody.

Nukleové kyseliny lze izolovat z jakéhokoli biologického materiálu obsahujícího buňky se zachovanými jádry. Pokud je třeba získat materiál pro izolaci DNA neinvazivním způsobem, využívá se odběr z bukální sliznice.

V praktiku používáme kolonkovou metodu, která pracuje na principu iontové výměnné chromatografie. Molekuly DNA nesou záporný náboj. V přítomnosti vysoké koncentrace tzv. chaotropních solí se nukleové kyseliny z buněčného lyzátu naváží na silikát, zatímco většina kontaminujících látek kolonkou proteče. Po promytí kolonky se čistá DNA eluuje do vhodného pufru.

Provedení

1. Mnohokrát přejetete odběrovou tyčinkou po sliznici pravé i levé tváře, **cca 2-3 min.**
2. Přenesete do **1,5ml eppendorfky** a pomocí víčka a stěny zkumavky odlomíte část s vatičkou.
3. Přidáte **100 µl PBS**, **15 µl proteinázy K**, **100 µl roztoku B3**. Vortexujete **60 s**.

4. Vložíte do termobloku a budete inkubovat **10 min** při **56°C**. Vortexujete **30 s**.
5. Vložíte do termobloku a budete inkubovat **5 min** při **70°C**. Vortexujete **30 s**.
6. Přidáte **100 µl 96% ethanolu** a vortexujete **10 s**. Lehce stočíte.
7. Přenesete **lyzát** (bez vatičky) pipetou na **kolonku** a centrifugujete **12000 ot/min, 1 min**.
8. Vložíte kolonku do nové zkumavky a přidáte **400 µl roztoku BW**, centrifugujete **12000 ot/min**, po dobu **1 min**.
9. Vložíte kolonku do nové zkumavky a přidáte **400 µl roztoku B5**, centrifugujete **12000 ot/min**, po dobu **1 min**.
10. Slijete promývací roztok ze spodní zkumavky, vložíte kolonku zpět do zkumavky a centrifugujete **12000 ot/min** po dobu **3 min**.
11. Vložíte kolonku do 1,5ml eppendorfky (*zkumavku předem popíšete vašimi iniciálami a datem, kdy byla izolace provedena*), na dno kolonky opatrně napipetujete **50 µl roztoku BE** předehtého na **70°C**. Necháte stát **1 min** při pokojové teplotě.
12. Centrifugujete **12000 ot/min** po dobu **1 min**.

b) Měření koncentrace DNA, kontrola čistoty

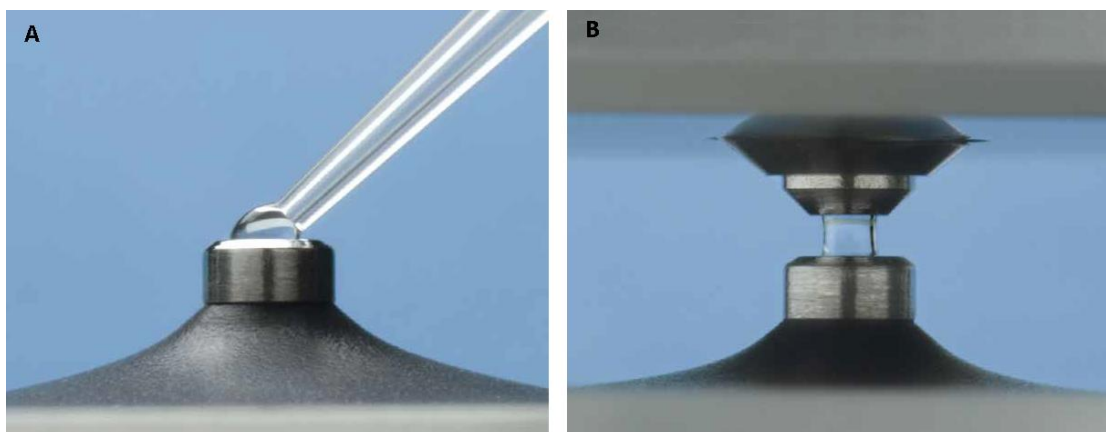
Pro stanovení koncentrace nukleových kyselin a kontrolu jejich čistoty lze využít spektrofotometrii. Roztok nukleové kyseliny (DNA i RNA) má absorpční maximum při 260 nm, proteiny maximálně absorbují při 280 nm, při 230 nm mají absorpční maximum nízkomolekulární látky (např. fenol, chloroform, EDTA používané při izolaci nukleových kyselin).

Koncentrace nukleové kyseliny se počítá ze změřené absorbance při 260 nm.

Platí, že $A_{260} = 1$ odpovídá u dvouřetězcové DNA (dsDNA) koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$.

Čistota vzorku se hodnotí podle poměrů absorbancí A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} . Poměr A_{260}/A_{280} by měl být pro čistou DNA okolo 1,8. Poměr A_{260}/A_{230} by měl být pro čistou DNA vyšší než 2,0. Pokud je hodnota poměrů výrazně nižší, je roztok kontaminován proteiny nebo fenolem.

Mikroobjemový spektrofotometr DeNovix DS-11 – nanáší se 1 μl vzorku.



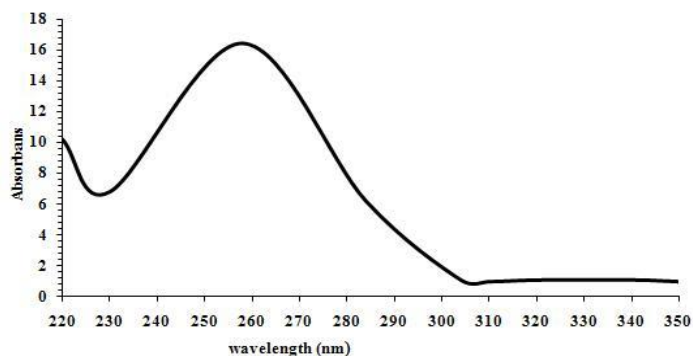
Aplikace vzorku na měřicí plošku

Vlastní měření

1. Na spektrofotometru zvolíte program: „dsDNA“.
2. Spektrofotometr vynulujete proti slepému vzorku („blank“).
3. Změříte absorpční spektrum vzorku DNA v rozsahu 220 nm – 350 nm.
4. Přístroj zobrazí na displeji: změřené spektrum

absorbanci při 260 nm (A_{260}), koncentraci DNA

poměry A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230}

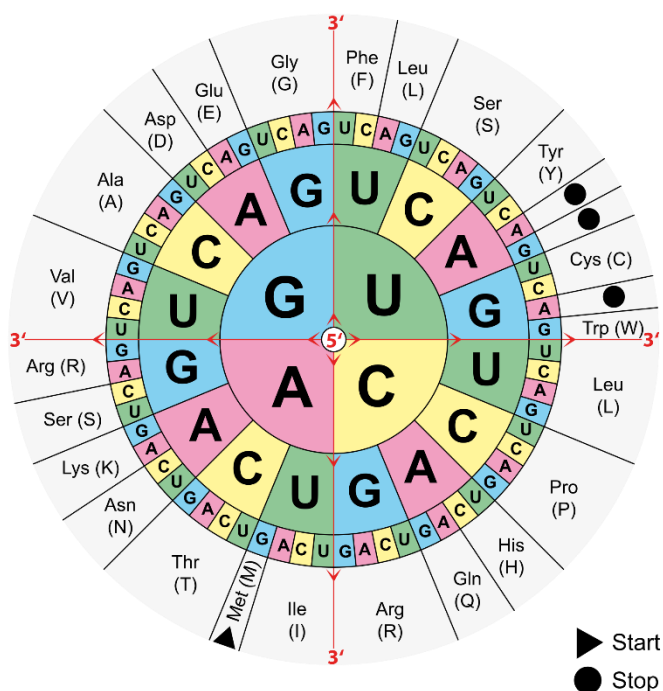


Absorpční spektrum čisté DNA

Parametr	Hodnota
A_{260}	
koncentrace	
A_{260} / A_{230}	
A_{260} / A_{280}	

Lab 8: Molekulární biologie II

„Přeložte“ nukleotidovou sekvenci oblasti genu kódujícího hemokoagulační faktor V, kde se nalézá mutace Leiden, do aminokyselinové sekvence (používejte třípísmenné zkratky aminokyselin příklad zápisu sekvence Gly-Asp-Leu). Obrázek ukazuje genetický kód.



FV wild type

Sekvence DNA: 1684 GAC AGG CGA GGA ATA CAG

Aminokyselinová sekvence: 504

Napište stejný úsek sekvence genu pro faktor V nesoucího mutaci:

FV Leiden G 1691 A

Sekvence DNA: 1684

Aminokyselinová sekvence: 504

Sekvence DNA se podle konvence vždy píše ve směru 5' - 3'.

Číslování – první nukleotid nebo aminokyselina v dané sekvenci odpovídají pozici uvedené příslušným číslem.

a) Polymerázová řetězová reakce

V tomto praktiku budete amplifikovat pomocí PCR vybraný úsek genu pro Faktor V (úsek, který obsahuje SNP našeho zájmu, tj. oblast obsahující místo, kde může být "Leidenská mutace").

Vysvětlete princip PCR:

(Jak je vybrán úsek ke zmnožení? Jaké je složení reakční směsi? Jak zmnožení probíhá?)

*Pracujte v rukavicích (powder-free)!
Některé kroky se budou provádět na ledu.*

Příprava master mixu *(pro celou skupinu jeden společný)*

Jedna jednotlivá PCR reakce se provádí ve velmi malém objemu (20 µl). Bylo by příliš pracné a nakonec i technicky obtížně proveditelné pipetovat jednotlivé složky do každé mikrokumavky zvlášť. Proto se vše, co je společné, napipetuje nejdříve dohromady pro všechny zamýšlené PCR reakce. Takto připravenému pracovnímu roztoku se říká slangově "master mix".

V dnešní době nabízí firmy už předpřipravené master mixy (obsahují Taq polymerázu ve vhodném pufru, dNTP, Mg²⁺), do kterých je nutné přidat pouze primery a DNA.

Do **1,5 ml eppendorfky** si připravíte master mix pro 8 PCR reakcí *(budete amplifikovat 4 vzorky, 2 pozitivní kontroly a negativní kontrolu, „nadbytečná“ reakce je počítána na ztráty při pipetování)*, každá bude o celkovém objemu reakční směsi 20 µl (18 µl master mixu + 2 µl vzorku DNA).

	1 reakce	8 reakcí
	μl	μl
voda	7,6	60,8
gb Basic PCR Master Mix (2 \times)	10	80
forward primer (F)	0,2	1,6
reverse primer (R)	0,2	1,6
vzorek DNA	2	vzorek se bude přidávat později, až do jednotlivých PCR zkumavek
Celkový objem:	20	

Eppendorfku s mastermixem lehce zvortexujte a následně dejte krátce zcentrifugovat. Držte na ledu.

Příprava PCR - vzorky

Do platička (destičky) si připravte **PCR zkumavky** – tři pracovní skupiny po dvou zkumavkách, čtvrtá pracovní skupina pouze jednu zkumavku a rozpipetujte do nich po **18 μl master mixu**.

Do každé zkumavky se k 18 μl mastermixu přidá po **2 μl vzorku DNA**. Každá pracovní skupina pipetuje svůj vzorek DNA (DNA izolovaná v průběhu minulých praktik). První pracovní skupinka navíc napipetuje první pozitivní kontrolu – 2 μl roztoku DNA ze zkumavky označené **+K1**. Druhá pracovní skupinka navíc napipetuje pozitivní kontrolu – 2 μl roztoku DNA ze zkumavky označené **+K2**. Poslední pracovní skupinka napipetuje negativní kontrolu – místo DNA 2 μl vody.



Zkumavky vložte do bloku termocykleru a spusťte přednastavený program.

Parametry PCR:

Krok	Teplota	Délka
úvodní denaturace	95°C	2 min
35 cyklů	95°C	30 s
	60°C	30 s
	72°C	30 s
závěrečná extenze	72°C	5 min
uchování	4°C	do nekonečna

V následující sekvenci (část sekvence genu kódujícího koagulační faktor V) vyznačte místa, kam se budou vázat primery při amplifikaci pomocí PCR.

Sekvence primerů:

FVL F 5'- GGA ACA ACA CCA TGA TCA GAG CA -3' 23 mer
FVL R 5'- TAG CCA GGA GAC CTA ACA TGT TC -3' 23 mer

```
1274        GGTGCAGCACACCAACATGACACATGTATACATATGTAACAAACCTGCACGTTGTGCACA
1334        TGTACCCTAGAACTTAAAGTATAATTTAAAAAATAAAAAATAAAGAATTCCCTTTTGCA
1394        ATATTAATTGGTTCCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTATCATGAAATAACTTTGCA
1454        AATGAAAACAATTTTGAATATATTTTCTTTTCAGGCAGGAACAACACCATGATCAGAGCAG
1514        TTCAACCAGGGGAAACCTATACTTATAAGTGGAACATCTTAGAGTTTGATGAACCCACAG
1574        AAAATGATGCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA
1634        TCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCAG
1694        GAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTCTTCTGGCT
1754        AGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTAAATAATGGGGCATTTCCTTCAAGAGAACAGTAATTG
1814        TCAAGTAGTCCTTTTTCAGCACCAGTGTGATAACATTTATTCTTTTTTTTTTTTTGTCTTG
1874        TCTATTTTTATCAGTACCATCACTGCCGAAGGCAAGTCTAGAGTGTGATAACATATTTTG
```

Sekvence – normální alela, žlutě vyznačena pozice, kde se nachází mutace FV Leiden.

Jak dlouhý bude amplifikovaný produkt?

Lab 9: Molekulární biologie III

a) Restrikční štěpení

Vysvětlete, co jsou restrikční endonukleázy a jak fungují:

V tomto praktiku použijeme restrikční endonukleázu MnlI k analýze úseku DNA amplifikovaného PCR metodou v minulém týdnu.

Pracujte v rukavicích (powder-free)!

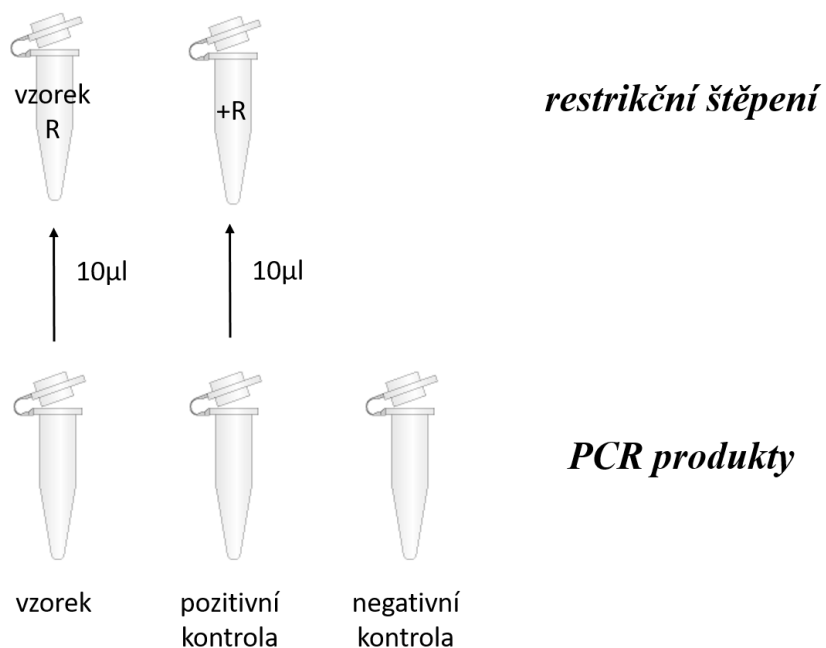
Provedení

Dostanete **1 nebo 2 PCR zkumavky** zpracovávané v minulém týdnu.

V každé je 20 μ L PCR reakční směsi (doufejme, že s příslušným PCR produktem).

- vzorek vaší DNA *zkumavka označená vašimi iniciálami*
- pozitivní kontrola (faktor V Leiden, homozygot) *zkumavka označená "+K1"*
- pozitivní kontrola (faktor V Leiden, heterozygot) *zkumavka označená "+K2"*
- negativní kontrola *zkumavka označená "-K"*

K provedení restrikční analýzy budete potřebovat buď **jednu** novou **PCR zkumavku** (skupinka, které pracovala jen se svým vzorkem nebo s negativní kontrolou) nebo **dvě** nové **PCR zkumavky** (skupinka, která pracovala s pozitivní kontrolou). Do jedné přeneste přesně **10 μ L** PCR produktu ze zkumavky se zpracovaným vzorkem vaší DNA, do druhé ze zkumavky s pozitivní kontrolou. Označte nové zkumavky symbolem "R", tj. "*vaše iniciály R*", "+ R".



Celkový objem reakce restrikčního štěpení bude 20 μL . Zatím máte ve zkumavkách připraveno přesně 10 μL PCR produktů k analýze.

1. Přidejte následující v uvedeném pořadí:

PCR produkt (DNA)	10 μL
voda	7 μL
10x FastDigest Green Buffer	2 μL
FastDigest enzym MnlI	1 μL

	20 μL

2. Lehce zvertexujte a následně dejte krátce zcentrifugovat.

3. Inkubujte při **37° C** v bloku termocyklieru po dobu **10 min.**

b) Elektroforéza, vyhodnocení

Elektroforéza

Vysvětlete princip, na němž je založena elektroforéza:

Příprava gelu

Gel je nutné připravit před zahájením restrikčního štěpení – musí utuhnout!

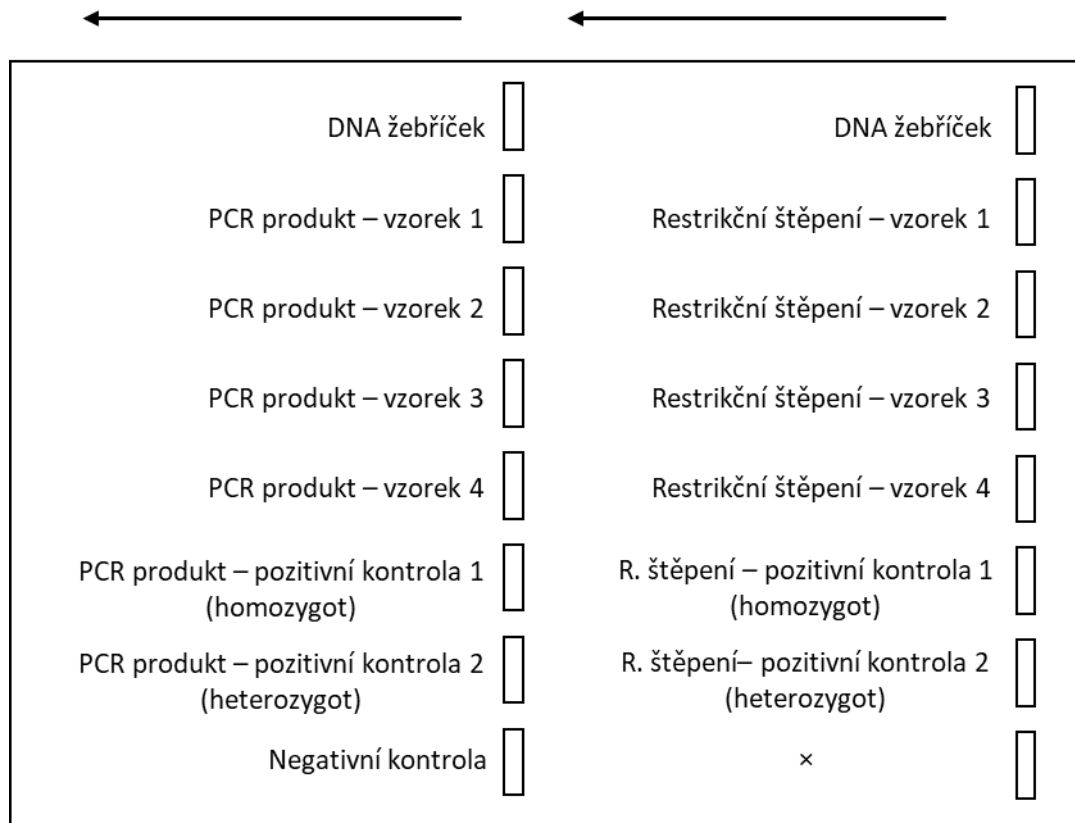
Použijeme 3% agarózový gel v pufru TAE - 1,5 g agarózy rozvaříte v mikrovlnce v 50 ml TAE pufru, po vychlazení asi na 50°C, přidáte 2 μ l roztoku ethidium bromidu (zásobní roztok - 12,5 g/l, *ethidium bromid v gelu* – 0,5 μ g/ml), promícháte a nalijete do předem připravené vaničky (opatřená hřebeny a záslepkami po stranách). Po ztuhnutí gelu odstraníte hřebeny a záslepky, vložíte vaničku do elektroforetické vany s TAE pufrem. Takto je gel připravený k pipetování vzorků

Příprava vzorků

Přidejte po **2 μ L nanášecí barvičky** do zkumavčiček, kde jsou PCR produkty.

Mikrozkumavky, kde proběhlo restrikční štěpení, už nanášecí barvičku obsahují.

Na gel se bude nanášet vždy **10 μ L vzorku**, pořadí podle obrázku. Žebříčku bude stačit nanést jen 5 μ l. V jednom gelu je celkem 16 jamek, ve dvou řadách. Všechny vzorky se vejdou na jeden gel.

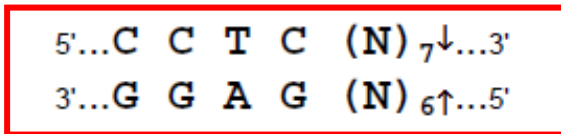


Elektroforézu udržujeme při napětí 85 V cca 45 min (dokud modř nedoputuje do 2/3 gelu). Pak gel prohlédneme pod UV a pořídíme fotografii.

*Sem vložte fotku, překreslete nebo vlepte elektroforeogram.
Popište, jakým velikostem fragmentů odpovídají jednotlivé proužky.*

Vyhodnocení

V úloze použítá restriční endonukleáza Mnl I. rozpoznává toto restriční místo:



V sekvenci amplifikovaného PCR produktu (část sekvence genu kódujícího koagulační faktor V – normální alela, červeně vyznačena pozice, kde se nachází mutace FV Leiden) vyznačte místa, kde se DNA rozštěpí pomocí restriční endonukleázy Mnl I.

```
1  GGAACAACACCATGATCAGAGCAGTTCAACCAGGGGAAACCTATACTTATAAGTGGAACA
61  TCTTAGAGTTTGATGAACCCACAGAAAATGATGCCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACA
121 GTGACGTGGACATCATGAGAGACATCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTGA
181 AGAGCAGATCCCTGGACAGGCCGAGGAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACCTTTTCAG
241 AAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCTAGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTA
```

Kolik štěpných produktů vznikne při restričním štěpení PCR produktu amplifikovaného z normální alely?

V sekvenci amplifikovaného PCR produktu (část sekvence genu kódujícího koagulační faktor V – alela Leiden, červeně vyznačena pozice, kde se nachází mutace FV Leiden) vyznačte místa, kde se DNA rozštěpí pomocí restriční endonukleázy Mnl I.

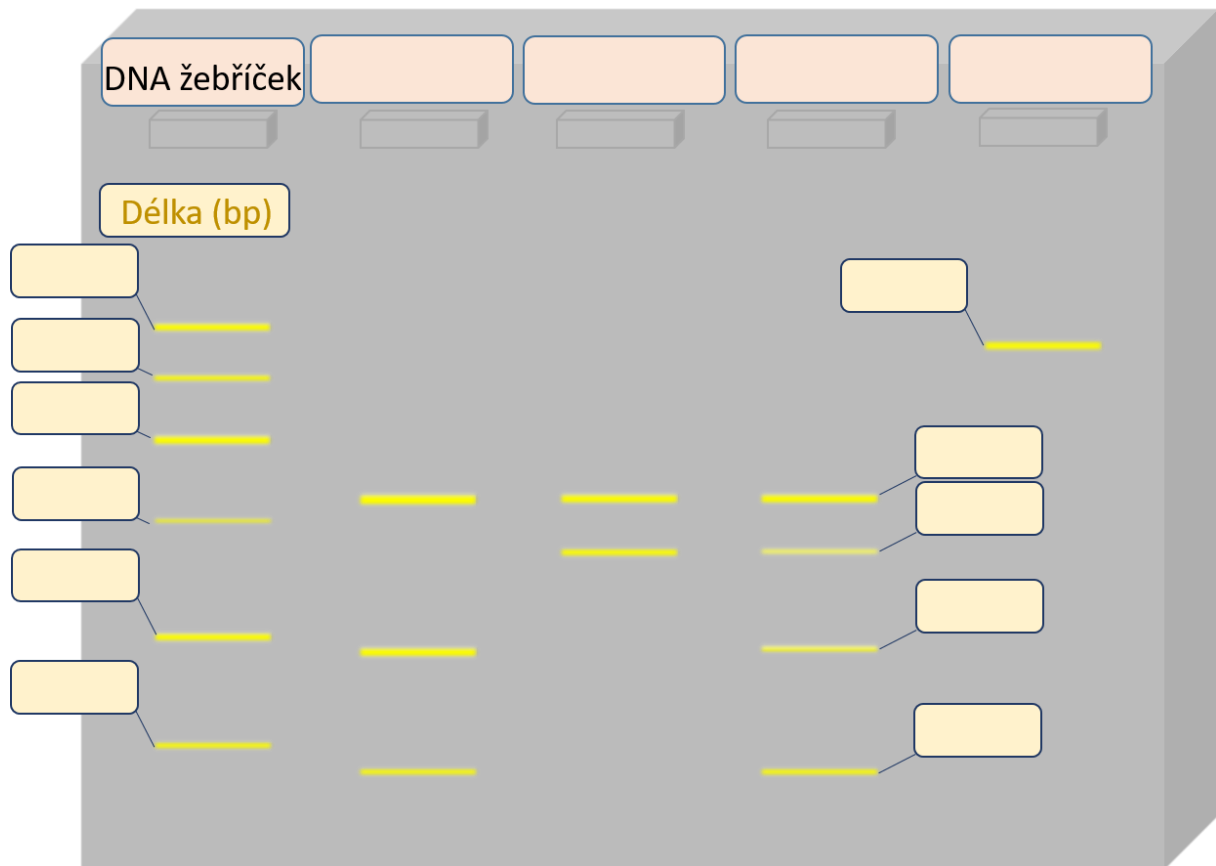
```
1  GGAACAACACCATGATCAGAGCAGTTCAACCAGGGGAAACCTATACTTATAAGTGGAACA
61  TCTTAGAGTTTGATGAACCCACAGAAAATGATGCCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACA
121 GTGACGTGGACATCATGAGAGACATCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTGA
181 AGAGCAGATCCCTGGACAGGCCGAAGAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACCTTTTCAG
241 AAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCTAGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTA
```

Kolik štěpných produktů vznikne při restričním štěpení PCR produktu amplifikovaného alely Leiden?

Doplňte následující tabulku:

délka PCR produktu:	bp
restriční štěpení:	
genotyp	délky vzniklých fragmentů (bp)
homozygot wild type:	
faktor V Leiden heterozygot:	
faktor V Leiden homozygot:	

Stejným postupem, jaký jste prováděli v praktiku, byla provedena elektroforéza vzorků uvedených v předchozí tabulce. Doplňte schéma elektroforeogramu. Do horní řádky doplňte popis jednotlivých drah, tj. ve které dráze byl jaký typ vzorku – štěpený/neštěpený PCR produkt, lze-li poznat, jaký genotyp. Do sloupců doplňte, jaké velikosti fragmentu jednotlivé proužky odpovídají, víte-li, že žebříček představuje hodnoty 50, 100, 150, 200, 250 a 300 bp.



Vyhodnořte a interpretujte výsledky:

Závěr:

Vybrané klinicko-biochemické hodnoty

Obecným výsledkem laboratorního vyšetření je naměřená hodnota, která může být fyziologická, zvýšená či snižená. Abychom zjištěnou hodnotu mohli takto zařadit, je třeba ji porovnat s fyziologickým (referenčním) rozmezím hodnot. Referenční rozmezí získáme měřením referenční (zdravé) populace. Získané hodnoty seřadíme vzestupně a určitý podíl (nejčastěji 2,5 %) krajních nejnižších a nejvyšších hodnot vyřadíme. Nejnižší a nejvyšší hodnotu, která v této řadě zůstane, označujeme jako dolní respektive horní referenční mez. 95 % zdravých lidí v tomto případě spadá do referenčního rozmezí. Existuje tedy ale také 5 % zdravých lidí, jejichž hodnoty nebudou spadat do referenčního rozmezí fyziologických hodnot. Nicméně výrazné odchylky bývají téměř vždy spojené s patologickým stavem. U některých látek jsou patologické stavy spojené s jakýmkoli výraznějším vybočením z fyziologického rozmezí (glukóza). Jiné látky představují riziko pouze tehdy, pokud jejich hladina přesáhne určitou mez nebo pod ni naopak poklesne – u takové látky stačí znát pouze horní respektive spodní referenční hodnotu (cholesterol).

Referenční populace, laboratorní činidla či metodiky měření, se mohou mezi jednotlivými laboratořemi do určité míry lišit. Z tohoto důvodu jsou různými laboratořemi používány poněkud odlišné referenční hodnoty. Následující seznam má za úkol seznámit studenty s nejdůležitějšími referenčními hodnotami, tak jak je v současnosti používá FN Plzeň. Některá referenční rozmezí přihlížejí i například k věku pacienta či k jeho pohlaví. V takových případech jsme se snažili pro potřeby výuky rozmezí zjednodušit, aby poskytovalo alespoň obecnou představu o průměrných hodnotách u zdravých dospělých jedinců.

Stejné metabolity se mohou v různých tělních tekutinách vyskytovat v odlišné koncentraci. Proto je zvykem u metabolitu označit zkratkou i vyšetřovaný materiál. Pro koncentrace některých látek v konkrétní tělní tekutině je zvykem používat speciální název. Například glykémie se týká glukózy v krvi, glykorrhachie v mozkomíšním moku a glykosurie glukózy v moči. Při snížení hladiny glukózy v krvi pod fyziologickou mez pak mluvíme o hypoglykémii, při jejím vzestupu o hyperglykémii.

Např.:

B_{glukóza}: (B= blood) - glukóza v plné krvi

S_{glukóza}: (S= serum) - glukóza v séru

P_{glukóza}: (P= plasma) - glukóza v plazmě

Csf_{glukóza}: (Csf= cerebrospinal fluid) - glukóza v mozkomíšním moku

U_{glukóza}: (U= urine) - glukóza v moči

Referenční hodnoty k zapamatování	
Parametr	Fyziologické rozmezí
ABR (arteriální krev)	
pH	7,36 - 7,44
pCO ₂	4,8 - 5,8 kPa
pO ₂	nad 9,6 kPa
HCO ₃ ⁻	22 - 26 mmol/l
Base Excess (BE)	± 2,5 mmol/l
Anion Gap (AG)	14 - 18 mmol/l
Krev	
Osmolalita	275 - 295 mmol/kg H ₂ O
Na ⁺	136 - 144 mmol/l
K ⁺	3,8 - 5,2 mmol/l
Vápník celkový	2,2 - 2,6 mmol/l
Vápník ionizovaný	1,1 - 1,3 mmol/l
Hořčík	0,7 - 0,9 mmol/l
Chloridy	98 - 109 mmol/l
Fosfor anorganický	0,7 - 1,6 mmol/l
Železo	6 - 35 μmol/l
Laktát	do 2,2 mmol/l
S/P_glukóza	3,6 - 5,6 mmol/l
Glykovaný hemoglobin (HbA1c)	20 - 42 mmol/mol
oGTT interpretace	
Normální glukózová tolerance, vyloučení DM	do 7,8 mmol/l
Porušená glukózová tolerance	7,8 - 11,0 mmol/l
Diabetes mellitus	nad 11,1 mmol/l

Bilirubin celkový	do 25 µmol/l
Bilirubin konjugovaný	do 8 µmol/l
Cholesterol celkový	do 5 mmol/l
Triacylglyceroly	do 1,7 mmol/l
LDL cholesterol	do 3 mmol/l
HDL cholesterol	♂ nad 1 mmol/l ♀ nad 1,2 mmol/l
Močovina	3 - 8 mmol/l
Kyselina močová	♂ 210 - 450 µmol/l ♀ 140 - 360 µmol/l
Kreatinin	♂ 60 - 100 µmol/l ♀ 50 - 90 µmol/l
B_Amoniak	do 50 µmol/l
Alfa-amyláza (AMS)	do 2,0 µkat/l
Aspartátaminotransferáza (AST)	do 0,8 µkat/l
Alaninaminotransferáza (ALT)	do 0,8 µkat/l
Alkalická fosfatáza (ALP)	0,7 - 2,2 µkat/l
Laktátdehydrogenáza (LD)	do 4,0 µkat/l
Gama-glutamyltransferáza (GGT)	♂ do 1,2 µkat/l ♀ do 0,7 µkat/l
C-reaktivní protein (CRP)	do 5 mg/l
Celková bílkovina séra	63 - 80 g/l
Albumin	37 - 52 g/l
Elfo frakce bílkovin séra	
Albumin	0,530 (53%) - 0,650 (65%)
Alfa ₁ globulin	0,020 (2%) - 0,040 (4%)
Alfa ₂ globulin	0,080 (8%) - 0,130 (13%)
Beta globulin	0,090 (9%) - 0,160 (16%)
Gama globulin	0,115 (11,5%) - 0,19 (19%)

Mozkomíšní mok	
Bílkoviny	do 0,5 g/l
Glukóza	2,7 - 4,5 mmol/l
Laktát	1,2 - 2,2 mmol/l
Moč	
Specifická hmotnost	1010 - 1030 g/dm ³
pH	4,5 - 8
Alfa-amyláza (AMS)	do 8,0 μ kat/l
Clearance kreatininu	1,6 - 2,7 ml/s