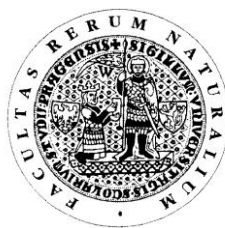


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jana Zimmermannová

STANOVENÍ PROTEINŮ – POROVNÁNÍ RŮZNÝCH
METOD

Protein determination – comparison of various methods

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. srpna 2012

Abstrakt

První část práce je zaměřena na přehled literatury, která se věnuje stanovení proteinů ve vzorcích pro klinicko-biochemické účely. Vzhledem k tomu, že proteiny zejména tvoří látkový základ života, je jejich stanovení důležitou informací o stavu pacienta. Bílkoviny ovšem tvoří rozmanitou škálu sloučenin, proto jejich stanovení přináší různá úskalí.

Druhá část práce je zaměřena na zjištění správné metodiky měření na spektrofotometru NanoVue Plus. Tento spektrofotometr je určen pro měření malých objemů vzorku v řádech několika mikrolitrů. K tomu byly využity roztoky dichromanu draselného a BSA.

Klíčová slova: stanovení bílkovin, spektrofotometrie v UV/VIS oblasti spektra, spektrofotometr NanoVue Plus

Abstract

The first part of the thesis offers an overview of the literature that deals with the determination of proteins in samples used for the purposes of clinical chemistry. Since proteins are the basic building blocks of life, their determination is an important source of information about the condition of a patient. Proteins, however, build a diverse range of compounds and therefore the protein determination procedure has its difficulties.

The second part of the thesis aims to find the correct measurement method for the NanoVue Plus spectrophotometer. This type of spectrophotometer is designed to measure samples of low volumes of just few microlitres. Solutions of potassium dichromate and bovine serum albumin were used in the measurement.

Key words: protein determination, Ultraviolet/Visible (nebo UV/VIS) spectrophotometry, NanoVue Plus spectrophotometer

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc., za odborné vedení, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Děkuji také své rodině za to, že mi umožnili studovat na vysoké škole, a za podporu během celého studia.

Obsah

1	Cíl bakalářské práce.....	8
2	Úvod.....	9
3	Proteiny v klinické biochemii.....	10
3.1	Bílkoviny v séru.....	10
3.1.1	Hypoproteinemie	11
3.1.2	Hyperproteinemie	11
3.1.3	Dyslipoproteinemie	11
3.2	Bílkoviny v moči.....	12
4	Stanovení proteinů v klinické praxi – Nemocnice Český Krumlov, a. s.....	13
5	Stanovení množství bílkovin.....	14
5.1	Úvod do spektrofotometrických metod	15
5.1.1	Absorpční spektra bílkovin.....	16
6	Metody pro stanovení množství bílkovin.....	19
6.1	Přímé spektrofotometrické metody.....	19
6.2	Kolorimetrické metody	19
6.2.1	Biuretová reakce	20
6.2.2	Lowryho metoda.....	21
6.2.3	Metoda s bicinchoninovou kyselinou	22
6.2.4	Metoda Bradfordové.....	23
6.3	Porovnání metod pro stanovení celkového množství bílkovin	24
6.3.1	Časová náročnost testů	24
6.3.2	Interferující látky	24
6.3.3	Citlivost metod	25
7	Spektrofotometry použitelné pro malé objemy vzorků.....	26
7.1	Spektrofotometr NanoVue Plus	27
8	Ověření stupnice absorbance.....	29
9	Experimentální část.....	30
9.1	Materiál a přístroje	30
9.1.1	Použité chemikálie.....	30
9.1.2	Použité laboratorní přístroje	30
9.2	Metody	30

9.2.1	Příprava roztoků	30
9.2.2	Měření roztoků	31
9.3	Zpracování naměřených dat.....	32
10	Výsledky a diskuze.....	33
10.1	Měření správnosti stupnice absorbance na spektrofotometrech Specord M40 a Helios Alpha.....	34
10.2	Měření na spektrofotometru NanoVue Plus - zjištění nejvhodnějšího objemu vzorku pro měření absorbancí.....	35
10.3	Opakované měření absorbance dichromanu draselného na spektrofotometru NanoVue Plus.....	36
10.3.1	Měření s jednou kapkou roztoku se zavřeným víčkem po celou dobu měření	36
10.3.2	Opakované měření absorbance dichromanu draselného s jednou kapkou roztoku s opakovaným otevřením a zavřením víčka	37
10.4	Měření proteinu BSA na spektrofotometru NanoVue Plus a Heliosu Alpha.....	38
11	Závěr.....	39
12	Literatura.....	40
13	Přílohy.....	43

Seznam použitých zkratk

AMK	aminokyselina/y
BCA	bicinchinová kyselina (2,2-bichinolin-4,4-dikarboxylová kyselina)
BSA	hovězí sérový albumin
CB	celkové bílkoviny
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DNA	deoxyribonukleová kyselina
LOD	mez detekce
Phe	fenylalanin
PČ	přední část spektrofotometru
RNA	ribonukleová kyselina
TAG	triacylglyceridy
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
UV	ultrafialová oblast spektra
VIS	viditelná oblast spektra
ZČ	zadní část spektrofotometru
λ_{\max}	absorpční maximum [nm]
λ	vlnová délka [nm]
$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$	specifická absorbance 1% roztoku měřeného v 1cm délce absorbující vrstvy

1 Cíl bakalářské práce

Cílem bakalářské práce bylo:

1. Seznámit se s literaturou, která se zabývá stanovením celkového množství proteinů, zejména s ohledem na klinicko-biochemické aplikace a na spektrofotometrické metody.
2. Ověřit možnosti použití spektrofotometru NanoVue Plus a vyzkoušet různé postupy měření na tomto přístroji.

2 Úvod

Bílkovina neboli protein je lineární polymer aminokyselin (AMK) vázaných peptidovými vazbami [1]. Proteiny se od sebe vzájemně liší v závislosti na druhu, množství a pořadí AMK, které tvoří páteř polypeptidů. Pro život jsou nepostradatelné, protože vytvářejí látkový základ života všech organismů.

Stanovení celkového obsahu bílkovin je často klíčovým krokem pro mnoho aplikací v obecném biochemickém výzkumu, rutinní klinické laboratorní praxi a také v potravinářském průmyslu. V biochemickém výzkumu se využívá zejména přímé spektrofotometrické stanovení, např. při čištění bílkovin. V klinické praxi se používá nepřímé spektrofotometrické stanovení, které se provádí pro diagnostiku zdravotních problémů, jakými jsou např. malnutrice a otoky. V potravinářství se využívají zejména chemické metody a spalovací metody, kterými se po vypočtení obsahu dusíku v potravinách kontroluje obsah bílkovin. Důležitá jsou kritéria pro výběr metody, protože záleží na množství bílkoviny v analyzovaném vzorku, na konformaci bílkoviny a přítomnosti interferujících látek. Každý test má své výhody i nevýhody ve vztahu k citlivosti, proveditelnosti, přesnosti a reprodukovatelnosti [2].

Vzhledem k tomu, že bílkoviny tvoří základní části organismů a podílejí se na prakticky všech procesech uvnitř buňky, je pochopitelné, že stanovení jejich množství je základním úkolem biochemické laboratorní praxe. Ovšem pojmem bílkovina skrývá velké množství chemicky i funkčně rozdílných látek. Z tohoto důvodu nemůže existovat univerzální metoda pro kvantifikaci bílkovin.

Obecným problémem a zdrojem největších chyb u stanovení proteinů je zvolení vhodné srovnávací látky. Ideální standardní látkou by byla taková směs bílkovin, která by se shodovala se složením zkoumaného vzorku. Toto je však v praxi neproveditelné. Proto je vždy volen čistý protein, i když se analyzuje obvykle směs proteinů nebo protein o neznámém AMK složení. Nejčastěji se volí hovězí sérový albumin (BSA), který je široce dostupný ve vysoké čistotě a není finančně tak nákladný. V klinické praxi, kde se pracuje se vzorky obsahující směs bílkovin, se rozdíly v bílkovinné struktuře statisticky vyrovnají, ale v biochemickém výzkumu, kdy např. se kontroluje průběh čištění bílkovin, toto přestává platit. Proto je nutné si uvědomit, že čím je bílkovina čistší, tím více jsou výsledky ovlivněny použitou srovnávací látkou.

3 Proteiny v klinické biochemii

Stanovení celkových bílkovin (CB) v klinické praxi je rutinní záležitostí. Nejčastěji analyzovaný materiál je sérum a moč. Proteiny se také stanovují např. v mozkomíšním moku či plodové vodě, ale u těchto vzorků se spíše zjišťuje jejich specifické zastoupení, než celkové množství.

3.1 Bílkoviny v séru

Krev svým složením a funkcemi představuje životně důležitou tekutinu, která jako pohyblivé médium spojuje všechny orgány a tkáně v těle [3]. Je složena z buněčných elementů (z bílých krvinek, červených krvinek, krevních destiček) v krevní plazmě. Plazma je koloidní kapalná suspenze složená z vody, organických a anorganických látek a z koagulačních faktorů (FI až FXIII – proteiny a FXIV - vápenatý iont) [4]. Při většině klinických stanovení tyto koagulační faktory (především fibrinogen FI) interferují, proto je nutné z plazmy odstranit koagulační faktory. Po odstranění koagulačních faktorů vzniká z plasmy sérum.

V séru je několik typů bílkovin, jejichž funkce jsou různorodé. Více než polovinu celkových bílkovin tvoří albumin, jehož fyziologická hodnota je $35 - 53 \text{ g dm}^{-3}$ a globuliny (α_1 , α_2 , β , γ), jejichž fyziologická hodnota je $62 - 82 \text{ g dm}^{-3}$ [4]. Za fyziologického stavu jsou bílkoviny v séru ve vzájemné rovnováze, přičemž dochází k jejich neustálému obnovování a degradaci. Za patologických stavů dochází k poruše této rovnováhy.

Stanovení celkových bílkovin v séru vede k získání obecné informace o stavu výživy pacienta, dále vede k odhalení příčiny abnormálního zadržování tekutin v těle a v neposlední řadě spolu s dalšími vyšetřeními odhaluje širokou škálu onemocnění a poruch.

3.1.1 Hypoproteinemie

Hypoproteinemie je stav, při kterém je koncentrace CB v séru nižší než 40 g dm^{-3} [4]. Tento stav je doprovázen celou řadou onemocnění. Příčinou hypoproteinemie může být nedostatečný příjem bílkovin dietou, malabsorpčním syndromem, zvýšenou ztrátou bílkovin močí (nefrotický syndrom), kůží (popáleniny) či nadměrnou ztrátou proteinů trávicím traktem (Crohnova choroba) [5].

3.1.2 Hyperproteinemie

Za patologických stavů dochází k zvýšení pouze jedné bílkoviny. Často se jedná o gamaglobuliny – polyklonální (infekce) nebo monoklonální (nádory). Diagnostikuje se při podezření na plasmocytom, který je v současnosti jedním z nejčastějších zhoubných hematologických onemocnění [6]. Hyperproteinemie se může objevit také při dehydrataci, kdy se jedná o zvýšení koncentrace albuminu (nedostatečný příjem tekutin, těžká zvracení a průjmy).

3.1.3 Dyslipoproteinemie

Dyslipoproteinémie je definována jako skupina onemocnění masového výskytu, která je charakterizována patologicky zvýšenou nebo patologicky sníženou hladinou jedné nebo více složek plazmatického lipidového spektra [7]. Ve většině případů se jedná o hyperlipoproteinemii, při níž je zvýšená koncentrace cholesterolu a triacylglycerolů (TAG). Právě vysoká koncentrace TAG v séru způsobuje během analýzy vzorku falešné zvýšení koncentrace CB. Z tohoto důvodu je vhodné před vlastním stanovením CB provést delipidaci séra.

3.2 Bílkoviny v moči

Moč je jedním z ideálních biologických vzorků pro detekci biomarkerů pro lidská onemocnění, protože je k dispozici téměř u všech pacientů [8]. Za fyziologických podmínek nepřekračuje celková proteinurie 150 mg/24 h [9]. Za normálních okolností se do definitivní moči dostává jen malé množství bílkovin (převážně albumin), které prošly membránou glomerulu a nebyly zcela katabolizovány a resorbovány v tubulárním úseku nefronu [10]. Patologická renální proteinurie se nejčastěji objevuje, jsou-li poškozeny glomeruly nebo tubuly ledvin.

Vyšetření močových bílkovin má nezastupitelné místo jak v časné diagnostice nemocí ledvin, tak v odpovědi na léčbu a v odhadu rizika vývoje selhání ledvin [11]. Moč má oproti séru nízkou koncentraci proteinů, vysokou hladinu solí a co je důležitější, má vysokou míru odchylek, jak intra-individuální (kvantitativní kolísání reakce u téhož jedince v různých časových intervalech), tak inter-individuální variability (kvantitativní kolísání reakce u více jedinců ve stejném časovém intervalu) [9].

4 Stanovení proteinů v klinické praxi – Nemocnice Český Krumlov, a. s.

Stanovení CB v séru či moči patří k základnímu klinicko-biochemickému vyšetření, které provádí všechny nemocniční laboratoře. Pro praktickou ukázkou jsem zvolila laboratoř klinické biochemie a hematologie Nemocnice Český Krumlov, kdy jsem vycházela z konzultace s paní Ing. H. Peterkovou a z laboratorní příručky [12].

Pro vyšetření CB v séru je odebráno pacientovi 4 - 5 ml krve (tento objem stačí pro analýzu zhruba 22 komponent). Odběr, transport a uchování krve se řídí striktními pravidly, aby nedocházelo např. k venostázi (zástava žilní krve) nebo k hemolýze (rozpad plazmatické membrány krvinek, vylití obsahu erytrocytů do séra). Maximální doba uchování krve je 8 hodin při teplotě 20 - 25 °C, 2 dny při teplotě 4 - 8 °C nebo 1 rok při teplotě -20 °C. Využívanou metodou v nemocniční laboratoři je biuretová reakce. Kompatibilními antikoagulanty jsou lithná a sodná sůl heparinu. Toto vyšetření se provádí i v režimu statim (časový interval od převzetí biologického materiálu do uvolnění výsledku je 60 minut). Počet stanovení CB za rok 2011 byl: v séru 928, v séru statim - 446.

Stanovení CB v moči se provádí z ranní moče. Doporučené množství odebíraného vzorku je cca 10 ml (u dětí cca 5 ml). Pro stanovení CB se používá reakce s pyrogalovou červení (jedná se o optickou metodu, která je založena na posunu absorpčního maxima ze 400 nm na 600 nm [13], princip metody je obdobný jako u měření s barvivem Coomassie Brilliant Blue, viz kap. 6.2.4). Maximální doba uchování je 2 dny při teplotě 20 - 25 °C nebo 1 rok při teplotě -20 °C. Počet stanovení CB za rok 2011 byl: 7, v režimu statim - 47.

5 Stanovení množství bílkovin

Metod pro stanovení množství bílkovin existuje celá řada, může se jednat o metody optické, chemické, instrumentální nebo o metody, které jsou pouze orientační.

K optickým metodám patří spektrofotometrické metody (přímé a nepřímé) a zákalové metody (turbidimetrie a nefelometrie), které předpokládají tvorbu homogenních sraženin proteinů, jež rozptylují dopadající světlo. Srážení proteinů se provádí sulfosalicylovou nebo trichloroctovou kyselinou.

Mezi chemické metody se řadí Kjeldahlova metoda (bílkovina se mineralizuje s koncentrovanou kyselinou sírovou, dusík přítomný v amidových funkčních skupinách se převede na amoniak, který je vázaný ve formě síranu, alkalizací se amoniak ze síranu uvolní a stanoví se titračně). Přepočítání koncentrace dusíku ve vzorku na obsah bílkovin se provádí pomocí přepočítávacího faktoru, který se odvíjí od AMK složení vzorku. Obecně se předpokládá 16% obsah dusíku ve vzorku (potravinách), tudíž empirický přepočítávací faktor je 6,25 (100/16). Další využitelná chemická metoda je spalovací Dumasova metoda (vzorek je spalován za přítomnosti kyslíku v komoře při vysoké teplotě za uvolnění oxidu uhličitého, vody a oxidů dusíku, vzniklé plyny jsou hnány přes sorpční kolony, které pohlcují oxid uhličitý a vodu a oxidy dusíku jsou katalyticky redukovány na dusík, jenž je následně detekován). Stejně jako u Kjeldahlovi metody se přepočítání obsahu dusíku na koncentraci bílkovin provádí pomocí převodních faktorů.

Pro orientační detekci proteinů slouží tzv. detekční papírky. Jsou vhodné v terénních nebo ambulantních podmínkách, ne však v laboratoři. Tyto papírky využívají tzv. bílkovinné chyby indikátoru. Jsou napuštěny indikátorem a pufrem, který udržuje konstantní pH v rozmezí 3,0 – 3,5. Indikátor (nejčastěji tetrabromfenolová modř) je v kyselé oblasti pH (< 3,5) bez přítomnosti bílkoviny žlutý, v přítomnosti bílkoviny (albuminu) se indikátor chová jako disociovaný, takže změní barvu (na zelenomodrou) podle koncentrace bílkoviny v roztoku, nikoliv podle pH [14].

5.1 Úvod do spektrofotometrických metod

Pro stanovení bílkovin se nejvíce využívá spektrofotometrických metod. Často bývají využívány jako koncové metody stanovení CB po předchozí separační metodě. Podstatou spektrometrických metod je sledování interakce elektromagnetického záření se zkoumanou látkou s cílem využít pozorovaných jevů pro důkaz látky, studium její struktury nebo stanovení její koncentrace. Interakce mohou být dvojího typu, může se jednat buď o absorpci, nebo emisi. Teorie k této tématice se dá najít v mnoha knihách a skriptech, já jsem vycházela z knih Kodíčka a Karpenka [16], Tonyho Qwena [17] a skript Němcové, Čermákové a Rychlovského [18].

Ultrafialové a viditelné záření tvoří jen malou část elektromagnetického spektra. Nachází se v rozsahu 100 – 750 nm. K absorpci v UV/VIS oblasti spektra dochází, když elektrony přecházejí z nižší energetické hladiny do vyšší. To se děje za předpokladu, že má molekula dostatečnou energii. Dochází tedy k excitaci molekuly ze základního (E) do excitovaného (E^*) stavu. Energii (ϵ), kterou je molekula schopna absorbovat, odpovídá právě rozdílu energií molekuly mezi těmito stavy:

$$\epsilon = E^* - E = h \nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

Kde h je Planckova konstanta, ν je frekvence absorbovaného záření, c je rychlost světla a λ je vlnová délka absorbovaného záření. Elektronové přechody jsou provázené přechody mezi vibračními a rotačními hladinami. Celková energie (E) je tedy rovna součtu elektronové (E_e), vibrační (E_v) a rotační energie (E_r):

$$E = E_e + E_v + E_r \quad (2)$$

$$E_e > E_v > E_r \quad (3)$$

Proto jsou elektronová spektra tvořena pásy, které se skládají z jednotlivých příspěvků elektronových, vibračních a rotačních přechodů.

5.1.1 Absorpční spektra bílkovin

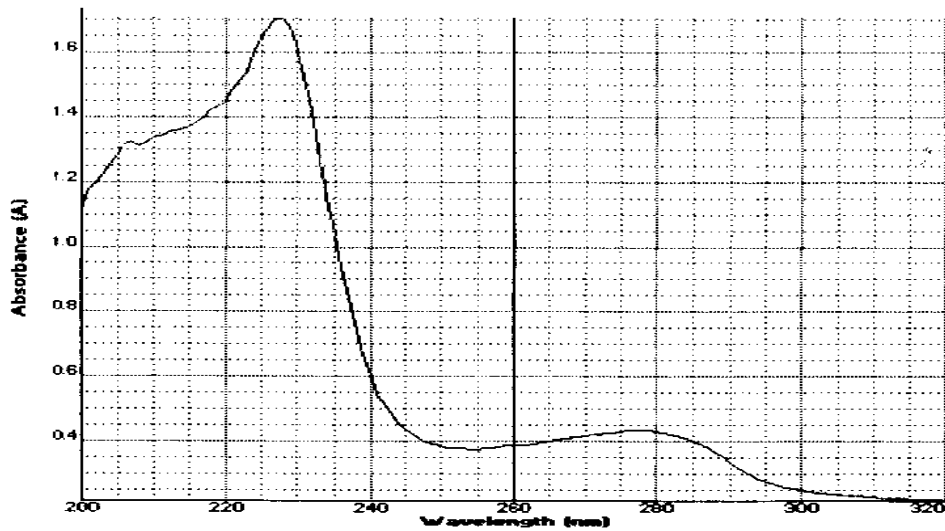
Jak již bylo uvedeno, podstatou absorpce záření v UV-VIS oblasti jsou elektronové přechody. Elektronových přechodů je několik typů, které lze rozdělit podle energií. Jedná se o přechod $\sigma - \sigma^*$, který má nejvyšší energii. Tento přechod není významný, neboť se nachází vakuové UV oblasti spektra (< 180 nm), ve které se příliš neměří, protože se zde absorbuje kyslík spolu s dalšími složkami vzduchu. Dalšími přechody jsou $n - \sigma^*$ a $n - \pi^*$, které vyskytují se u molekul obsahující heteroatom (dusík, kyslík, síra). Pokud je těchto heteroatomů ve sloučenině více, tak se absorpční maximum (λ_{\max}) posunuje k vyšším hodnotám vlnových délek, např.: CH_3I ($\lambda_{\max} = 259$ nm), CH_2I_2 ($\lambda_{\max} = 292$ nm). Ale nejvýznamnějším přechodem pro UV/VIS oblast spektra je přechod $\pi - \pi^*$. Nachází se u nenasycených sloučenin. Čím více je násobných vazeb v molekule, tím více se λ_{\max} posunuje k vyšším hodnotám vlnových délek, např.: $-\text{C}=\text{C}-$ ($\lambda_{\max} = 170$ nm), $-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$ ($\lambda_{\max} = 220$ nm), $-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$ ($\lambda_{\max} = 260$ nm).

I když se přechody týkají celých molekul, tak samotné přechody způsobují atomy nebo skupiny atomů tvořící tzv. chromofory. V bílkovinách se jedná především o peptidové vazby a aromatické postranní řetězce aminokyselin. Peptidové vazby mají absorpční maximum při 192 nm, ale jejich měření se provádí při 205 nm – 220 nm, kde již neabsorbují kyslík a jiné složky vzduchu. U fenylalaninu je nejintenzivnější pík při 188 nm. U tryptofanu je několik absorpčních maxim, nejvýznamnější jsou při 280 a 286 nm. Poloha maxima u tyrosinu závisí na tom, jestli je, nebo není disociovaná hydroxylová skupina. Maxima nedisociovaného tyrosinu leží při 193, 222 a 275 nm. Při disociaci hydroxylové skupiny se maxima tyrosinu posouvají k vyšším vlnovým délkám, a to ke 200, 240 a 293 nm. V UV oblasti spektra absorbují i jiné aminokyseliny (viz tab. 1, str. 16), ale jejich absorbance jsou v porovnání s tyrosinem (Tyr), tryptofanem (Trp), fenylalaninem (Phe) a peptidovou vazbou zanedbatelné.

Tab. 1: Absorpční maxima jednotlivých aminokyselinových zbytků s přibližnými hodnotami molárních extinkčních koeficientů a jednotlivými typy přechodů [16, upraveno]

AMK	Chromofor	Vlnová délka λ_{\max}	Absorpční koeficient [$\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{dm}^3$]	Typ přechodu
Fenylalanin	Fenyl	188	63 100	$\pi \rightarrow \pi^*$
		206	7 950	
		261	250	
Tyrosin	Fenol	193	50 100	$\pi \rightarrow \pi^*$
		222	7 900	
		275	1 260	
Tryptofan	Indol	195	20 000	$\pi \rightarrow \pi^*$
		220	31 600	
		280	5 000	
		286	2 000	
Histidin	Imidazol	211	6 300	$\pi \rightarrow \pi^*$
Cystein	S-H	195	2 000	$n \rightarrow \sigma^*$
Methionin	Sulfid	205	2 000	$n \rightarrow \sigma^*$
Asp, Glu, C-konec	-COOH	205	40	$n \rightarrow \pi^*$
Asn, Gln, Peptid. vazba	-CO-NH	188	7950	$\pi \rightarrow \pi^*$
		225	400	$n \rightarrow \pi^*$
Lys, Arg, N-konec	-NH	173	2500	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
		213	630	$n \rightarrow \sigma^*$

Absorpční spektra volných aminokyselin se od spekter bílkovin nepatrně liší. Tato odlišnost je dána především interakcí proteinu s rozpouštědlem, která se projeví změnou intenzity či šířky absorpčních pásů nebo se může projevit změnou jejich poloh. K posunu vlnové délky absorpčního signálu přispívá snížení či zvýšení polarizace v okolí chromoforu. Snížení polarizace způsobí posun absorpčního spektra k větším vlnovým délkám. Tehdy se jedná o bathochromní neboli červený posun. Toto se děje při ukrytí chromoforu do vnitřní struktury proteinu. O opačném směru posunu absorpčního spektra, tedy k nižším vlnovým délkám, mluvíme tehdy, pokud dochází ke zvyšování polarizace v okolí chromoforu. Pak se jedná o hypsochromní neboli modrý posun, kdy se proteiny rozvíjejí, čímž se odkrývají chromofory.



Obr. 1: Spektrum bílkoviny BSA ve fyziologickém roztoku změřené na spektrofotometru NanoVue Plus. (osa x absorbance, osa y vlnová délka [nm])

6 Metody pro stanovení množství bílkovin

6.1 Přímé spektrofotometrické metody

Přímá spektrofotometrická stanovení CB lze provádět díky přítomnosti chromoforů v molekulách proteinů. Přímé měření absorbance bílkovin pro jejich kvantifikaci se provádí buď při 280 nm, nebo při 205 nm.

Při 205 nm se především měří čisté bílkoviny, protože přítomnost ostatních absorbujících příměsí negativně ovlivňuje při této vlnové délce výsledky měření. Chromoforem je peptidová vazba.

Bílkoviny mohou být také stanoveny při 280 nm v důsledku absorpce tyrosinu, tryptofan a fenylalaninu. Ovšem přítomnost nukleových kyselin významně ovlivňuje výsledky měření silnou absorpencí nukleotidů při 260 nm. Tento vliv může být kompenzován měřením jak při 280 nm, tak zároveň i při 260 nm s následným uplatněním rovnice podle Christiana a Warburga:

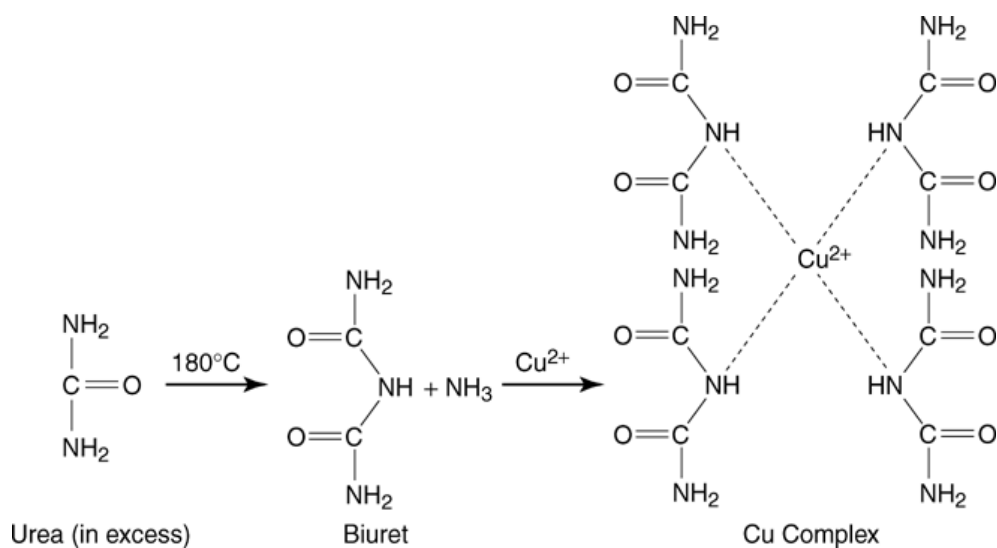
$$c [\text{mg cm}^{-3}] = (1.55 A_{280}) - (0.76 A_{260}) \quad (4)$$

6.2 Kolorimetrické metody

Kolorimetrické stanovení, na rozdíl od přímého spektrofotometrického stanovení, je možné použít při měření směsí proteinů o neznámém složení. Výběr vhodné metody pro daný vzorek se řídí několika kritérii - ekonomickou náročností, citlivostí, náročností na množství vzorku, interferujícími příměsemi a v neposlední řadě se výběr řídí složením proteinu.

6.2.1 Biuretová reakce

Peptidy obsahující tři nebo více aminokyselin tvoří v alkalickém prostředí s měďnatými ionty chelátové komplexy modrofialového zbarvení, které se měří při 540 nm. Jednotlivé aminokyseliny a dipeptidy neposkytují tuto reakci, ale tripeptidy a větší polypeptidy tuto schopnost mají. Jeden měďnatý ion tvoří barevný koordinační komplex se čtyřmi až šesti peptidovými vazbami. Základními složkami reagensie jsou octan měďnatý (zdroj Cu^{2+}), jodid draselný (zabraňuje autooxidaci $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$), hydroxid sodný (pro alkalické prostředí), vinan sodný (pro stabilizaci činidla a snížení tvorby zákalu) [19] a detergent (pro lepší rozpustnost proteinů). Intenzita vzniklého zbarvení je přímo úměrná počtu peptidových vazeb, které se účastní reakce. Biuretová reakce je referenční metodou pro stanovení množství bílkovin v séru. Její hlavní výhodou je, že je lineární v širokém rozsahu koncentrace bílkovin [2], tudíž je vhodná pro vzorky s vyšším obsahem bílkovin.

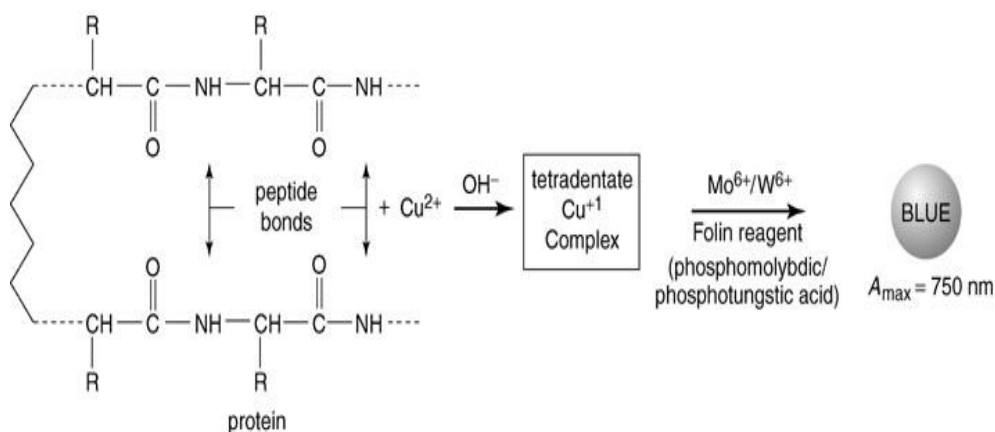


Obr. 2: Reakční schéma Biuretovy metody [20]

6.2.2 Lowryho metoda

V roce 1951 publikovali Lowry a jeho kolegové kolorimetrickou metodu pro stanovení celkových bílkovin s Folin-Ciocalteuovovým činidlem [21]. Tato metoda se skládá ze dvou kroků. Prvním krokem je biuretová reakce, kdy vzniká fialovomodrý komplex. Při druhém kroku dochází k redukci fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny, které jsou obsaženy v Folin-Ciocalteuovu činidlu [21]. Vzniklý komplex má modré zabarvení, jehož maximální absorbance se měří při 750 nm. Intenzita barvy závisí na množství Tyr a Trp. Tato metoda je velmi citlivá na pH reakční směsi, které by mělo být v rozsahu 10 – 10,5. Původně bylo zapotřebí pět roztoků reagensů k provedení této reakce (A 2% Na_2CO_3 v 0,1 mol dm^{-3} , B 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v 1% vinanu sodném, C alkalický roztok mědi, D 0,5% CuCO_3 a reagensie E obsahovala Folin-Ciocalteuovové činidlo). V dnešní době se především využívá modifikace této metody, kterou zavedla firma Pierce, kdy původní reagensie A-D sloučila do jednoho roztoku.

Výhodou této metody je to, že je citlivější než samotná biuretová reakce. Nevýhodou je, že stanovení CB ruší řada sloučenin [22]. Tyto látky je nutno před měřením odstranit, např. vysrážením proteinů a následnou centrifugací.

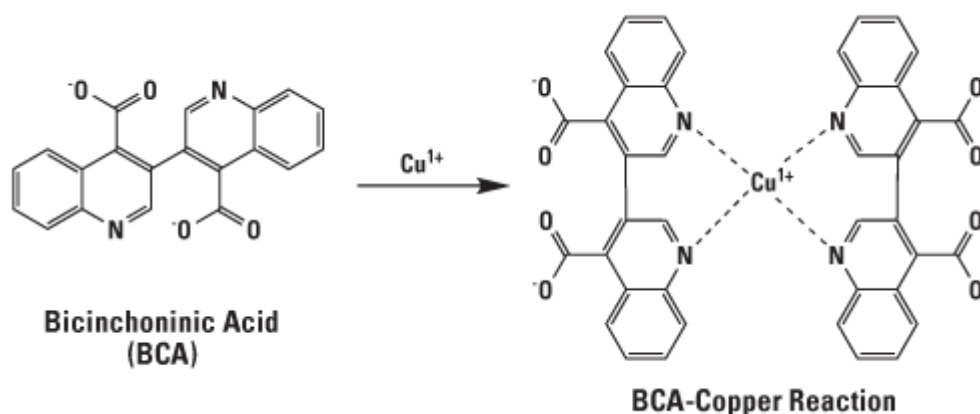


Obr. 3: Reakční schéma Lowryho metody [20]

6.2.3 Metoda s bicinchinovou kyselinou

V roce 1985 představil Paul K. Smith metodu pro stanovení bílkovin s bicinchinovou kyselinou (BCA; 2,2-bichinolin-4,4-dikarboxylová kyselina) [23]. Reakce je založena na redukci měďnatého iontu na měďný iont proteinem (resp. peptidovou vazbou) a na následné chelataci měďného iontu sodnou solí BCA za vzniku barevného komplexu [23]. Reakce probíhá v alkalickém prostředí. Redukce měďnatého iontu je způsobena cysteinem (Cys), Trp, Tyr a peptidovými vazbami [25]. Fialová barva komplexu má absorpční maximum při 562 nm [23]. Ale může se měřit při vlnové délce mezi 550-570 nm s minimální (méně než 10%) ztrátou signálu [22]. První reagensie obsahuje uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, kyselinu bicinchinovou, vinan sodný v 0,1 mol dm⁻³ roztoku hydroxidu sodného a druhá reagensie obsahuje 4% sulfát měďnatý.

Nespornými výhodami této metody jsou vysoká citlivost, odolnost vůči detergentům, vysoká stabilita činidel a barevného komplexu při laboratorní teplotě [22]. Některé látky (např. merkaptoethanol) vyvolávají silnou absorbanci při 562 nm v kombinaci s BCA, naopak např. sulfát amonný snižuje absorbanci komplexu [26]. Oba typy interferencí je možné eliminovat selektivním srážení bílkovin trichloroctovou kyselinou před reakcí s CBA [26].

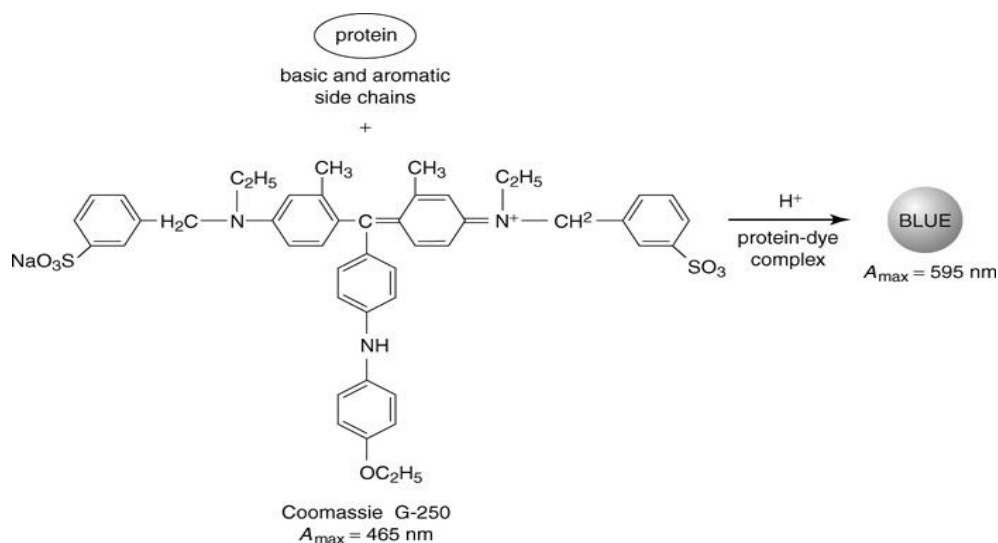


Obr. 4: Reakční schéma metody BCA [27]

6.2.4 Metoda Bradfordové

Metoda Bradfordové je založena na vazbě barviva Coomassie brilliant blue G-250 (CBB) na protein, kdy dochází k posunu absorpčního maxima barviva ze 465 na 595 nm [28] a tím dochází i ke změně barvy roztoku z hnědé na intenzivně modrou. Vzrůst absorbance při 595 nm může být použit jako měřítko koncentrace bílkovin. Na vazbě se podílejí hydrofobní a iontové interakce. Vazba je podmíněna přítomností aromatických AK. Reagencie pro toto stanovení obsahuje barvivo CBB, metanol a kyselinu fosforečnou.

Výhodou této metody je, že posun absorpčního maxima trvá velmi krátkou dobu (2 - 5 minut) a vybarvení je stabilní nejméně hodinu [28]. Test je jednoduchý, rychlý a snadno zautomatizovatelný [29]. Absorbanci můžou zvyšovat detergenty [28].



Obr. 5: Reakční schéma metody podle Bradfordové [20]

6.3 Porovnání metod pro stanovení celkového množství bílkovin

Celkové množství bílkovin se nestanovuje pouze v tělních tekutinách, biologických vzorcích, ale také se stanovuje v potravinách nebo v krmivech. Ve zdravotnictví a v biologických vzorcích převažují optické metody a orientační testy (indikátorové papírky), v potravinářství a u krmiv převažují chemické metody.

6.3.1 Časová náročnost testů

Časová náročnost testů pro kvantifikaci CB se poměrně odlišuje. Nejméně náročná na čas jsou přímá spektrofotometrická stanovení (měření při 205 nm a 280 nm), protože se nevyužívají žádná činidla, a proto nejsou nutné inkubační časy. Také u indikátorových papírků a u metody dle Dumase známe výsledek analýzy do několika minut. Naopak nejdelší provedení má z optických metod Lowryho metoda (inkubace 50 min) a metoda s BCA kyselinou (inkubace 30 min), z chemických metod je to Kjeldahlova metoda, kdy analýza trvá nejméně hodinu.

6.3.2 Interferující látky

U spektrofotometrických metod ruší analýzu široké spektrum látek, jako např.: detergenty, tris a ethanol (metoda Bradfordové, Lowryho), redukující látky (metoda Lowryho a BCA) a TAG (biuretová reakce, Lowryho metoda). Tyto interferující látky mohou být odstraněny vysrážením bílkoviny pomocí kyseliny trichloroctové (500 g dm^{-3}) s následným rozpuštěním vzniklé sraženiny v malém množství hydroxidu sodného ($0,5 \text{ mol dm}^{-3}$) [30] nebo gelovou filtrací či dialýzou [22]. U přímé spektrofotometrie (280 nm) měření ruší nukleové kyseliny ($\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$), které poskytují téměř o řád vyšší absorbanci než bílkoviny [31]. Jejich interference se eliminuje měřením při dvou vlnových délkách s následnou početní korekcí, tedy volí se stanovení CB dle Christiana a Warburga. U zákalových metod především vadí vlastní zákal séra, vysoký obsah TAG a látky, které jsou nerozpustné v kyselinách, jako např. nukleové kyseliny. U Kjeldahlovy metody při analýze roztoků, které obsahují nerozložitelné dusíkaté látky kyselinou sírovou, dochází k získávání falešně nižších výsledků. Jedná se např. nikotin, piperidin, chinolin, isochinolin, pyrazol [32]. Interferujícími látkami jsou dusitany a dusičnany [32]. Detekční papírky mají tu nevýhodu, že nereagují se všemi bílkovinami stejně, indikátor reaguje především s albuminem.

6.3.3 Citlivost metod

Citlivost u spektrofotometrických stanovení závisí na použité metodě. Z výsledků studie [33] vyplývá, že metoda Bradfordové má největší citlivost ($\text{LOD} = 0,006 \text{ mg cm}^{-3}$) pro čisté bílkoviny a i pro komplexní směsi bílkovin. Na druhou stranu nejméně citlivá metoda pro detekci čistého BSA a směsi bílkovin je biuretová reakce ($\text{LOD} = 0,391 \text{ mg cm}^{-3}$). Relativní necitlivost biuretové techniky umožňuje analýzu vzorků s vysokým obsahem bílkovin (až do $5,0 \text{ g dm}^{-3}$) bez ředění [34]. Zatímco metody BCA, Bradford a Lowry jsou vhodné pro vzorky s nízkou koncentrací bílkovin v $1 - 2000 \text{ g cm}^{-3}$ [22]. U zákalových metod je mez stanovitelnosti $0,1 - 3,5 \text{ g dm}^{-3}$ při srážení kyselinou sulfosalicylovou nebo trichloroctovou [35]. Dumasova metoda je srovnatelná s metodou dle Kjeldahla, kdy rozsah minimální meze je $0,001\% - 0,005\% \text{ N}$ (vztaženo na sušinu) [36]. Detekční papírky slouží pouze k orientačnímu průkazu bílkovin ve vzorku. Indikují přítomnost albuminu v rozmezí koncentrace $0,1 - 0,5 \text{ g dm}^{-3}$ [11]. Ale vzhledem k tomu, že vyhodnocování tohoto testu závisí přímo na lidském faktoru, bývají často výsledky nadhodnocovány.

7 Spektrofotometry použitelné pro malé objemy vzorků

Spektrofotometry mají nezastupitelné místo jak v laboratorních praxích, tak i v biochemickém a analytickém výzkumu. V posledních dvaceti letech byly konstruovány nové typy detektorů, tzv. více kanálové detektory CCD. Tato inovace mimo jiné umožnila eliminaci kyvet při měření vzorků, kdy měření probíhá na hydrofobní destičce a potřebný objem studovaného materiálu se pohybuje v řádech několika mikrolitrů. Spektrofotometry uzpůsobené k měření takto malých objemů vzorků se v posledních pár letech velice rozšířily, jak ukazuje tabulka 2.

Tab. 2: Přehled spektrofotometrů použitelných pro malé objemy vzorků

Název přístroje	Výrobce	Minimální objem vzorku [μ l]	Rozsah vlnových délek [nm]
NanoVue Plus	GE Healthcare	2	200 - 1100
Epoch	BioTek	2	200 - 999
Pico100 Picodrop	Buldog Bio	2	230 - 850
The Infinite 200 PRO NanoQuant	Tecan	2	230 - 1000
Nanodrop 8000	Thermo Scientific	1	220 - 750
Biospec-nano	Schimazdu	1	220 - 800
NanoQ	CapitalBio	0,7	200 - 400
Genova Nano	Jenway	0,5	198 – 1000
ScanDrop	Analytik Jena	0,3	190 – 720
NanoPhotometer	Implen	0,3	190 – 1100

Tyto spektrofotometry mají převážně všechny přednastavené programy pro měření DNA, proteinů, enzymové kinetiky a zároveň jsou i skenujícími přístroji.

7.1 Spektrofotometr NanoVue Plus

Spektrofotometr NanoVue Plus (obr. 6) [37] se řadí mezi spektrofotometry, které pracují s velmi malými objemy vzorků. Princip měření a další informace o jeho instrumentaci není dohledatelný v ověřené odborné literatuře kvůli patentu, dostupné jsou pouze propagační materiály a uživatelský návod.

Při měření tímto spektrofotometrem se vzorky pipetují na zlatou hydrofobní destičku. Pipetované objemy by měly být v rozsahu 2 – 5 μ l. Díky velmi krátké délce absorbující vrstvy (0,2 mm nebo 0,5 mm) je možné měřit menší množství velmi koncentrovaných nebo vysoce absorbujících vzorků. NanoVue Plus má řadu přednastavených specifických metod v módu „Life Scientific“, jako např. měření koncentrace DNA, RNA, oligonukleotidů, proteinů a výpočet teoretického bodu tání. U všech těchto metod naměřené absorbance přístroj automaticky přepočítá na normalizovanou délku absorbující vrstvy 10 mm (jako by byl vzorek měřen v 1 cm kyvetě). Tudíž je i vhodné volit „automatic pathlength“, protože přístroj sám zvolí vhodnou délku absorbující vrstvy pro dané měření. Naopak je tomu u měření v módu „applications“, kde také je několik přednastavených metod, jako např. měření koncentrace, kinetiky, absorbancí a spekter. V tomto módu si uživatel musí sám zvolit vhodnou délku absorbující vrstvy a poté si naměřené hodnoty (pokud je to nutné) přepočítat na 10 mm délku absorbující vrstvy.

Správnost a přesnost měření na NanoVue Plus závisí na mnoha faktorech. Na pipetovaném objemu vzorku, čistotě hydrofobní destičky (k čištění je nutné používat isopropanol a speciální ubrousky, které nezanechávají na destičce vlákna), správnosti pipetování vzorku (je vhodné kapku měřeného vzorku vytvořit na špičce pipety – za použití negativního módu pipety - a poté kapku „položít“ na destičku) a také závisí na správném zavírání víčka při měření (nenechat víčko spadnout samovolně, po zavření víčka ještě lehce víčko přitlačit).

Tab. 3: Specifikace spektrofotometru NanoVue Plus

Délka absorbující vrstvy		0,2 mm; 0,5 mm
Detektor		CCD
Rozsah vlnových délek		200 – 1100 nm
Rozsah vlnových délek při skenování		200 – 950 nm
Přesnost vlnové délky	200– 1100 nm	± 2 nm
Přesnost vlnové délky	240– 340 nm	± 1 nm
Reprodukovatelnost vlnové délky	200– 1100 nm	$\pm 0,5$ nm
Fotometrický rozsah	pro 10 mm délku absorpční dráhy	0 – 125 A
Fotometrická přesnost	při 259 nm na 0,7 – 0,8 A pro určil	± 1 %

**Obr. 6: Spektrofotometr NanoVue Plus [38]**

8 Ověření stupnice absorbance

Správnost stupnice absorbance u spektrofotometrů se ověřuje roztokem dichromanu draselného. Tento postup je popsán v Českém lékopisu 1997 [30]. Měřené vlnové délky jsou uvedeny v tab. 3, v níž jsou pro každou vlnovou délku udány přesné hodnoty specifické absorbance a povolené limity. Specifická absorbance vyjadřuje absorbanci roztoku o koncentraci 10 g dm^{-3} , která byla měřena v 1 cm délce absorbující vrstvy (kyvetě). Tolerance pro specifickou absorbanci je $\pm 0,01$. Kontrolní roztok se připraví rozpuštěním 57,0 – 63,0 mg dichromanu draselného předem vysušeného při $130 \text{ }^\circ\text{C}$ do konstantní hmotnosti v kyselině sírové, jejíž koncentrace je $0,005 \text{ mol dm}^{-3}$, a zředí se jí na 1000 ml.

Tab. 4: Specifická absorbance a povolené limity pro roztok dichromanu draselného [30]

λ [nm]	$A_{1 \text{ cm}}^{1\%}$	max. tolerance $A_{1 \text{ cm}}^{1\%}$
235	124,5	122,9 – 126,2
257	144,5	142,8 – 146,2
313	48,6	47,0 – 50,3
350	107,3	105,6 – 109,0

Pro stálost dichromanu draselného je důležité kyselé prostředí, protože přechod mezi chroman a dichroman je v roztoku vratný a závisí na pH roztoku. Dichroman je stálý v kyselém prostředí a chroman je stálý v alkalickém prostředí.

Odchýlení od předepsaných specifických absorbancí znamená, že buď roztok nebyl správně připraven, měření nebylo provedeno přesně, anebo že spektrofotometr neměří správně.

9 Experimentální část

9.1 Materiál a přístroje

9.1.1 Použité chemikálie

- **Dichroman draselný p.a.** (Chemopol, Praha, Czechslovakia)
- **Kyselina sírová p.a.** (Lachema, Neratovice, Česká republika)
- **Hovězí sérový albumin** (Serva, Německo)
- **Fyziologický roztok** (9 g dm^{-3} roztok NaCl)

9.1.2 Použité laboratorní přístroje

- **Specord M40 (I)** (VEB Carl Zeiss, Jena, NDR)
- **Specord M40 (II)** (VEB Carl Zeiss, Jena, NDR)
- **Helios Alpha** (Thermo Specitronik)
- **NanoVue Plus** (GE Healthcare)
- **Analytické váhy Discovery (Ohaus)** (Adam Scholler, Německo)
- **Sušárna Sanyo** (Adam Scholler, Německo)

9.2 Metody

9.2.1 Příprava roztoků

1. Roztok kyseliny sírové byl připraven odpipetováním 28 ml 96% kyseliny sírové do 1 l deionizované vody. Výsledná koncentrace roztoku se rovnala $0,005 \text{ mol dm}^{-3}$.
2. Roztok dichromanu draselného byl připraven navážením 0,06187 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (vysušeného do konstantní hmotnosti při $130 \text{ }^\circ\text{C}$). „Navážka“ byla rozpuštěna v 1 l $0,005 \text{ mol dm}^{-3}$ roztoku kyseliny sírové.
3. Roztok BSA byl připraven navážením 0,05123 g BSA. Odvážené množství BSA bylo přidáno k 50 ml fyziologického roztoku. Z takto připraveného roztoku byl připraven 20x a 50x zředěný roztok proteinu. 20x zředěný roztok byl připraven napipetováním 2,5 ml nezředěného roztoku bílkoviny do 50 ml odměrné baňky s následným doplněním po rysku fyziologickým roztokem. 50x zředěný roztok bílkoviny byl připraven napipetováním 1 ml nezředěného roztoku BSA do 50 ml odměrné baňky s následným doplněním po rysku fyziologickým roztokem.

9.2.2 Měření roztoků

1. Nejprve jsem zjišťovala správnost stupnice absorbance pro tři vybrané skenovací spektrofotometry [Specord M40 (I) – přední část biochemického praktika, Specord M40 (II) – zadní část biochemického praktika a Helios Alpha]. Tuto správnost jsem ověřila roztokem dichromanu draselného podle Českého lékopisu 1997 (viz kap. 8). Nastavení spektrofotometrů typu Specord M40 bylo: šířka štěrbin 60 cm^{-1} , integrační čas 5 s. Nastavení Heliosu Alpha bylo: λ select multi λ , wavelength 4, delay time 00:00, lamp change 325 nm, user -, cell prog. off, ref mode on. Naměřené a přepočítané $A_{1 \text{ cm}}^{1\%}$ byly porovnány s tabelovanými hodnotami uvedenými v Českém lékopisu 1997.
2. Dále byl zjišťován nejvhodnější dávkovaný objem roztoku $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ pro měření na spektrofotometru NanoVue Plus. Měřené objemy byly: 5 μl , 4 μl , 3,5 μl , 3 μl , 2,5 μl a 2 μl při vlnových délkách 235, 257, 313 a 350 nm. Měření bylo opakováno desetkrát. Přístroj byl nastaven: mód Applications Multiple wavelength, pathlength 0,5 mm. Naměřené a přepočítané $A_{1 \text{ cm}}^{1\%}$ byly porovnány s tabelovanými hodnotami.
3. V dalším kroku bylo porovnáváno, jaký vliv má na změřené absorbance opakované měření jedné kapky $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (se zavřeným víčkem po 1 minutě a s opakovaným otevřením a zavřením víčka). Měřené objemy byly: 5 μl , 4 μl , 3,5 μl , 3 μl , 2,5 μl a 2 μl při 235 nm, 257 nm, 313 nm a 350 nm. Nastavení přístroje: mód Applications Multiple wavelength, pathlength: 0,5 mm. Měření bylo opakováno desetkrát. Naměřené a přepočítané hodnoty $A_{1 \text{ cm}}^{1\%}$ jsem porovnala s tabelovanými hodnotami.
4. Následně byla měřena absorbance roztoku BSA. Nežředěný roztok byl měřen na NanoVue Plus, a to při 260 nm, 280 nm a 340 nm. Nastavení přístroje: mód Life science Protein UV, pathlength automatic, dilution factor 1, background on, A_{260} factor 0,76, A_{280} factor 1,55, units $\mu\text{g/l}$. 20x a 50x zředěný roztok byl měřen na Heliosu Alpha, při 220, 260, 280, 300, 350 nm. Nastavení spektrofotometru: λ select multi λ , wavelength 3, delay time 00:00, lamp change 325 nm, user -, cell prog. off, ref mode on. Všechna měření byla prováděna desetkrát. Absorbance naměřené na Heliosu Alpha byly přepočteny na koncentrace podle Christiana a Warburga.

9.3 Zpracování naměřených dat

Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programu Microsoft Office Excel 2007. Další program, který byl použitý pro vyhodnocení zpracování dat, byl Microsoft Office Word 2007.

U roztoku dichromanu draselného byly přepočítávány naměřené absorbance na specifické absorbance $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ podle následujícího vztahu:

$$A_{1\text{ cm}}^{1\%} = \left[\frac{(A_{\emptyset \text{ vzorku}} - A_{\emptyset \text{ sr. látky}})}{m_{\text{vzorku}}} \right] 10 \quad (5)$$

$A_{\emptyset \text{ vzorku}}$ je naměřená absorbance dichromanu draselného, $A_{\emptyset \text{ srovnávací látky}}$ je absorbance 0,005 mol dm^{-3} a m_{vzorku} je navážka dichromanu draselného v gramech.

U roztoku BSA byly z naměřených absorbancí vypočteny koncentrace proteinu z rovnice podle Christiana a Warburga.

$$c [\text{mg/ml}] = (1,55 A_{280}) - (0,76 A_{260}) \quad (6)$$

A_{280} je absorbance proteinu při 280 nm a A_{260} je absorbance proteinu při 260 nm.

Odchytky přepočtených $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ od tabelovaných $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ byly vypočítány následujícím vztahem.

$$\text{odchylka [\%]} = \left(\frac{100 \times A_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ přepočtená}}{A_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ tabelovaná}} \right) - 100 \quad (7)$$

$A_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ přepočtená}$ je vypočítaná specifická absorbance jednoprocenního roztoku dichromanu draselného ze vztahu 5 a $A_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ tabelovaná}$ je specifická absorbance udávaná v Českém lékopisu 1997, viz kap. 8.

10 Výsledky a diskuze

Tato experimentální část měla přinést poznatky o metodice měření na spektrofotometru NanoVue Plus. Nejprve byla provedena kontrola stupnice absorbance u tří skenujících spektrofotometrů pomocí roztoku dichromanu draselného. Z použitých spektrofotometrů byl následně vybrán ten nejpřesněji měřící, který byl poté použit jako srovnávací pro spektrofotometr NanoVue Plus při měření roztoku proteinu BSA. V dalším kroku byl hledán optimální objem měřeného vzorku pro NanoVue Plus s roztokem dichromanu draselného. A dále byla opakovaně měřena jedna kapka $K_2Cr_2O_7$ pro zjištění, jestli se u spektrofotometru NanoVue Plus dá opakovaně měřit stejný vzorek, aniž by došlo k odchýlení od první naměřené absorbance.

10.1 Měření správnosti stupnice absorbance na spektrofotometrech Specord M40 a Helios Alpha

Souhrn výsledků se nachází v tab. 5, podrobná data (výsledky jednotlivých měření) jsou v tab. 10-14 v příloze. Z výsledků je patrné, že nepřesnější měření bylo provedeno na spektrofotometru Helios Alpha, jehož odchylky od tabelovaných specifických absorbancí byly při všech měřených vlnových délkách nejmenší (do 1,3 %). Z tohoto důvodu jsem ho zvolila pro další měření jako porovnávací spektrofotometr. Záporné absorbance kyseliny sírové (srovnávací látky) u II. Specordu a Heliosu Alpha značí hrubou chybu při měření. Je to způsobeno tím, že měřeným vzorkem prochází více světla než slepým vzorkem. Tuto chybu nejspíše způsobil rozptyl světla.

Tab. 5: Přepočítané specifické absorbance roztoku $K_2Cr_2O_7$ z dat tří skenujících spektrofotometrů

λ [nm]		I. Specord M40 - PČ	I. Specord M40 - ZČ	II. Specord M40 - PČ	II. Specord M40 - ZČ	Helios Alpha
235	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	126,6	128,2	114,8	117,7	126,1
	Odchylka [%]*	+ 1,7	+ 3,0	- 7,8	- 5,5	+ 1,3
257	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	147,0	148,5	132,8	137,1	145,8
	Odchylka [%]*	+ 1,7	+ 2,8	- 8,1	- 5,1	+ 0,9
313	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	49,7	50,13	44,8	46,36	49,2
	Odchylka [%]*	+ 2,3	+ 3,1	- 7,8	- 4,5	+ 1,2
350	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	108,6	109,0	98,3	101,0	108,1
	Odchylka [%]*	+ 1,2	+ 1,6	- 8,4	- 5,9	+ 0,7

* Odchylka od tabelované $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$

Poznámka:

Nastavení přístrojů Specordu M40: šířka štěrbin (235 – 313 nm) 60 cm^{-1} , šířka štěrbin (350 nm) 30 cm^{-1} , integrační čas 5 s. Nastavení Heliosu Alpha: λ select multi λ , wavelength 4, delay time 00:00, lamp change 325 nm, user -, cell prog. off, ref mode on.

10.2 Měření na spektrofotometru NanoVue Plus - zjištění nejvhodnějšího objemu vzorku pro měření absorbancí

Výsledky jednotlivých měření jsou v příloze, tab. 15 – 20. Souhrnné a přepočtené specifické absorbance dichromanu draselného a odchylky od tabelovaných hodnot jsou v tab. 6. Z výsledků vyplývá, že nejvhodnějším objemem pro měření jsou 3 μl . Při tomto objemu, při všech měřených vlnových délkách, byly odchylky do 5 %, přičemž při 257 nm byla nulová. Objem 2,5 μl vykazoval jedny z největších odchylek, vyjma při 235 nm, kdy odchylka byla pouze - 1,6 %. Objem 2 μl by mohl v tomto případě být také vhodným objemem pro měření vzhledem k nízkým odchylkám, ale to nejspíše platí pouze pro roztok dichromanu draselného, protože pokud by měřená kapalina byla více povrchově aktivní, tak by nevytvořila na hydrofobní destičce „pevnou“ a vysokou kapku, které je potřeba, aby se spodní sklíčko víčka dotklo měřené kapky a nevznikala tam vzduchová bublina. Z tohoto důvodu je vhodné pro obecnou platnost doporučit objem 3 μl vzorku. Ani reprodukovatelnost jednotlivých měření není příliš dobrá, jak naznačují grafy 1 - 4 v příloze, z nichž je patrné, že největší reprodukovatelnosti jednotlivých měření se dosáhne u objemů 3,5 μl a 3 μl . U měření na spektrofotometru NanoVue Plus velmi záleží na technice pipetování a umístění kapky na podložku.

Tab. 6: Měření roztoku $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ při různých objemech na NanoVue Plus

λ [nm]		2 μl	2,5 μl	3 μl	3,5 μl	4 μl	5 μl
235	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	127,4	122,5	130,3	137,7	129,3	137,1
	Odchylka [%]*	+ 2,3	- 1,6	+ 4,7	+ 10,6	+ 3,9	+ 10,1
257	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	144,5	139,3	144,5	146,8	145,8	151,6
	Odchylka [%]*	0,0	- 10,5	0,0	+ 1,6	+ 0,9	+ 4,9
313	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	46,94	37,5	49,1	50,1	46,87	55,5
	Odchylka [%]*	+ 3,5	- 22,8	+ 1,0	+ 3,1	- 3,5	+ 14,2
350	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	107,3	98,3	109,3	108,9	106,4	112,8
	Odchylka [%]*	0	- 8,4	+ 1,9	+ 1,5	- 0,8	+ 5,1

* Odchylka od tabelované $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$

Poznámka:

Nastavení přístroje NanoVue Plus: mód Applications – Multiple wavelength, pathlength 0,5mm.

10.3 Opakované měření absorbance dichromanu draselného na spektrofotometru NanoVue Plus

10.3.1 Měření s jednou kapkou roztoku se zavřeným víčkem po celou dobu měření

Dále jsem zjišťovala jaký vliv má na výsledné absorbance opakované měření jedné a té samé kapky se zavřeným víčkem. Měření bylo provedeno s objemy (5 μl , 4 μl , 3,5 μl , 3 μl , 2,5 μl a 2 μl). Relevantní výsledky byly pouze pro objemy 2 μl a 3 μl , které jsou uvedeny v tab. 21 a 22 v příloze. Souhrnné výsledky měření jsou v tab. 7. Jak je patrné z výsledků při 3 μl odchylky od tabelovaných hodnot byly nejmenší (do 5% u všech vlnových délek). Naproti tomu u měření při 2 μl byly odchylky větší než 5 %, výjimkou bylo pouze měření při vlnové délce 350 nm. Dále z výsledků vyplývá, že opakované měření jedné kapky není vhodné, protože absorbance s počtem opakovaných měření vzrůstá, a tím dochází k získávání falešných dat. Vzrůst absorbance může být zapříčiněn odpařováním vzorku.

Tab. 7: Opakované měření jedné kapky roztoku $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se zavřeným víčkem na spektrofotometru NanoVue Plus

λ [nm]		2 μl	3 μl
235	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	137,2	125,5
	Odchylka [%]*	+ 10,2	+ 0,8
257	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	153,4	145,2
	Odchylka [%]*	+ 6,1	+ 0,5
313	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	51,43	47,0
	Odchylka [%]*	+ 5,8	- 3,3
350	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	114,3	110,5
	Odchylka [%]*	+ 1,1	+ 3,0

* Odchylka od tabelované $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$

Poznámka:

Nastavení přístroje NanoVue Plus: mód Applications – Multiple wavelength, pathlength 0,5mm.

10.3.2 Opakované měření absorbance dichromanu draselného s jednou kapkou roztoku s opakovaným otevřením a zavřením víčka

Měření bylo provedeno s objemy (5 μl , 4 μl , 3,5 μl , 3 μl , 2,5 μl a 2 μl). Pro možnost porovnání výsledků s předchozím úkolem byly uvedeny výsledky pro objemy 2 μl a 3 μl , viz tab. 23 a 24 v příloze. Souhrnné výsledky ukazuje tab. 8. Z ní je patrné, že při objemu 3 μl jsou odchylky výrazně nižší než u objemu 2 μl , vyjma u vlnové délky 350 nm, kde je tomu naopak. Když tyto výsledky porovnáme s předchozím úkolem, kde bylo víčko po celou dobu měření zavřené, tak při tomto měření jsou výrazně větší odchylky. Důvodem může být poškození tvaru kapky opakovaným otevíráním a zavíráním víčka (kapka se zploští, a tudíž horní sklíčko víčka se nemusí dotknout kapky, vzniká vzduchová bublina, a tím je měření znehodnoceno).

Tab. 8: Opakované měření jedné kapky roztoku $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ s opakovaným otevřením a zavřením víčka na spektrofotometru NanoVue Plus

λ [nm]		2 μl	3 μl
235	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	139,3	126,1
	Odchylka [%]	+ 11,9	+ 1,3
257	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	159,9	140,0
	Odchylka [%]	+ 10,7	- 3,1
313	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	58,2	40,4
	Odchylka [%]	+ 19,7	- 17,5
350	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	118,6	91,2
	Odchylka [%]	+ 10,5	- 15,0

* Odchylka od tabelované $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$

Poznámka:

Nastavení přístroje NanoVue Plus: mód Applications – Multiple wavelength, pathlength 0,5mm.

10.4 Měření proteinu BSA na spektrofotometru NanoVue Plus a Heliosu Alpha

Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tab. 8 a výsledky jednotlivých měření jsou v tab. 25-27 v příloze. Teoretická koncentrace proteinu byla $1,024 \text{ mg cm}^{-3}$. Protein BSA obsahuje relativně málo aromatických AMK. Vzhledem k tomu, že při tomto měření jsou chromofory právě aromatické AMK, budou vždy naměřeny nižší absorbance než by měly teoreticky být. Tato chyba se tudíž promítne i v přepočtené koncentraci tohoto proteinu. Největší odchylka od teoretické koncentrace byla u měření na spektrofotometru NanoVue Plus, kde byl pipetovaný objem $3 \mu\text{l}$. To mohlo být zapříčiněno nejen složením proteinu, ale i technikou pipetování vzorku.

Tab. 9: Přepočtené koncentrace proteinu BSA, absorbance byly měřeny na spektrofotometru Helios Alpha a NanoVue Plus

	C BSA nezředěného [mg cm^{-3}]	Odchylka od teoretické koncentrace [%]
Helios Alpha (původně 20x zředěný BSA)	0,785	- 23,3
Helios Alpha (původně 50x zředěný BSA)	0,865	- 15,5
NanoVue Plus (nezředěný BSA)	0,701	- 31,5

Poznámka: Nastavení přístroje Heliosu Alpha: λ select multi λ , wavelength 3, delay time 00:00, lamp change 325 nm, user -, cell prog. off, ref mode on. A nastavení přístroje NanoVue Plus: mód Life science – Protein UV, pathlength automatic, dilution factor 1, background on, A_{260} factor 0,76, A_{280} factor 1,55, units $\mu\text{g/l}$.

11 Závěr

1. Experimentální část této práce byla zaměřena na metodiku měření na spektrofotometru NanoVue Plus s roztoky dichromanu draselného a s BSA.
2. Nejvhodnějším dávkovaným objemem vzorku pro měření při vlnových délkách 235, 257, 313 a 350 nm jsou 3 μ l, kdy odchylky od tabelovaných hodnot byly do 1,3 %.
3. Není vhodné opakovat měření s jednou kapkou vzorku, protože během opakovaného měření vzrůstá absorbance vzorku pravděpodobně z důvodu postupného odpařování vzorku. Kapka se zplošťuje, a tím sklíčko víčka ztrácí kontakt s měřenou tekutinou.
4. Protein BSA ve své struktuře obsahuje relativně málo aromatických AMK, které způsobují absorpci molekuly. Z tohoto důvodu výsledky měření neodpovídají teoreticky vypočteným hodnotám. Odchylka od teoretické hodnoty – 31,5 % se dá zčásti přisoudit technice pipetování, umístění kapky na hydrofobní destičku či velkému povrchovému napětí proteinu, který nevytvořil dostatečně vysokou kapku.

12 Literatura

- [1] Mikeš, V.: *Základní pojmy v biochemii* [výkladový slovník, CD-ROM] 3. přeprac. vydání, Přf MU v Brně, 2004.
- [2] Okutucu, B.; Dinçer, A.; Habib, Ö.; Zihnioglu, F.: Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **70**:5, 709-711 (2007).
- [3] Trojan, S. a kol.: *Lékařská fyziologie*. 4. přeprac. vyd. Praha, Grada Publishing 2003.
- [4] Racek, J.: *Klinická biochemie*. 2. přeprac. vyd. Praha, Galén 2006.
- [5] Musil, D.: Diagnostický a terapeutický algoritmus při otocích dolních končetin. *Solen* **6**, 296-300 (2005).
- [6] Rovenský, J.: *Revmatologický výkladový slovník*. Praha, Grada Publishing 2006.
- [7] Vrablík, M.; Češka, R.: Sekundární dyslipoproteinémie. *Solen* **1**, 14-17 (2004).
- [8] Thongboonkerd, V.: Practical Points in Urinary Proteomics. *Journal of Proteome Research* **6**:10, 3881-3890 (2007).
- [9] Vrchlický, O.; Tesař, V.; Dusilová S.: *Doporučené postupy a algoritmy v nefrologii*. Praha, Grada Publishing 2010.
- [10] Doležel, Z.; Štarha, J.: Abnormální nálezy v moči – proteinurie a hematurie. *Solen* **1**, 32-36 (2003).
- [11] Tesař, V.; Zima, T.; Racek, J.: *Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování proteinurie*. Dostupné z URL: <<http://www.cskb.cz/res/file/doporučení/doppoteinurie.pdf>> [cit. 9. 7. 2012]
- [12] Nemocnice Český Krumlov: *Laboratorní příručka*. Dostupné na URL: <<http://nemck.cz/dok/laboratorni-prirucka.pdf>> [cit. 13.7 2012]
- [13] Watanabe, N.; KameI, S.; Ohkubo. A.; Tokuda, K.: Urinary Proteinase Measured with a pyrogallol red-molybdate complex manually and in a Hitachi 726 Automated Analyzer. *Clinical Chemistry* **32**:8, 1554-1554 (1986).
- [14] Tichý M.; Maisnar V.; Stulík J.; Vávrová J.: Stanovení koncentrace celkové bílkoviny v moči s pozitivní Bence Jonesovou bílkovinou. *Klinická biochemie a metabolismus* **17**:38, 252–255 (2009).

- [16] Kodíček, M.; Karpenko, V.: *Biofyzikální chemie*. 2. přeprac. vyd. Praha, Akademie věd České republiky 2002.
- [17] Owen, T.: *Fundamentals od modern UV-visible spectroscopy*. Germany, Hewlett-Packard 1996.
- [18] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Praha, Karolinum 2004.
- [19] Doumas, B. T.; Bayse, D. D.; Carter, R. J.; Peters, T.; Schaffer, R: A candidate reference method for determination of total protein in serum, I. Development and validation. *Clinical Chemistry* **27**:10, 1642-1650 (1981).
- [20] Krohn, R. I.: *The colorimetric detection and quantitation of total protein*. Dostupné na URL: <<http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/CPUnit/refId-txa03i.html>> [cit. 15.7 2007]
- [21] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**:1, 265-275 (1951).
- [22] Thermo Scientific: *Pierce protein assay technical handbook*. 2. přeprac. vyd. US 2010.
- [23] Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goetze, M. N.; Olson, B. J.; Klenk D. C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**:1, 76–85 (1985).
- [25] Wiechelman, K. J.; Braun, R. D.; Fitzpatrick, J. D.: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formativ. *Analytical Biochemistry* **175**:1, 231-237 (1988).
- [26] Brown, R. E.; Jarvis, K. L; Hyland, K. J.: Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Analytical Biochemistry*, **180**:1, 136-139 (1989).
- [27] Therno Scientific: *Chemistry of protein assays*. Dostupné na URL: <<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=876562B0-5056-8A76-4E0C-B764EAB3A339>> [cit. 14.8 2012]
- [28] Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:1-2, 248-254 (1976).
- [29] Sano, K.; Kanamori, K; Shiba, A.; Nakao, M.: Automatic assay of urinary protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Analytical Biochemistry* **113**:1, 197-201(1981).

- [30] Český lékopis 1997. Dostupný na URL:
<http://www.lekopis.cz/Kap_2_5_33.htm> [cit. 25. 7. 2012]
- [31] Eventov, V. L.; Andrianova, M. Yu.; Eventova, O. V.: A device for measuring protein concentration in urine. *Biomedical Engineering* **37**:3, 134-138 (2003).
- [32] Dakin, H. D.; Dudley, H. W.: *Some limitations of the Kjeldahl method*. Dostupné na URL: <<http://www.jbc.org/content/17/2/275.full.pdf>> [cit. 16. 8 2012]
- [33] Chutipongtanate, S.: *Systematic comparisons of various spectrophotometric and colorimetric methods to measure concentrations of protein, peptide and amino acid: Detectable limits, linear dynamic ranges, interferences, practicality and unit cost*. Dostupné na URL: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.058>> [cit. 15.7 2012]
- [34] McElderry, L. A.; Tarbit, I. F.; Cassells-Smith, A. J.: Six methods for urinary protein compared. *Clinical Chemistry* **28**:2, 356-360 (1982).
- [35] Nemocnice s poliklinikou Karviná-Ráj: *Laboratorní příručka*. Dostupné na URL: <http://www.nspka.cz/NSPKA_prirucky/2012/laboratorni_prirucka_OKB_H_orl_ova/STACF.htm> [cit. 5. 8 2012]
- [36] Holstege, D.; Price, P; Robert O.; Meyer, D.: *California analytical methods manual*. University of California, Davis 2010.
- [37] GE Healthcare: *NanoVue Plus™, Product User Manual*. UK 2010.
- [38] Denvile scientific. Dostupné na URL: <<http://www.denvillescientific.com/products.php?Cat=105&SubCat=133>> [cit. 20.7 2012]

13 Přílohy

Tab. 10: Měření roztoku $K_2Cr_2O_7$ na I. Specordu M40 v přední části přístroje

λ [nm]	235	257	313	350
1. A vzorku	0,8479	0,9270	0,3154	0,6736
2. A vzorku	0,8564	0,9360	0,3188	0,6807
3. A vzorku	0,8606	0,9391	0,3212	0,6842
A \emptyset vzorku	0,8549	0,9340	0,3185	0,6795
A \emptyset blanku	0,0717	0,0248	0,0109	0,0076
A \emptyset vzorku - A \emptyset blanku	0,7833	0,9093	0,3076	0,6719
$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	126,6	147,0	49,72	108,6
Odchylka $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ [%]	+ 1,7	+ 1,7	+ 2,3	+ 1,2

Tab. 11: Měření roztoku $K_2Cr_2O_7$ na I. Specordu M40 v zadní části přístroje

λ [nm]	235	257	313	350
1. A vzorku	0,8392	0,9281	0,3116	0,6748
2. A vzorku	0,8409	0,9294	0,3121	0,6757
3. A vzorku	0,8367	0,9294	0,3105	0,6755
A \emptyset vzorku	0,8389	0,9290	0,3114	0,6753
A \emptyset blanku	0,0460	0,0103	0,0013	0,0012
A \emptyset vzorku - A \emptyset blanku	0,7930	0,9186	0,3101	0,6741
$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	128,2	148,5	50,13	109,0
Odchylka $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ [%]	+ 3,0	+ 2,8	+ 3,1	+ 1,6

Tab. 12: Měření roztoku $K_2Cr_2O_7$ na II. Specordu M40 v přední části přístroje

λ [nm]	235	257	313	350
1. A vzorku	0,6611	0,8271	0,2673	0,6207
2. A vzorku	0,6606	0,8257	0,2678	0,6212
3. A vzorku	0,6595	0,8257	0,2671	0,6189
A \emptyset vzorku	0,6604	0,8262	0,2674	0,6203
A \emptyset blanku	- 0,0501	0,0043	- 0,0095	0,0119
A \emptyset vzorku - A \emptyset blanku	0,7105	0,8228	0,2769	0,6084
$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku	114,8	132,8	44,76	98,33
$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ [%]	- 7,8	- 8,1	- 7,8	- 8,4

Tab. 13: Měření roztoku $K_2Cr_2O_7$ na II. Specordu M40 v zadní části přístroje

λ [nm]	235	257	313	350
1. A_{vzorku}	0,6812	0,8398	0,2815	0,6313
2. A_{vzorku}	0,6810	0,8384	0,2858	0,6299
3. A_{vzorku}	0,6801	0,8378	0,2860	0,6299
$A_{\emptyset \text{ vzorku}}$	0,6808	0,8387	0,2844	0,6304
$A_{\emptyset \text{ blanku}}$	- 0,0475	- 0,0094	- 0,0024	0,0057
$A_{\emptyset \text{ vzorku}} - A_{\emptyset \text{ blanku}}$	0,7282	0,8480	0,2868	0,6247
$A_{1 \text{ cm}}^{1\%} \text{ vzorku}$	117,7	137,1	46,36	101,0
Odchylka $A_{1 \text{ cm}}^{1\%}$ [%]	- 5,5	- 5,1	- 4,5	- 5,9

Tab. 14: Měření roztoku $K_2Cr_2O_7$ na II. na Heiosu Alpha

λ [nm]	235	257	313	350
1. A_{vzorku}	0,670	0,836	0,250	0,592
2. A_{vzorku}	0,671	0,839	0,252	0,595
3. A_{vzorku}	0,671	0,839	0,251	0,594
$A_{\emptyset \text{ vzorku}}$	0,671	0,838	0,251	0,594
$A_{\emptyset \text{ blanku}}$	- 0,110	- 0,064	- 0,053	- 0,075
$A_{\emptyset \text{ vzorku}} - A_{\emptyset \text{ blanku}}$	0,780	0,902	0,304	0,669
$A_{1 \text{ cm}}^{1\%} \text{ vzorku}$	126,1	145,8	49,2	108,1
Odchylka $A_{1 \text{ cm}}^{1\%}$ [%]	+ 1,3	+ 0,9	+ 1,2	+ 0,7

Tab. 15: Měření roztoku $K_2Cr_2O_7$ na spektrofotometru NanoVue Plus, pipetovaný objem 4 μl

λ [nm]	235	257	313	350
1. A_{vzorku}	0,044	0,049	0,018	0,036
2. A_{vzorku}	0,040	0,046	0,015	0,034
3. A_{vzorku}	0,038	0,044	0,014	0,032
4. A_{vzorku}	0,046	0,050	0,018	0,036
5. A_{vzorku}	0,041	0,046	0,016	0,034
6. A_{vzorku}	0,053	0,057	0,024	0,040
7. A_{vzorku}	0,051	0,056	0,023	0,040
8. A_{vzorku}	0,043	0,048	0,018	0,035
9. A_{vzorku}	0,041	0,048	0,018	0,036
10. A_{vzorku}	0,052	0,056	0,022	0,038
$A_{\emptyset \text{ vzorku}}$	0,045	0,050	0,019	0,036
$A_{\emptyset \text{ blanku}}$	0,005	0,005	0,004	0,003
$A_{\emptyset \text{ vzorku}} - A_{\emptyset \text{ blanku}}$	0,040	0,045	0,015	0,033
$A_{1 \text{ cm}}^{1\%} \text{ vzorku } 0,05 \text{ mm}$	6,465	7,289	2,344	5,318
$A_{1 \text{ cm}}^{1\%} \text{ vzorku } 10 \text{ mm}$	129,3	145,8	46,9	106,4
Odchylka $A_{1 \text{ cm}}^{1\%}$ [%]	+ 3,9	+ 0,9	- 3,5	- 0,8

Tab. 16: Měření roztoku $K_2Cr_2O_7$ na spektrofotometru NanoVue Plus, pipetovaný objem 5 μ l

λ [nm]	235	257	313	350
1. A vzorku	0,044	0,041	0,016	0,033
2. A vzorku	0,043	0,054	0,022	0,040
3. A vzorku	0,047	0,051	0,020	0,037
4. A vzorku	0,044	0,051	0,020	0,038
5. A vzorku	0,045	0,055	0,023	0,040
6. A vzorku	0,041	0,048	0,019	0,037
7. A vzorku	0,044	0,049	0,021	0,038
8. A vzorku	0,042	0,049	0,020	0,038
9. A vzorku	0,042	0,049	0,020	0,038
10. A vzorku	0,042	0,049	0,020	0,038
A \emptyset vzorku	0,043	0,050	0,020	0,038
A \emptyset blanku	0,001	0,003	0,003	0,003
A \emptyset vzorku - A \emptyset blanku	0,042	0,047	0,017	0,035
A $_1^{1\%}$ cm vzorku 0,05 mm	6,853	7,80	2,775	5,641
A $_1^{1\%}$ cm vzorku 10 mm	137,1	151,6	55,50	112,8
Odchylka A $_1^{1\%}$ cm [%]	+ 10,1	+ 4,9	+ 14,2	+ 5,1

Tab. 17: Měření roztoku $K_2Cr_2O_7$ na spektrofotometru NanoVue Plus, pipetovaný objem 3,5 μ l

λ [nm]	235	257	313	350
1. A vzorku	0,043	0,048	0,016	0,035
2. A vzorku	0,042	0,046	0,017	0,035
3. A vzorku	0,043	0,048	0,018	0,035
4. A vzorku	0,042	0,047	0,017	0,035
5. A vzorku	0,043	0,048	0,018	0,034
6. A vzorku	0,046	0,046	0,020	0,037
7. A vzorku	0,049	0,053	0,019	0,034
8. A vzorku	0,047	0,045	0,017	0,037
9. A vzorku	0,043	0,045	0,018	0,036
10. A vzorku	0,044	0,048	0,019	0,036
A \emptyset vzorku	0,044	0,047	0,018	0,035
A \emptyset blanku	0,002	0,002	0,002	0,002
A \emptyset vzorku - A \emptyset blanku	0,042	0,045	0,016	0,033
A $_1^{1\%}$ cm vzorku 0,05 mm	6,885	7,338	2,505	5,447
A $_1^{1\%}$ cm vzorku 10 mm	137,7	146,8	50,11	108,9
Odchylka A $_1^{1\%}$ cm [%]	+ 10,6	+ 1,6	+ 3,1	+ 1,5

Tab. 18: Měření roztoku K₂Cr₂O₇ na spektrofotometru NanoVue Plus, pipetovaný objem 3 μl

λ [nm]	235	257	313	350
1. A vzorku	0,040	0,046	0,016	0,033
2. A vzorku	0,041	0,047	0,016	0,034
3. A vzorku	0,041	0,047	0,017	0,035
4. A vzorku	0,044	0,048	0,018	0,035
5. A vzorku	0,043	0,047	0,017	0,034
6. A vzorku	0,044	0,048	0,017	0,034
7. A vzorku	0,046	0,050	0,018	0,035
8. A vzorku	0,046	0,050	0,019	0,036
9. A vzorku	0,049	0,052	0,021	0,038
10. A vzorku	0,042	0,047	0,017	0,037
A \emptyset vzorku	0,044	0,048	0,018	0,035
A \emptyset blanku	0,003	0,004	0,002	0,001
A \emptyset vzorku - A \emptyset blanku	0,041	0,044	0,016	0,034
A _{1 cm} ^{1%} vzorku 0,05 mm	6,514	7,225	2,457	5,463
A _{1 cm} ^{1%} vzorku 10 mm	130,3	144,5	49,14	109,3
Odchylka A _{1 cm} ^{1%} [%]	+4,7	0,0	+ 1,0	+ 1,9

Tab. 19: Měření roztoku K₂Cr₂O₇ na spektrofotometru NanoVue Plus, pipetovaný objem 2,5 μl

λ [nm]	235	257	313	350
1. A vzorku	0,040	0,047	0,020	0,039
2. A vzorku	0,040	0,046	0,018	0,036
3. A vzorku	0,038	0,046	0,018	0,035
4. A vzorku	0,040	0,045	0,016	0,034
5. A vzorku	0,046	0,045	0,016	0,034
6. A vzorku	0,041	0,051	0,022	0,040
7. A vzorku	0,042	0,047	0,018	0,036
8. A vzorku	0,042	0,049	0,020	0,038
9. A vzorku	0,043	0,048	0,019	0,037
10. A vzorku	0,044	0,048	0,018	0,036
A \emptyset vzorku	0,042	0,047	0,019	0,037
A \emptyset blanku	0,004	0,007	0,007	0,006
A \emptyset vzorku - A \emptyset blanku	0,038	0,040	0,012	0,031
A _{1 cm} ^{1%} vzorku 0,05 mm	6,126	6,465	1,875	4,914
A _{1 cm} ^{1%} vzorku 10 mm	122,5	129,3	37,50	98,27
Odchylka A _{1 cm} ^{1%} [%]	- 1,6	- 10,5	-22,8	- 8,4

Tab. 20: Měření roztoku $K_2Cr_2O_7$ na spektrofotometru NanoVue Plus, pipetovaný objem 2 μ l

λ [nm]	235	257	313	350
1. A vzorku	0,036	0,038	0,009	0,024
2. A vzorku	0,038	0,040	0,008	0,026
3. A vzorku	0,045	0,055	0,010	0,027
4. A vzorku	0,035	0,040	0,09	0,026
5. A vzorku	0,037	0,041	0,010	0,027
6. A vzorku	0,042	0,046	0,014	0,031
7. A vzorku	0,044	0,047	0,013	0,029
8. A vzorku	0,040	0,042	0,010	0,027
9. A vzorku	0,037	0,041	0,009	0,026
10. A vzorku	0,037	0,041	0,010	0,027
A \emptyset vzorku	0,039	0,043	0,010	0,027
A \emptyset blanku	0,000	- 0,002	- 0,004	- 0,006
A \emptyset vzorku - A \emptyset blanku	0,039	0,045	0,014	0,033
$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku 0,05 mm	6,368	7,225	2,347	5,366
$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku 10 mm	127,4	144,5	46,94	107,3
Odchylka $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ [%]	+ 2,3	0,0	- 3,5	0,0

Tab. 21: Opakované měření 1 kapky roztoku $K_2Cr_2O_7$ se zavřeným víčkem na spektrofotometru NanoVue Plus, pipetovaný objem 3 μ l

t [min]	235	257	313	350
0	0,041	0,048	0,017	0,034
0,5	0,038	0,045	0,015	0,033
1	0,041	0,048	0,017	0,037
1,5	0,041	0,049	0,017	0,034
2	0,042	0,049	0,017	0,035
2,5	0,040	0,047	0,017	0,035
3	0,042	0,049	0,017	0,035
3,5	0,043	0,051	0,018	0,036
4	0,040	0,047	0,017	0,035
4,5	0,042	0,049	0,018	0,039
5	0,045	0,052	0,019	0,037
A \emptyset vzorku	0,041	0,049	0,017	0,035
A \emptyset blanku	0,003	0,004	0,003	0,001
A \emptyset vzorku - A \emptyset blanku	0,038	0,045	0,015	0,034
$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku 0,05 mm	6,274	7,259	2,351	5,525
$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku 10 mm	125,5	145,2	47,02	110,5
Odchylka $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ [%]	+ 0,8	+ 0,5	- 3,3	+ 3,0

Tab. 22: Opakované měření 1 kapky roztoku $K_2Cr_2O_7$ se zavřeným víčkem na spektrofotometru NanoVue Plus, pipetovaný objem 2 μ l

t [min]	235	257	313	350
0	0,037	0,042	0,009	0,026
0,5	0,037	0,042	0,009	0,026
1	0,037	0,042	0,009	0,026
1,5	0,038	0,044	0,010	0,027
2	0,039	0,044	0,010	0,027
2,5	0,039	0,045	0,011	0,028
3	0,041	0,046	0,011	0,029
3,5	0,41	0,047	0,012	0,029
4	0,042	0,048	0,012	0,030
4,5	0,042	0,048	0,012	0,030
5	0,043	0,049	0,012	0,031
A_{\emptyset} vzorku	0,040	0,045	0,011	0,028
A_{\emptyset} blanku	- 0,003	- 0,002	- 0,005	- 0,007
A_{\emptyset} vzorku - A_{\emptyset} blanku	0,039	0,047	0,016	0,035
$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku 0,05 mm	6,862	7,670	2,571	5,716
$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku 10 mm	137,2	153,4	51,43	114,3
Odchylka $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ [%]	+ 10,2	+ 6,1	+ 5,8	+ 1,1

Tab. 23: Opakované měření 1 kapky roztoku $K_2Cr_2O_7$ s opakovaným otevřením a zavřením víčka víčkem na spektrofotometru NanoVue Plus, pipetovaný objem 3 μ l

λ [nm]	235	257	313	350
1. A_{\emptyset} vzorku	0,041	0,047	0,018	0,033
2. A_{\emptyset} vzorku	0,040	0,047	0,018	0,035
3. A_{\emptyset} vzorku	0,040	0,047	0,017	0,035
4. A_{\emptyset} vzorku	0,040	0,048	0,019	0,036
5. A_{\emptyset} vzorku	0,042	0,050	0,019	0,036
6. A_{\emptyset} vzorku	0,043	0,051	0,021	0,039
7. A_{\emptyset} vzorku	0,042	0,049	0,020	0,038
8. A_{\emptyset} vzorku	0,051	0,059	0,028	0,045
9. A_{\emptyset} vzorku	0,049	0,058	0,028	0,046
10. A_{\emptyset} vzorku	0,047	0,055	0,023	0,042
A_{\emptyset} vzorku	0,044	0,051	0,021	0,036
A_{\emptyset} blanku	0,005	0,008	0,009	0,008
A_{\emptyset} vzorku - A_{\emptyset} blanku	0,039	0,043	0,013	0,028
$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku 0,05 mm	6,304	6,999	2,020	4,558
$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vzorku 10 mm	126,1	140,0	40,41	91,2
Odchylka $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ [%]	+ 1,3	- 3,1	- 17,5	- 15,0

Tab. 24: Opakované měření 1 kapky roztoku $K_2Cr_2O_7$ s opakovaným otevřením a zavřením víčka víčkem na spektrofotometru NanoVue Plus, pipetovaný objem 2 μ l

λ [nm]	235	257	313	350
1. A vzorku	0,040	0,046	0,013	0,029
2. A vzorku	0,038	0,044	0,013	0,029
3. A vzorku	0,038	0,044	0,013	0,029
4. A vzorku	0,040	0,046	0,016	0,030
5. A vzorku	0,040	0,047	0,015	0,031
6. A vzorku	0,044	0,050	0,017	0,034
7. A vzorku	0,043	0,049	0,016	0,033
8. A vzorku	0,046	0,054	0,020	0,037
9. A vzorku	0,053	0,065	0,031	0,049
10. A vzorku	0,052	0,065	0,031	0,049
A \emptyset vzorku	0,043	0,051	0,019	0,035
A \emptyset blanku	0,000	0,002	0,001	- 0,002
A \emptyset vzorku - A \emptyset blanku	0,043	0,049	0,0018	0,037
A $_1^{1\%}$ vzorku 0,05 mm	6,966	7,997	2,909	5,932
A $_1^{1\%}$ vzorku 10 mm	139,3	159,9	58,19	118,6
Odchylka A $_1^{1\%}$ [%]	+ 11,9	+ 10,7	+ 19,7	+ 10,5

Tab. 25: Měření koncentrovaného roztoku BSA na spektrofotometru NanoVue Plus

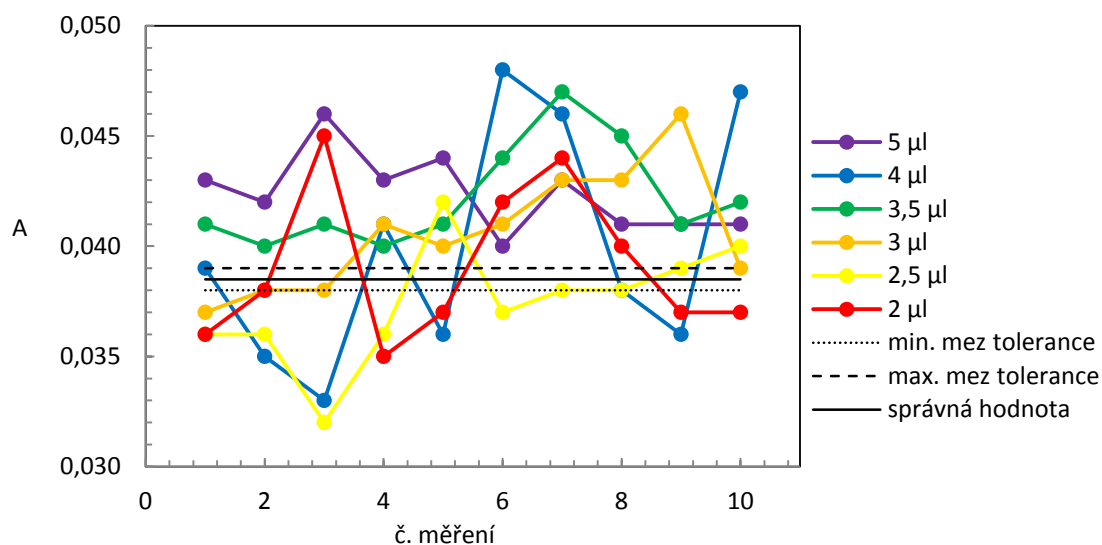
	λ [nm]			C _{BSA} [μ g ml ⁻³]
	260	280	340	
1. A vzorku	0,53	0,73	0,038	697
2. A vzorku	0,55	0,74	0,007	721
3. A vzorku	0,48	0,67	-0,008	682
4. A vzorku	0,64	0,84	0,006	697
5. A vzorku	0,50	0,70	0,008	697
6. A vzorku	0,55	0,74	0,049	690
7. A vzorku	0,49	0,70	0,004	713
8. A vzorku	0,51	0,71	0,002	713
9. A vzorku	0,49	0,69	-0,001	697
10. A vzorku	0,51	0,71	0,015	705
A \emptyset vzorku v 10 mm	0,53	0,72	0,012	-
C \emptyset vzorku	-	-	-	701

Tab. 26: Měření 50x zředěného roztoku BSA na spektrofotometru Helios alpha

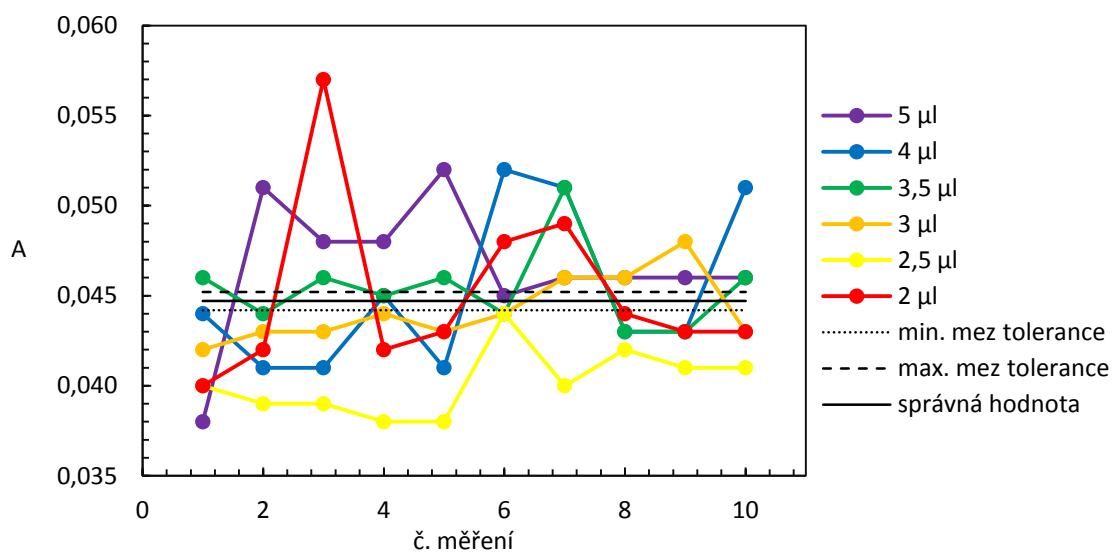
	λ [nm]				
	220	260	280	300	340
1. A vzorku	0,444	0,064	0,062	0,028	- 0,017
2. A vzorku	0,445	0,063	0,061	0,029	- 0,017
3. A vzorku	0,444	0,063	0,61	0,029	- 0,017
4. A vzorku	0,444	0,063	0,062	0,029	- 0,017
5. A vzorku	0,440	0,062	0,062	0,028	- 0,017
6. A vzorku	0,444	0,063	0,062	0,029	- 0,017
7. A vzorku	0,446	0,063	0,062	0,028	- 0,017
8. A vzorku	0,447	0,064	0,062	0,028	- 0,017
9. A vzorku	0,444	0,064	0,062	0,029	- 0,016
10. A vzorku	0,444	0,064	0,062	0,029	- 0,016
A \emptyset vzorku	0,445	0,063	0,062	0,029	- 0,017
A \emptyset blanku	0,233	0,048	0,043	0,024	- 0,023
A \emptyset vzorku - A \emptyset blanku	0,212	0,016	0,019	0,005	0,006

Tab. 27: Měření 20x zředěného roztoku BSA na spektrofotometru Helios Alpha

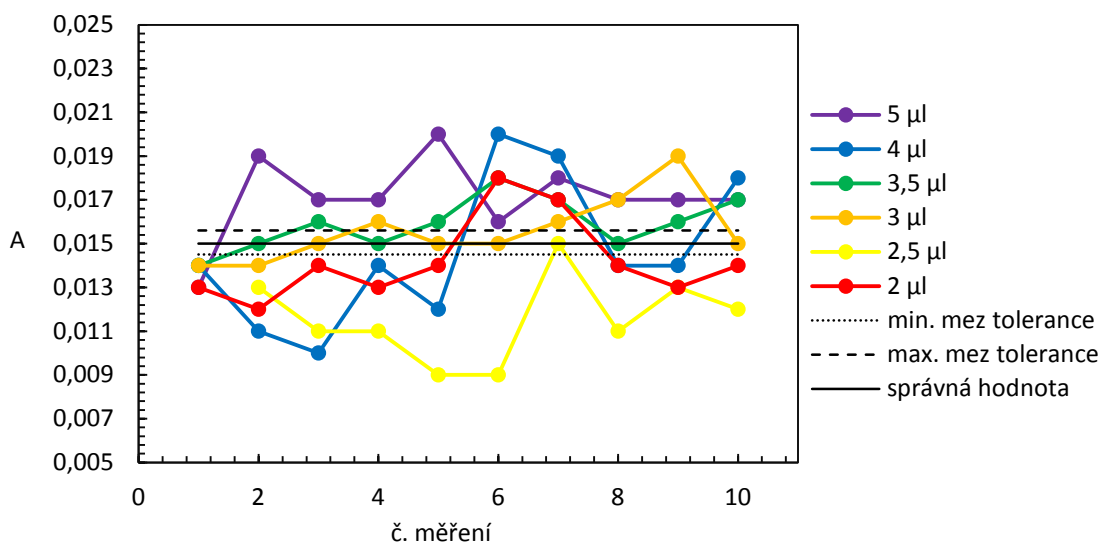
	λ [nm]				
	220	260	280	300	350
1. A vzorku	0,784	0,082	0,085	0,034	-0,015
2. A vzorku	0,787	0,081	0,085	0,034	-0,015
3. A vzorku	0,777	0,089	0,083	0,033	-0,015
4. A vzorku	0,784	0,081	0,084	0,034	-0,015
5. A vzorku	0,781	0,080	0,084	0,033	-0,015
6. A vzorku	0,785	0,081	0,084	0,033	-0,015
7. A vzorku	0,783	0,082	0,084	0,034	-0,015
8. A vzorku	0,782	0,080	0,085	0,034	-0,015
9. A vzorku	0,784	0,082	0,085	0,035	-0,015
10. A vzorku	0,785	0,081	0,084	0,034	-0,015
A \emptyset vzorku	0,783	0,082	0,084	0,034	-0,015
A \emptyset blanku	0,233	0,048	0,043	0,024	- 0,023
A \emptyset vzorku - A \emptyset blanku	0,551	0,034	0,042	0,010	0,008



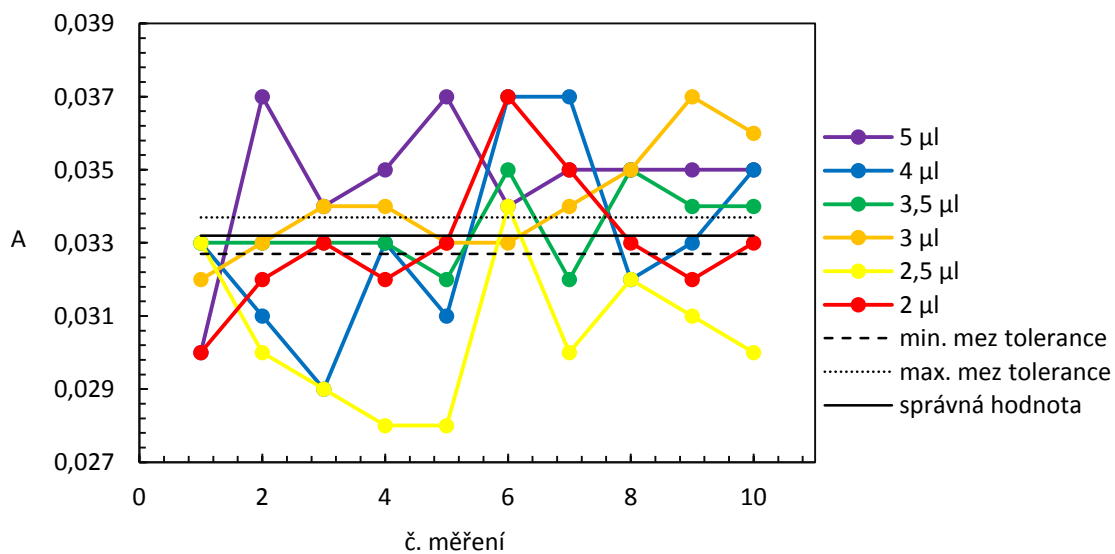
Obr. 7: Reprodukovanost měření dichromanu draselného při 235 nm, spektrofotometr NanoVue Plus. Teoreticky správná hodnota absorpance je 0,0385



Obr. 8: Reprodukovanost měření dichromanu draselného při 257 nm, spektrofotometr NanoVue Plus. Teoreticky správná hodnota absorpance je 0,0447



Obr. 9: Reprodukovatelnost měření roztoku dichromanu draselného při 313 nm, spektrofotometr NanoVue Plus. Teoreticky správná hodnota absorbance je 0,0150



Obr. 10: Reprodukovatelnost měření roztoku dichromanu draselného při 350 nm, spektrofotometr NanoVue Plus. Teoreticky správná hodnota absorbance je 0,0332