

OBSAH

I. Optické metody

(RNDr. V. Komárek, RNDr. H. Novotná, RNDr. V. Pospíšilová, RNDr. J. Továrek)	11
1. Základy optických metod (RNDr. V. Komárek).....	11
1.1. Vlastnosti elektromagnetického záření.....	11
1.1.1. Charakteristiky elektromagnetického záření.....	12
1.1.2. Interakce záření s hmotným prostředím.....	13
1.2. Absorpce záření a jeho zákony.....	15
1.2.1. Základní pojmy a zákonitosti absorpční molekulové spektrofotometrie.....	15
1.2.2. Chyby spojené s měřením absorbance.....	19
1.2.3. Zákon Lambertův-Beerův-Bouguerův.....	20
2. Aplikace spektrofotometrie v UV-VIS oblasti spektra na kvantitativní biochemickou analytiku (principy kalibrace) - RNDr. V. Komárek.....	27
2.1. Výpočet koncentrace látky z molárního absorpčního koeficientu.....	27
2.2. Metoda kalibrační křivky.....	27
2.2.1. Konstrukce kalibrační křivky.....	28
2.3. Metoda jednoho standardu.....	30
2.4. Stanovení za rovnovážných podmínek.....	33
2.4.1. Stanovení substrátů metodou "end point".....	33
2.4.2. Stanovení katalytické koncentrace enzymu metodou konstantního času.....	34
2.5. Kinetické metody.....	35
2.5.1. Stanovení katalytické koncentrace enzymu kinetickým postupem.....	35
2.5.2. Výpočet katalytické aktivity enzymu (katalytické koncentrace).....	38
2.6. Přístrojové vybavení pro měření absorbance u fotometrie a spektrometrie.....	41
2.6.1. Princip jednopaprskového spektrofotometru UV-VIS.....	42
2.6.2. Princip dvouprskového spektrofotometru.....	43
2.6.3. Nová generace spektrofotometrů UV-VIS.....	43
2.7. Základní prvky optických přístrojů.....	45
2.7.1. Zdroje záření.....	45
2.7.2. Prvky sloužící k získání monochromatického záření (disperzní systémy).....	47
2.7.3. Absorpční prostředí fotometru.....	50
2.7.4. Detekce záření.....	51
3. Atomová absorpční spektrofotometrie AAS (RNDr. V. Komárek).....	54
3.1. Princip atomové absorpční spektrofotometrie.....	54
3.1.1. Absorpce záření volnými atomy.....	55
3.2. Přístrojové vybavení.....	55
3.3. Charakteristika základních částí atomového absorpčního spektrofotometru.....	57
3.3.1. Zdroje záření.....	57
3.3.2. Absorpční prostředí.....	57
3.3.3. Monochromátor a detektor.....	59

3.4.	Metodika AAS	59
4.	Fluorescence molekul (RNDr. V. Komárek).....	60
4.1.	Princip vzniku fluorescenčních spekter	61
4.2.	Fotoluminiscenční spektra	62
4.2.1.	Excitační spektrum (aktivační).....	62
4.2.2.	Emisní spektrum - fluorescenční spektrum	62
4.3.	Kvantový výtěžek fluorescence.....	63
4.4.	Závislost intenzity fluorescence na koncentraci fluoreskující látky	63
4.5.	Přístrojové vybavení	65
4.6.	Fluorescenční polarizace	67
5.	Infračervená spektroskopie (RNDr. V. Komárek)	68
6.	Plamenová emisní spektrofotometrie (RNDr. V. Komárek).....	68
6.1.	Princip plamenové fotometrie	69
6.2.	Přístrojové vybavení pro plamenovou fotometrii.....	70
6.2.1.	Zdroj emisního záření	71
6.2.2.	Transport vzorku do plamene.....	72
6.2.3.	Izolace spektrálních čar	72
6.2.4.	Detektory záření, indikační obvod, pomocná optika.....	73
6.3.	Měření intenzity spektrálních čar-stanovení koncentrace	73
6.4.	Interference, rušivé vlivy při plamenové fotometrii a jejich eliminace	74
6.5.	Příklady využití plamenové fotometrie	75
7.	Rozptyl záření (RNDr. V. Komárek)	76
7.1.	Turbidimetrie a nefelometrie	76
7.2.	Reflexní fotometrie	77
8.	Denzitometrie (RNDr. V. Komárek).....	77
9.	Refraktometrie (RNDr. V. Pospíšilová)	78
9.1.	Refraktometrické veličiny	78
9.2.	Měření indexu lomu	80
9.3.	Refraktometry	81
10.	Polarimetrie (RNDr. J. Továrek).....	83
11.	Hmotnostní spektrometrie (RNDr. H. Novotná)	86
11.1.	Měřicí technika	87
12.	Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie (NMR)	87
II.	Chromatografické metody (Ing. V. Doležalová)	89
1.	Rozdělovací chromatografie na papíře	92
1.1.	Pracovní postup při papírové chromatografii	92
1.2.	Chromatografie na papíře za použití jednofázových směsí	100
2.	Sloupcová chromatografie	101
2.1.	Kapalinová chromatografie	101
2.1.1.	Pracovní postup kapalinové chromatografie	103
2.1.2.	Adsorpční kapalinová chromatografie.....	107

2.1.3.	Kapalinová chromatografie na měničích iontů	107
2.1.4.	Gelová kapalinová chromatografie.....	109
2.1.5.	Kapalinová chromatografie rozdělovací.....	112
2.1.6.	Kapalinová chromatografie afinitní.....	112
2.1.7.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	115
2.2.	Plynová chromatografie (GC)	118
2.2.1.	Adsorpční plynová chromatografie	119
2.2.2.	Rozdělovací plynová chromatografie.....	120
2.2.3.	Kombinace plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií	121
3.	Chromatografie na tenkých vrstvách (TLC)	122
3.1.	Pracovní postup tenkovrstevné chromatografie	122
3.2.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie na tenkých vrstvách.....	126
3.3.	Kombinace tenkovrstevné chromatografie s plynovou chromatografií	126
3.4.	Kombinace afinitní chromatografie a gelové filtrace na tenké vrstvě	126
4.	Elektrochromatografie	127
III. Elektrochemické metody (Ing. V. Doležalová, MUDr. T. Parák).....		129
1.	Coulometrie (Ing. V. Doležalová).....	130
2.	Coulometrie titrace (Ing. V. Doležalová).....	131
3.	Polarografické metody (Ing. V. Doležalová)	133
3.1.	Klasická polarografie.....	133
3.1.1.	Polarografické ampérometrické titrace.....	137
3.2.	Derivační polarografie.....	137
3.3.	Pulsní polarografie.....	137
3.4.	Diferenční pulsní polarografie.....	138
3.5.	Diferenční pulsní anodická inverzní voltametrie	139
3.6.	Polarografie na tuhých elektrodách - voltametrie	140
3.6.1.	Clarkova kyslíková elektroda	140
4.	Konduktometrie (Ing. V. Doležalová).....	142
4.1.	Konduktometrické titrace	144
5.	Potenciometrie (MUDr. T. Parák)	145
5.1.	Druhy elektrod.....	145
5.1.1.	Referenční (srovnávací) elektrody.....	145
5.1.2.	Indikační (měrné) elektrody	146
5.2.	Měřicí přístroje	149
5.3.	Teorie pH.....	150
5.4.	Poznámky k měření pH a krevních plynů.....	151
5.5.	Potenciometrické titrace (Ing. V. Doležalová).....	152
IV. Elektroforetické metody (Ing. V. Doležalová).....		155
1.	Elektroforéza na papíře.....	156
1.1.	Kontinuální (plynulá) elektroforéza na papíře	157
2.	Elektroforéza na acetylcelulóзовých foliích	158

3.	Elektroforéza na agarovém a agarózovém gelu	159
3.1.	Elektroforéza bílkovin v moči na foliích s agarózovým gelem v přítomnosti SDS	163
3.2.	Elektroforéza bílkovin na agarózovém gelu při vyšším napětí (Johanson)	163
4.	Elektroforéza na škrobovém gelu	168
5.	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAAG)	168
5.1.	Disková elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v trubičkách	170
5.2.	Elektroforéza na tenké vrstvě polyakrylamidového gelu	171
5.3.	Kapilární elektroforéza na polyakrylamidovém gelu a v kapalném prostředí	172
5.3.1.	Kapilární elektroforéza na polyakrylamidovém gelu	172
5.3.2.	Kapilární elektroforéza v kapalném prostředí	173
5.4.	SDS - elektroforéza na polyakrylamidovém gelu	173
5.4.1.	Kombinace SDS - elektroforézy s elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (dvojměrná technika)	174
6.	Izoelektrická fokusace (IEF)	174
6.1.	Kombinace izoelektrické fokusace s SDS-elektroforézou na polyakrylamidovém gelu	178
6.2.	Afinní elektroforéza	179
7.	Izotachofórzeza	180
V. Imunochemické metody (Ing. V. Doležalová)		185
1.	Reakce antigenu a protilátky (in vitro)	186
2.	Využití imunochemických metod v klinické biochemii	186
A.	Imunoprecipitační reakce v gelovém prostředí	187
I.	Kvalitativní imunochemické metody	188
1.	Dvojitá radiální imunodifúze (Ouchterlony)	188
2.	Imunoelektroforéza - IELFO (Grabar a Williams)	190
3.	Protiměšná imunoelektroforéza	194
4.	Imunofixační elektroforéza - imunofixace (IFE)	195
5.	Imunofluorescenční elektroforéza	197
6.	Imunoselektce	197
7.	Imunoblotting (přenos dělených bílkovin z gelového prostředí na nitrocelulóзовou membránu a imunochemické detekce sledované bílkoviny)	199
II.	Kvantitativní imunochemické metody	203
1.	Jednoduchá radiální imunodifúze dle Manciniové	203
2.	Elektroimunostanovení dle Laurella	206
3.	Elektroimunodifúze za použití dvou gelů	208
4.	Jednoduchá lineární imunodifúze ve zkumavce nebo v kapiláře	208
5.	Dvojměrná imunoelektroforéza podle Clarka a Freemana	209
6.	Dvojměrná imunoelektroforéza dle Krølla	211
B.	Imunoprecipitační reakce v roztoku	212
VI. Izotopové a neizotopové imunochemické metody (Ing. V. Doležalová)		215
A.	Izotopové imunochemické metody	220
1.	Radioimunoanalýza - RIA	220

1.1.	Klasická RIA	221
1.1.1.	Separční techniky pro oddělení volného značeného antigenu Agn ^x od značeného imunokomplexu používané u klasické RIA	222
1.2.	RIA na pevné fázi	223
2.	Imunometrická analýza (IRMA) "sendvičová metoda"	227
3.	Příbuzné radioizotopové metody	227
3.1.	Radioreceptorová analýza (RRA)	227
3.2.	Metoda kompetitivní vazby na proteiny (CPBA)	227
B.	Neizotopové imunochemické metody	228
1.	Enzymoimunoanalýza (EIA)	228
I.	Kompetitivní enzymoimunoanalýza	229
	a) Homogenní enzymoimunoanalýza (EMIT)	229
	b) Heterogenní enzymoimunoanalýza (ELISA)	230
1.	Kompetitivní ELISA se značeným antigenem /Agn ^E klasická metoda	230
2.	Kompetitivní ELISA se značeným antigenem - technika pevné fáze	230
II.	Nekompetitivní enzymoimunoanalýza (sendvičová technika ELISA)	231
2.	Fluoroimunoanalýza (FIA)	237
I.	Kompetitivní FIA	237
II.	Nekompetitivní FIA - sendvičová technika	237
2.1.	Metoda DELFIA - sendvičová technika	238
2.2.	Fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA)	239
VII.	Biospecifické detektory (biospecifické analyzátoři) - Ing. V. Doležalová	241
A.	Biosenzory	241
1.	Enzymové elektrody (enzymové senzory)	241
1.1.	Stanovení močoviny v séru enzymem ureasou	244
1.2.	Stanovení glukosy v krvi	244
1.3.	Přednosti enzymových elektrod	246
2.	Buněčné elektrody	246
3.	Tkáňové elektrody	247
4.	Elektrody afinitní a imunoelektrody	247
4.1.	Afinitní elektrody	247
4.2.	Imunoelektrody (imunosenzory)	247
5.	Biotranzistory	248
6.	Enzymové termistory	249
B.	Analytické enzymové reaktory	249
VIII.	Osmometrie a onkometrie (MUDr. T. Parák)	251
1.	Osmotický tlak	251
1.1.	Měření osmolality	251
1.1.1.	Přímé měření osmotického tlaku	251
1.1.2.	Nepřímé měření osmotického tlaku	252
2.	Onkotický tlak	253

2.1. Měření onkotického tlaku.....	253
IX. Ultracentrifugace (RNDr. J. Továrek).....	257
X. Mikrometody a ultramikrometody (Mudr. T. Parák).....	257
1. Faktory ovlivňující mikroanalýzu	263
XI. Suchá činidla v klinické biochemii (Doc. RNDr. P. Štern, CSc.).....	263
1. Suchá činidla bez nosičů	263
2. Suchá činidla na nosičích	263
2.1. Vláčna impregnovaná suchými činidly	263
2.1.1. Celulózová matrice	263
2.1.2. Matrice ze skleněných vláken	264
2.1.3. Papírová matrice	264
2.2. Použití vícevrstvého filmu.....	264
2.3. Reflexní fotometry.....	265
2.4. Biosenzorová technologie.....	265
XII. Odměrná analýza (Ing. V. Doležalová).....	267
1. Roztoky v odměrné analýze	267
1.1. Příklad výpočtu faktoru odměrného roztoku a jeho přesné koncentrace.....	268
2. Vyjadřování koncentrace roztoků v odměrné analýze	269
3. Technika titrací	270
4. Neutralizační (acidobazické) titrace.....	271
4.1. Odměrné roztoky a základní látky používané v alkalimetrii	273
4.1.1. Stanovení faktoru (standardizace) odměrného roztoku hydroxidu	274
4.2. Odměrné roztoky a základní látky používané v acidimetrii	275
4.2.1. Stanovení faktoru (standardizace) odměrného roztoku HCl	275
5. Srážecí titrace	276
5.1. Argentometrie přímá (Mohrova metoda)	277
5.2. Argentometrie nepřímá (Volhardova metoda)	277
5.3. Odměrné roztoky a základní látky v argentometrii	278
6. Merkurimetrie	279
6.1. Odměrné roztoky a základní látky v merkurimetrii	280
7. Chelatometrie.....	280
7.1. Odměrné roztoky a základní látky v chelatometrii	282
8. Oxidoredukční titrace	282
8.1. Manganometrie	283
8.1.1. Odměrné roztoky a základní látky v manganometrii	284
8.2. Jodometrie.....	285
8.2.1. Jodometrie přímá	285
8.2.2. Jodometrie nepřímá	285
8.2.3. Odměrné roztoky a základní látky v jodometrii.....	285