

**Errata k vydání publikace Praktická cvičení z lékařské chemie a biochemie autorů
M. Kohutiara, Z. Chmátalové, J. Illnera a T. Popelkové**

Strana / řádek	Chyba	Správně
144 – tabulka 12	Cholesterol...3,1-5,2 mmol/l	Cholesterol...3,1-5,0 mmol/l
151 – tabulka 17	rychlé pre- α	rychlé pre- β
157/kap.4.6 – postup	Starý postup titrace aminokyseliny.	Aktuální postup titrace aminokyseliny-viz.příloha 1.
172/8. ř. shora	9 ml roztoku I	9,8 ml roztoku I
172/9. ř. shora	1 ml roztoku II	0,2 ml roztoku II
172/8. ř. zdola	...v poměru 1+2	...v poměru 1+1
175 – tabulka 26 (5.frakce)	β 1-globuliny	β 2-globuliny
181-184	Starý návod na ALT a AST	Aktuální návod-viz.příloha 2.
185 – rovnice výpočtu	$GGT (\mu\text{kat/l}) = \Delta A/t$ $\cdot 23,188$	$GGT (\mu\text{kat/l}) = \Delta A/t$ $\cdot 23,188 \cdot F$
187 – rovnice výpočtu	$ALP (\mu\text{kat/l}) = \Delta A/t$ $\cdot 72,796$	$ALP (\mu\text{kat/l}) = \Delta A/t \cdot 72,796$ $\cdot F$
189 – tabulka 39	S-Albumin...35-53 g/mol	S-Albumin...35-53 g/l
198/3. ř. shora	...při 450násobném zvětšení.	...při 400násobném zvětšení.
201/11. ř. shora	...označené zelenou šipkou...	...označené šipkou...
237 – tabulka 54	osmolalita...mosmol/l	osmolalita...mosmol/kg

PŘÍLOHA 1: POSTUP TITRACE AMINOKYSELINY

1. Do kádinky (100 ml) navažte 0,10-0,12 g neznámé aminokyseliny a toto množství rozpustíte v cca 10-15 ml destilované vody. Roztok nejprve rozmíchejte skleněnou tyčinkou. Poté do kádinky se vzorkem vložte magnetické míchadlo, zapněte míchačku a nechte vzorek jemně promíchávat.
2. Zapněte pH metr dle návodu na vašem pracovním stole a změřte pH dvou standardů o definovaném pH = 4 a 7. V případě, že se vámi naměřené hodnoty pH liší, od deklarovaných hodnot standardů, proveďte kalibraci pH metru dle návodu. V případě, že je pH metr nakalibrován, můžete zahájit pokus.
3. Vložte elektrodu do roztoku neznámé aminokyseliny. Magnetické míchadlo NESMÍ narážet do elektrody!!! Elektroda musí být v roztoku dostatečně ponořena. Pokud hladina vašeho vzorku nesahá k vyznačenému proužku na elektrodě, přidejte ještě malé množství destilované vody.
4. Roztok neznámé aminokyseliny okyselte pomocí 1 M HCl tak, aby výsledné pH roztoku bylo v intervalu pH = 1,7-2. Roztok HCl přidávejte opatrně po malých přídavicích.
5. Okyselený roztok neznámé aminokyseliny titrujte 0,3 M roztokem NaOH za použití automatické byrety dle Schillinga. Hydroxid sodný přidávejte po 0,5 ml. Po každém přídávku hydroxidu vyčkejte na ustálení hodnoty pH na pH metru, zaznamenejte si příslušnou hodnotu pH a teprve poté pokračujte v titraci. V okolí bodu ekvivalence může stabilizace pH trvat i několik minut.
6. Titraci ukončete, pokud se několikerým přídávkem hydroxidu pH měřeného roztoku již nemění (obvykle v okolí pH = 12).
7. Na milimetrový papír vyneste na horizontální osu (x) objem přidaného činidla a na osu vertikální (y) naměřené hodnoty pH. Body spojte do hladké titrační křivky. Křivku vyhodnoťte metodou rovnoběžných tečen a určete hodnotu pI neznámé aminokyseliny. Výsledky vašeho stanovení porovnejte s tabelovanými hodnotami.

PŘÍLOHA 2: STANOVENÍ KATALYTICKÉ AKTIVITY ALT A AST

Alaninaminotransferáza

Alaninaminotransferáza (EC 2.6.1.2, ALT) katalyzuje přenos aminoskupiny mezi L-alaninem a 2-oxoglutarátem. Produktem reakce je pyruvát a L-glutamát. Vzniklý pyruvát je redukován NADH za katalýzy enzymem laktátdehydrogenáza (LDH) na laktát a NAD⁺. Měří se **pokles** absorbance při **340 nm** v důsledku oxidace NADH.

Pracovní postup:

1. Do zkumavky pipetujte **1 ml pracovního roztoku ALT** (směs Tris pufru+L-alaninu+LDH a 2-oxoglutarátu+NADH v poměru 4:1) a inkubujte **přesně 5 minut** ve vodní lázni vyhřáté na **37 °C**.
+ Připravte spektrofotometr na měření – nastavte vlnovou délku, vynulujte přístroj (blank-destilovaná voda).
2. Do zkumavky přidejte **0,1 ml vzorku**.
3. Promíchejte a inkubujte přesně **1 minutu** ve vodní lázni vyhřáté na **37 °C**.
4. **Ihned poté** změřte absorbanci proti blanku a absorbanci odečítejte v 1 minutových intervalech po dobu 3 minut.

Tabulka 55

Čas [min]	Absorbance	ΔA
0		-
1		
2		
3		
průměrná ΔA/min		

Vypočítejte rozdíl mezi následnými absorbancemi a průměrnou změnu absorbance za 1 minutu (ΔA/ min) a podle vzorce (viz.níže) vypočítejte katalytickou koncentraci (μkat/l).

Výpočet: $ALT (\mu\text{kat/l}) = \Delta A/\text{min} \times 29.08 \times F^1$

Katalytická aktivita ALT v analyzovaném vzorku: μkat/l

¹ F je faktor ředění. Určuje, kolikrát byl zředěn vzorek před analýzou.

Aspartátaminotransferáza

Aspartátaminotransferáza (EC 2.6.1.1, AST) katalyzuje přenos aminoskupiny mezi L-aspartátem a 2-oxoglutarátem. Vzniklý oxalacetát je redukován NADH za katalýzy enzymem malátdehydrogenáza (MDH) na L-malát a NAD⁺. Měří se **pokles** absorbance při **340 nm** v důsledku oxidace NADH.

Pracovní postup:

1. Do zkumavky pipetujte **1 ml pracovního roztoku AST** (směs Tris pufru+L-aspartátu+MDH a 2-oxoglutarátu+NADH v poměru 4:1) a inkubujte **přesně 5 minut** ve vodní lázni vyhřáté na **37 °C**.
+ Připravte spektrofotometr na měření – nastavte vlnovou délku, vynulujte přístroj (blank-destilovaná voda).
2. Do zkumavky přidejte **0,1 ml vzorku**.
3. Promíchejte a inkubujte přesně **1 minutu** ve vodní lázni vyhřáté na **37 °C**.
4. **Ihned poté** změřte absorbanci proti blanku a absorbanci odečítejte v 1 minutových intervalech po dobu 3 minut.

Tabulka 56

Čas [min]	Absorbance	ΔA
0		-
1		
2		
3		
průměrná ΔA/min		

Vypočítejte rozdíl mezi následnými absorbancemi a průměrnou změnu absorbance za 1 minutu (ΔA/ min) a podle vzorce (viz.níže) vypočítejte katalytickou koncentraci (μkat/l).

Výpočet: **AST (μkat/l) = ΔA/min x 29.08 x F²**

Katalytická aktivita AST v analyzovaném vzorku: μkat/l

² F je faktor ředění. Určuje, kolikrát byl zředěn vzorek před analýzou.