

	strana
Úvod	8
<u>1. VŠEOBECNÉ POKYNY A ZÁKLADNÍ PRÁCE V BIOCHEMICKÉ LABORATOŘI</u>	9
1.1 <u>Laboratorní řád</u>	9
1.2 <u>Bezpečnost práce v biochemické laboratoři</u>	9
1.3 <u>Přípravné práce v biochemické laboratoři</u>	10
1.3.1 Čistota laboratorních pomůcek	10
1.3.2 Příprava roztoků	10
1.3.3 Odběr vzorků biologického materiálu	11
1.3.4 Technika zpracování pevných vzorků	12
1.3.5 Odběr a zpracování vzorků biologických te- kutin	13
1.3.5.1 Krev, její odběr a prvotní zpracování	13
1.4 <u>Stručná charakteristika základních biochemic- kých laboratorních operací</u>	15
1.4.1 Pokyny pro měření na přístroji Spekol	17
2. <u>BÍLKOVINY</u>	19
2.1 <u>Jednoduché bílkoviny (a aminokyseliny)</u>	19
2.1.1 Kvalitativní reakce bílkovin a důkaz někte- rých aminokyselin	20
2.1.1.1 Biuretová reakce	20
2.1.1.2 Ninhydrinová reakce	20
2.1.1.3 Xanthoproteinová reakce (důkaz tyrosinu a tryptofanu)	21
2.1.1.4 Sakaguchiho reakce (důkaz argininu)	21
2.1.2 Srážecí reakce bílkovin	21
2.1.2.1 Srážení bílkovin ethanolem (acetonem)	22
2.1.2.2 Srážení bílkovin varem	22
2.1.2.3 Srážení bílkovin specifickými činidly (důkaz bílkovin v moči)	23
2.1.3 Metody kvantitativního stanovení bílkovin	23

2.1.3.1	Refraktometrické stanovení celkových bílkovin v krevním séru	24
2.1.3.2	Stanovení koncentrace bílkovin fotometricky biuretovou reakcí	25
2.1.3.3	Další metody používané ke stanovení obsahu bílkovin	26
2.1.4	Metody izolace a dělení směsí bílkovin	27
2.1.4.1	Izolace krystalické bílkoviny ze semen luskovin	27
2.1.4.2	Izolace a rozdělení jednoduchých bílkovin z obilovin	29
2.1.4.3	Dělení směsi vysokomolekulární látky (bílkoviny) a nízkomolekulární látky gelovou chromatografií	30
2.1.4.4	Metody elektroforetického dělení směsí bílkovin	31
2.1.4.4.1	Elektroforéza na papíře	34
2.1.4.4.2	Dělení bílkovin krevního séra elektroforézou na papíře	35
2.1.4.4.3	Další typy elektroforézy	38
2.2	<u>Složené (konjugované) bílkoviny</u>	40
2.2.1	Metody izolace, dělení a stanovení složených bílkovin	40
2.2.1.1	Izolace kaseinu a důkaz jeho složek	40
2.2.1.2	Dělení sérových lipoproteinů elektroforézou na papíře	41
2.2.1.3	Důkaz přítomnosti glycidů v glykoproteinech	43
2.2.1.4	Stanovení obsahu hemoglobinu v krvi	43
2.2.1.5	Stanovení obsahu methemoglobinu v krvi	44
3.	<u>VITAMÍNY</u>	47
3.1	<u>Vitamíny lipofilní</u>	47
3.1.1	Stanovení obsahu vitamínu A (volného a esterifikovaného) v krevním séru	47
3.1.2	Izolace a chromatografické dělení karotenoidů na tenké vrstvě	50
3.2	<u>Vitamíny hydrofilní</u>	52

3.2.1 Stanovení obsahu vitamínu C (kyseliny L-askorbové)	52
4. <u>ENZYMY</u>	55
4.1 <u>Enzymologické metody</u>	55
4.1.1 Metody izolace enzymů z biologického materiálu	56
4.1.2 Metody stanovení aktivity enzymů. Používané jednotky	57
4.1.3 Praktické aplikace sledování aktivity enzymů u živočichů	58
4.2 <u>Rychlost enzymových reakcí (enzymová kinetika)</u>	59
4.2.1 Vliv koncentrace substrátu na reakční rychlost. Určení K_m	59
4.2.1.1 Stanovení K_m enzymu ureázy, izolované ze semen sóje	62
4.2.2 Vliv teploty na reakční rychlost	64
4.2.2.1 Vliv teploty na aktivitu amylázy slin	65
4.3 <u>Systematika enzymů. Metody stanovení vybraných enzymů</u>	66
4.3.1 Oxidoreduktázy	66
4.3.1.1 Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy (LD)	66
4.3.1.2 Stanovení isoenzymů laktátdehydrogenázy	69
4.3.2 Transferázy	70
4.3.2.1 Stanovení aktivity aminotransferáz - aspartát aminotransferázy (AST) a alanin aminotransferázy (ALT)	71
4.3.3 Hydrolázy	74
4.3.3.1 Stanovení aktivity lipázy v duodenální šťávě	74
4.3.3.2 Stanovení aktivity alkalické fosfatázy (ALP)	75
5. <u>SACHARIDY</u>	79
5.1 <u>Metody izolace sacharidů z biologických materiálů</u>	79

5.2	<u>Obecné vlastnosti a reakce cukrů</u>	80
5.2.1	Redukční vlastnosti cukrů	80
5.2.1.1	Zkouška Fehlingova na přítomnost cukru v moči	80
5.2.2	Reakce cukrů s kyselinami	81
5.2.2.1	Reakce Molischova (obecná reakce na cukry nebo látky obsahující cukernou složku)	81
5.2.2.2	Reakce Selivanova (na ketózy)	81
5.2.2.3	Reakce na pentózy	82
5.3	<u>Jednoduché cukry</u>	82
5.3.1	Chromatografické dělení cukrů na tenké vrstvě	82
5.3.2	Kvantitativní stanovení sacharidů	83
5.3.2.1	Fotometrické stanovení obsahu glukózy v biologických tekutinách o-toluidinem	84
5.4	<u>Složené cukry</u>	86
5.4.1	Hydrolýza složených cukrů	86
5.4.2	Reakce polysacharidů s jodem	87
6.	<u>LIPIDY</u>	88
6.1	<u>Metody obecné charakterizace vlastností tuků</u>	88
6.1.1	Emulgace tuků (využití detergentů)	88
6.1.2	Důkaz přítomnosti nenasycených mastných kysel- lin v tucích	89
6.2	<u>Metody biochemického sledování lipidů</u>	90
6.2.1	Stanovení celkových lipidů v krevním séru (orientační metoda)	90
6.2.2	Stanovení celkových lipidů (přesná metoda)	91
6.2.3	Stanovení neesterifikovaných mastných kysel- lin (NEMK)	93
6.2.4	Stanovení cholesterolu v krevním séru	94
7.	<u>NUKLEOVÉ KYSELINY (A JEJICH METABOLITY)</u>	97
7.1	<u>Metody izolace nukleových kyselin z biologic- kých materiálů</u>	97
7.1.1	Izolace nukleových kyselin z živočišných tkání (metoda Schneiderova)	98

7.1.2	Izolace ribonukleových kyselin z kvasnic	98
7.2	<u>Hydrolytické štěpení nukleových kyselin a důka- zy složek</u>	99
7.3	<u>Metody kvantitativního stanovení nukleových kyselin</u>	101
7.3.1	Stanovení DNA a RNA analýzou obsahu fosforu	101
7.4	<u>Kyselina močová jako metabolit purinů</u>	103
7.4.1	Stanovení kyseliny močové enzymaticky	103
8.	<u>LITERATURA</u>	105