

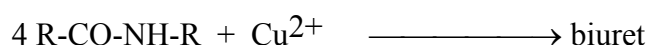
# ***DOLOČANJE CELOKUPNIH PROTEINOV V SERUMU IN NJIHOVA ELEKTROFOREZNA LOČBA***

## **A. DOLOČANJE CELOTNE KONCENTRACIJE PROTEINOV V SERUMU Z BIURETNO METODO**

### ***Princip:***

Proteini reagirajo z bakrovimi (II) ioni v alkalnem mediju v modro obarvan kompleks.

### ***Reakcija:***



### ***Postopek:***

V 10 mL epruvete pipetiramo v mL:

	Sl-r	St-sl	St	Vz-sl	Vz	K-sl	K
demineralizir. voda	0,05	2,5	—	2,5	—	2,5	—
standardna razt.	—	0,05	0,05	—	—	—	—
vzorec (serum)	—	—	—	0,05	0,05	—	—
kontrolni vzorec	—	—	—	—	—	0,05	0,05
delovni biuret r.	2,5	—	2,5	—	2,5	—	2,5

Premešamo in merimo absorbanco pri 540 nm med 30 - 60 min.

### ***Račun:***

$$c_{VZ} = (A_{VZ} - A_{VZ-sl} - A_{sl-r}) / (A_{st} - A_{st-sl} - A_{sl-r}) \times c_{st}$$

### ***Referenčne vrednosti:***

serum:	65 - 80 g/L
urin:	do 0,15 g/L
cerebrospinalna tekočina:	0,2 - 0,4 g/L
transudat:	< 30 g/L
eksudat:	> 30 g/L

### ***Reagenti:***

Delovni reagent je raztopina  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (6 g/L) v alkalni raztopini (0,2 M NaOH) z dodanim K,Na-tartratom  $\times 4 \text{H}_2\text{O}$  (28 g/L) in KJ (0,5 %).

### ***Opombe:***

Analiziramo lahko plazmo ali serum.

Meja detekcije: 1 - 15 mg v alikvotu vzorca, ki ga analiziramo.

Postopek je linearen 10 g/L - 120 g/L. KV (med serijami) znaša do 2%.

AK in dipeptidi ne reagirajo.

Reakcijo motijo zvišane koncentracije amonijaka, Hb (nad 300 mg/L) in lipidov. Vplivu hiperbilirubinemije se izognemo z Vz-sl.

## ***Rezultati praktičnega dela***

Številka vzorca:

1. *Opis vzorcev, materiala in opreme*

2. *Meritve:*

a) pogoji merjenja:

b) rezultati meritev:

kontrolni vzorec:

slepi vzorec kontrole:

standardni vzorec:

slepi vzorec standarda:

preiskovani vzorec

slepi vzorec:

ostalo:

c) podane vrednosti:

kontrolni vzorec:

standardni vzorec:

ostalo:

3. *Izračuni:*

4. *Rezultati:*

## **B. ELEKTROFOREZA SERUMSKIH PROTEINOV NA ACETATNI CELULOZI**

### ***Princip:***

Serumski proteini so pri  $\text{pH} = 8 - 10$  negativno nabiti, zato v električnem polju potujejo k pozitivni anodi. Hitrost potovanja proteinov pri izbranih pogojih EF je odvisna od velikosti njihovega neto negativnega naboja, ta pa je določen z izoelektrično točko posameznega proteina. Najhitreje potujejo albumini, najpočasneje pa  $\gamma$ -globulini.

### ***Postopek:***

#### A) Priprava kadičk in plošč

- EF kadičko napolnimo z barbituratnim pufrom.
- EF plošče z acetatno celulozo namakamo v pufru 10 min.
- Plošče položimo med filtrirna papirja in narahlo pritisnemo, da popivnemo odvečni pufer.

#### B) Nanos (aplikacija) vzorcev na plošče

- Z multiaplikatorjem nanesemo do osem vzorcev hkrati.
- Plošče položimo na mostiček v EF kadički, in sicer z aktivno stranjo NAVZDOL ter tako, da bo mesto nanosa vzorcev na KATODNI STRANI (-).

#### C) Elektroforezna ločba proteinov

- Kadičko pokrijemo in vključimo električni tok:  $U = 180\text{V}$  in  $I \approx 5\text{ mA}$ .
- Pustimo 10 - 15 min.
- Izključimo tok. Plošče snamemo z mostička in jih označimo (odrežemo robove).

#### D) Obdelava plošč po EF

- Plošče prenesemo najprej v *raztopino barvila* in barvamo 5 min.
- Plošče prenesemo v *raztopino za razbarvanje* in močneje stresamo. Postopek ponovimo 3 do 4 krat, vsakič s svežo raztopino, dokler se ozadje ne razbarva.
- Plošče za 1 minuto potopimo v absolutni metanol.
- Plošče prenesemo v *raztopino za razmreženje* in jih pustimo v njej 1 minuto.
- Plošče prenesemo v sušilnik ( $T = 60 - 70^\circ\text{C}$ ) za  $\approx 6$  min.

#### E) Meritve

- Pustimo, da se plošče ohladijo in denzitometriamo pri 520 nm.

### ***Račun:***

Denzitometer izmeri deleže (%) posameznih proteinskih frakcij. S pomočjo koncentracije celokupnih proteinov v tem vzorcu izračuna koncentracije proteinov v posamezni frakciji.

### ***Referenčne vrednosti:***

	g/L	%
albumini	36,3 - 49,1	55,7
$\alpha_1$	1,1 - 3,5	3,1
$\alpha_2$	6,5 - 11,7	11,3
$\beta$	7,4 - 12,6	11,8
$\gamma$	5,8 - 17,4	18,1

**Reagenti:**

EF barbituratni pufer: Na-dietilbarbiturna kislina (13 mg/L), pH = 9,2.

EF plošče z acetatno celulozo.

Raztopina barvila: raztopina Ponceau S (0,5 g) v 5 % trikloroacetni kislini (100 mL).

Raztopina za razbarvanje: 5 % raztopina oetne kisline.

Raztopina za razmreženje: zmes metanola in oetne kisline (86 / 14).

**Rezultati praktičnega dela**

Številka vzorca:

1. Opis vzorcev, materiala in opreme

2. Meritve:

a) pogoji merjenja:

b) izdelek (nalepite in označite posamezne frakcije)

c) podane vrednosti:

3. *Izračuni:*

4. *Rezultati:*

***Komentar rezultatov***

Komentirajte rezultate določitev celotne koncentracije proteinov in EF skupaj!

---

Pregledal-a:

Datum:

Pripombe: